

Plasmodium falciparum Aquaporin 2:
Strukturelle Ähnlichkeit oder echtes Aquaporin?

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

Malte Mäder

Kiel 2019

Erster Gutachter:	Prof. Dr. Eric Beitz
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Thomas Kunze
Tag der mündlichen Prüfung:	25.03.2019
Zum Druck genehmigt:	25.03.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Malaria	3
1.1.1 Lebenszyklus von <i>Plasmodium sp.</i>	3
1.2 Aquaporine	5
1.2.1 Struktur der Aquaporine	6
1.2.2 Funktion von Aquaporinen	9
1.3 <i>Plasmodium falciparum</i> Aquaporine	11
1.3.1 Aquaporin 1	11
1.3.2 Aquaporin 2	12
1.4 Zielsetzung der Arbeit	15
2. Material	17
2.1 Chemikalien	17
2.2 Geräte	18
2.3 Plasmide	20
2.4 Oligonukleotide	22
2.5 Hefe-Stämme	23
2.6 <i>E. coli</i> -Stämme	23
2.7 Antikörper	24
2.8 Puffer & Lösungen	25
2.8.1 Agarose-Gelelektrophorese	25
2.8.2 Nährmedien	25
2.8.3 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	26
2.8.4 Isolierung von Proteinen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> :	27
2.8.5 Zellfreie Herstellung von Proteinen	27
2.8.6 S30-Extrakt	28
2.8.7 SDS-PAGE	28
2.8.8 Westernblot	29
2.8.9 Dichtegradientenzentrifugation	29

2.9	Funktionsassays.....	30
2.9.1	Präparation von Hefeprotoplast.....	30
2.9.2	Stopped-flow Messpuffer	30
2.9.3	Proteoliposomen.....	31
3.	Methoden.....	33
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	33
3.1.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	33
3.1.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	33
3.1.3	Schnelltransformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	34
3.1.4	<i>E. coli</i> Dauerkulturen	34
3.1.5	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	34
3.1.6	Bestimmung von DNA-Konzentration und Reinheit	34
3.1.7	Restriktionsverdau.....	35
3.1.8	Agarose-Gelelektrophorese	35
3.1.9	Ligation	36
3.1.10	Polymerase-Kettenreaktion	36
3.1.11	DNA Sequenzierung	38
3.1.12	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	39
3.1.13	<i>S. cerevisiae</i> Dauerkultur	39
3.2	Proteinchemische Methoden	40
3.2.1	Isolierung rekombinanter Proteine aus <i>S. cerevisiae</i>	40
3.2.2	Bestimmung der Konzentration von Proteinproben.....	40
3.2.3	Trichloressigsäure Proteinfällung	41
3.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
3.2.5	Western Blot.....	42
3.2.6	Coomassie Färbung	42
3.2.7	Herstellung von Antiseren.....	43
3.2.8	Affinitätsreinigung der Antiseren.....	43
3.3	Zellfreie Proteinsynthese.....	44
3.3.1	S30 Extrakt.....	44
3.3.2	Analytischer Ansatz	45
3.3.3	Präparativer Ansatz	47

3.3.4	Nickel-Affinitätschromatographie	47
3.3.5	Herstellung von Liposomen und Proteoliposomen	48
3.3.6	Dichtegradientenzentrifugation	49
3.3.7	Herstellung von Hefeprotoplasten.....	49
3.4	Funktionsassays.....	50
3.4.1	Lichtstreuungsmessung Stopped-flow	50
4.	Ergebnisse	53
4.1	Expression und Funktionsuntersuchung von PfAQP2 in <i>S. cerevisiae</i>	53
4.1.1	Nachweis der Expression in <i>S. cerevisiae</i>	53
4.1.2	Untersuchung der Leitfähigkeit für Wasser und Glycerol	54
4.1.3	Einfluss der Loops auf die Wasserleitfähigkeit von PfAsQP2	56
4.1.4	Wasserleitfähigkeit der Mutanten F477R und Y454A.....	58
4.1.5	Leitfähigkeit für organische Anionen	59
4.2	Zellfreie Proteinsynthese von PfAQP2	63
4.2.1	Detergenzienscreen	63
4.2.2	Reinigungsdetergenzienscreen	64
4.3	Funktionsuntersuchung von zellfrei hergestelltem PfAQP2	65
4.4	Herstellung spezifischer PfAQP2 Antikörper	69
4.5	Testung der PfAQP2 Antikörper.....	71
5.	Diskussion	77
5.1	Expression und Western-Blot Analyse	77
5.2	Untersuchung der Leitfähigkeit von PfAQP2	79
5.3	Struktur von PfAQP2	80
5.4	Regulierung von PfAQP2.....	84
5.5	Ist PfAQP2 ein Aquaporin?.....	86
6.	Ausblick	91
7.	Zusammenfassung	93
8.	Summary	94
9.	Literaturverzeichnis.....	95
	Eidesstattliche Erklärung.....	109

Abkürzungsverzeichnis

Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
AcP	Lithium-Kalium-Acetylphosphat
AHLW	Adenin Histidin Leucin Tryptophan
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
<i>Aqua bidest.</i>	doppelt destilliertes Wasser
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CTP	Cytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTCS	<i>Dye Terminator Cycle Sequencing</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Dinatriumethylendiamintetraessigsäure
FPKM	<i>Fragments Per Kilobase Million</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Ile	Isoleucin
KBE	Kolonie bildende Einheiten
KHL	Lysin Histidin Leucin
LB	<i>Lysogenic Broth</i>
Leu	Leucin
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
Mg(OAc) ₂	Magnesiumacetat
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
mRNP	<i>messenger</i> Ribonukleotidpartikel
M-TBST	Magermilchpulver Tris gepufferte Salzlösung mit Tween [®]
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-II-Ionen Komplex mit Nitrilotriessigsäure
NIP	<i>Nodulin-26 like Protein</i>

NTPs	Nukleosidtriphosphate
OAPs	<i>orthogonal arrays of particles</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG (8000)	Polyethylenglycol mit M _w 8000
PIP	<i>Plasmamembrane Intrinsic Protein</i>
Psi	<i>pound-force per square inch</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCWMDE	Arginin Cystein Tryptophan Methionin Asparaginsäure Glutamat
S30	Die kleine Untereinheit der prokaryotischen Ribosomen
SD-Medium	<i>Synthetic Defined-Medium</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SIP	<i>Short Intrinsic Protein</i>
T7-RNA	Ribonukleinsäure aus Bakteriophage T7
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIP	<i>Tonoplast Intrinsic Protein</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TTP	Thymidintriphosphat
Tyr	Tyrosin
U min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast-Extract Peptone Dextrose</i>
YTPG-Medium	<i>Yeast-Tryptophan-Peptone-Glucose-Medium</i>

1. Einleitung

Ohne die Entwicklung der Zellmembran wäre Leben wie wir es kennen nicht möglich. Sie stellt die Grenze einer Zelle von jedem bekannten Lebewesen dar. Dabei besteht ihre primäre Funktion darin das Zellinneren von der Umgebung abzugrenzen, um die biochemischen Prozesse im Inneren, durch Erhaltung ganz bestimmter, zellspezifischer Bedingungen, aufrechtzuerhalten. Die Zellmembran selbst besteht aus Phospholipiden, welche eine Barriere für polare und geladene Moleküle und einfache Ionen bildet. Nur sehr kleine und unpolare oder lipophile Substanzen und Gase können relativ ungehindert die Biomembran passieren [1]. Lebewesen sind jedoch zur Aufrechterhaltung eben dieser ganz besonderen Bedingungen darauf angewiesen, Nährstoffe aus der Umgebung aufzunehmen oder auf toxische Veränderungen der Umgebung zu reagieren. Für diese Aufgaben beherbergt die Zellmembran eine riesige Bandbreite von Proteinen, so genannten Membranproteinen, welche etwa ein Drittel aller natürlich vorkommenden Proteine ausmacht [1]. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Rezeptoren, Strukturproteine, verschiedenste Enzyme, sowie Transporter und Kanäle. Transporter und Kanäle sind für die Aufnahme von chemischen Verbindungen, Nährstoffen und Ionen durch die andernfalls unüberwindbare Barriere der Plasmamembran zuständig. Gleichzeitig ermöglichen sie, dass unerwünschte oder giftige Stoffwechselprodukte aus dem Zellinneren entfernt werden können. Transporter und Kanäle unterscheiden sich dabei vor allem in ihrer Funktionsweise. Transporter binden ihr Substrat auf einer Seite der Membran, daraufhin ändert sich ihre Konformation und sie öffnen sich zur gegenüberliegenden Membranseite, wo sie das Substrat entlassen. Spezielle Formen sind hier die Pumpen, welche unter energieverbrauch in der Lage sind Moleküle entgegen chemischer oder elektrischer Gradienten zu transportieren. Kanäle hingegen bilden Membran durchspannende Tunnel, die in ihrer Mitte vor allem Seitenketten polarer Aminosäuren aufweisen. Dabei unterscheiden sich die Kanäle deutlich in ihrer Form und lassen immer nur bestimmte Ionen oder Moleküle passieren. Viele Kanäle befinden sich zunächst in einem geschlossenen Zustand und öffnen sich, sobald ein entsprechender Reiz wie eine Änderung im Membranpotenzial auftritt oder ein Ligand bindet. Die Passage des Kanals selbst geschieht danach durch Diffusion. Somit ermöglichen es spezielle Wasserkanäle bei Schwankungen in der Osmolarität der Umgebung, das Wasser sehr schnell aus der Zelle strömen kann und somit die Zelle vor Schäden geschützt wird. Neben der reinen Funktion als Kanal wurde für diese Familie von Wasserkanälen, Aquaporine genannt, mittlerweile eine große Anzahl weiterer Substrate identifiziert, sowie ihre Beteiligung an einer Vielzahl von anderen Vorgängen zum Beispiel bei der Zell-Zell-Adhäsion und Kommunikation ausgemacht [2]. Weltweit sind humanpathogene Parasiten z.B. die Erreger der Malaria, mit

Hunderttausenden von Todesopfern eine bedeutende Bedrohung für die menschliche Gesundheit. Sie zeichnen sich durch eine einzigartige Organelle aus, die als apikaler Komplex bezeichnet wird und für die sie Apicomplexa genannt werden [3]. Apicomplexa sind einzellige Parasiten, die oftmals in spezifischen Zellen oder im Blut des Wirtsorganismus leben. Der Zellmembran wird hier die wichtige Aufgabe als Schnittstelle, zwischen dem Parasiten und seinem Wirt zuteil. An der Schnittstelle sind Membranproteine ein besonders vielversprechendes Ziel bei der Krankheitsbekämpfung. Diese Proteine sind stark für den parasitären Lebensstil optimiert und erfüllen lebenswichtige Funktionen für den Organismus. Dazu gehören auch die Membranproteine der Aquaporine. Die geringe Anzahl der exponierten Proteine ist ein genereller Mechanismus, mit dem die Erreger versuchen dem Immunsystem des Wirts aus dem Weg zu gehen. Die Aquaporine sind zwar nicht lebensnotwendig, jedoch helfen sie dem Parasiten, mit osmotischem Stress im Wirt und während der Übertragung fertig zu werden. Außerdem erfüllen sie eine unerlässliche Rolle im Nährstoffe Transport, wodurch sie zu wertvollen *drug-targets* werden [3, 4].

1.1 Malaria

Malaria ist die häufigste Infektionskrankheit weltweit mit ungefähr 219 Millionen infizierten Menschen im Jahr 2017. Sie tritt vor allem in den tropischen und subtropischen Regionen Afrikas (92 %), Süd-Ost Asien (5%) und im Mittleren Osten auf (2%) [5]. Aber auch, nicht zuletzt durch die Erwärmung des Klimas, in den gemäßigten Breiten. Es gibt insgesamt fünf Erreger der Gattung *Plasmodium*, die für die Infektionen beim Menschen verantwortlich sind: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* und *P. knowlesi*. In Afrika ist *P. falciparum* für 99,7 % der Infektionen verantwortlich. *P. vivax* spielt vor allem in Gegenden wie Mitteleuropa und Nordamerika eine immer größer werdende Rolle und verursacht hier 74,1% aller Malariafälle [5]. Die Übertragung findet bei der Malaria nicht von Mensch zu Mensch statt, sondern über einen externen Vektor. Dabei handelt es sich um weibliche Stechmücken der Gattung *Anopheles*.

Die von *P. falciparum* ausgelöste Malaria tropica ist die schwerwiegendste Form. Im Jahr 2017 starben 451.000 Menschen an den Folgen von Malaria. Gerade für Kinder unter 5 Jahren ist eine Infektion lebensgefährlich, da sie die schwerwiegenden Komplikationen, wie Anämie, Hypoglykämie, starkes Fieber und Ohnmachtszustände bis hin zum Koma, kaum überwinden. Sie machen 62 % aller Malariabedingten Todesfälle aus [5]. Aber auch die in den betroffenen Gebieten von Afrika und Süd Amerika unzureichende medizinische Versorgung und die immer stärker zunehmende Resistenzentwicklung gegen antimalarische Medikamente spielen eine entscheidende Rolle.

1.1.1 Lebenszyklus von *Plasmodium* sp.

Weibliche Stechmücken der Gattung *Anopheles* sind vor der Ablage ihrer Eier darauf angewiesen große Mengen von Nährstoffen durch eine Blutmahlzeit zu sich zu nehmen. Ein mit Plasmodien infiziertes Weibchen überträgt dabei die in ihrer Speicheldrüse enthaltenen Sporozoiten auf den Menschen (Abbildung 1, A). Über das Blut gelangen die Sporozoiten in die Leber und infizieren dort Hepatozyten. In diesem Leberstadium beginnt die erste asexuelle Vermehrung im menschlichen Körper (Abbildung 1, B). Durch Bildung von Leber-Schizonten aus den Hepatozyten, platzen diese nach etwa einer Woche, wobei jeder bis zu 30.000 Merozoiten in die Blutbahn entlässt. Die Merozoiten dringen im Blut in die dort reichlich vorhandenen Erythrozyten ein. Im Folgenden, zweiten asexuellen Vermehrungszyklus nutzt der Parasit die nährstoffreiche Umgebung aus, um sich sehr schnell zu vermehren (Abbildung 1, C). Dabei rekrutiert der Parasit Membranproteine des Erythrozyten, um große Mengen an Nährstoffen ins Zellinnere zu bringen [6]. Je nach Form der Malaria dauert der Vermehrungszyklus 24 bis 72 Stunden, wobei am Ende die befallenen Erythrozyten platzen

und die freigesetzten Merozoiten erneut Erythrozyten infizieren. In diesem Blutstadium vermehrt sich der Parasit mit jedem Zyklus um das 6 bis 20-fache [7]. Sobald sich im Blut etwa 100 Millionen Parasiten befinden, kann in einem Blutausschlag unter dem Mikroskop oder mit Hilfe eines Schnelltestes eine Malariaerkrankung diagnostiziert werden. Zu diesem Zeitpunkt treten auch die Symptome und Beschwerden auf. Ein Teil der Parasiten differenziert sich währenddessen zu Gametozyten.

Durch eine Blutmahlzeit durch eine Anopheles Mücke gelangen die Parasiten, die sich im Blut befinden in den Verdauungstrakt des Moskitos (Abbildung 1, D). Unter diesen harschen Bedingungen überleben lediglich die geschlechtsreifen Gametozyten des Parasiten. Diese Formen eine Ookinete, welche in der Lage ist, die Epithelzellen des Verdauungstraktes zu durchdringen. Dort differenziert sie sich dann zu einer Oozyste und beginnt mit der eigentlichen geschlechtlichen Vermehrung. Dabei entstehen aus einer Oozyste bis zu 10^4 Sporozoiten, welche über die Lymphe in die Speicheldrüsen der Stechmücke wandern. Diese können wiederum bei einem Stich einen Menschen infizieren.

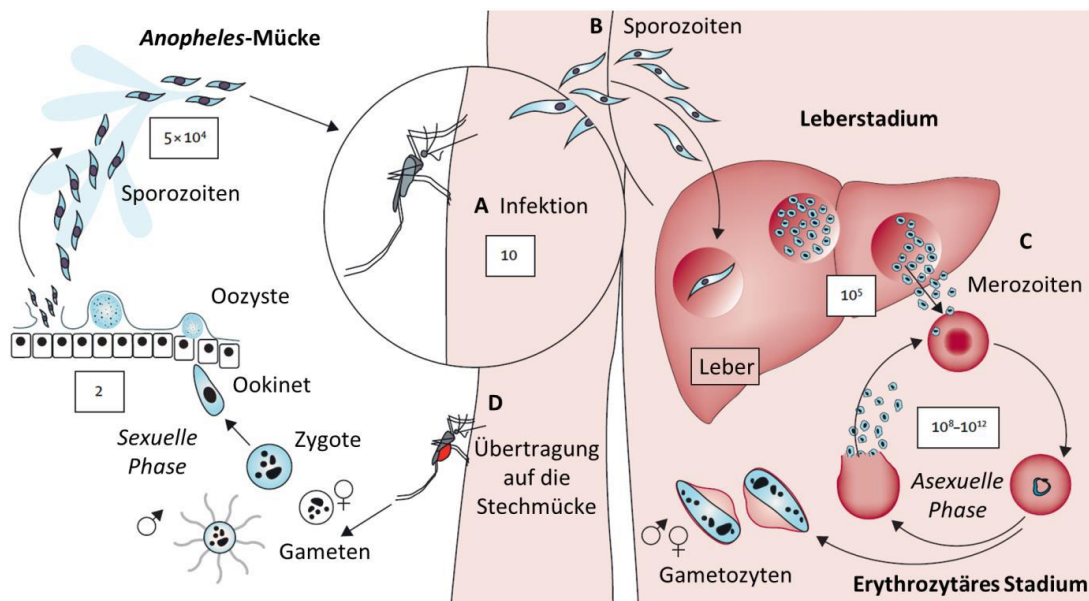


Abbildung 1: Der geschlechtliche und ungeschlechtliche Vermehrungszyklus von *P. falciparum*: Der Zyklus beginnt mit der Infektion des menschlichen Wirts durch einen Moskitostich, bei dem Sporozoiten ins Blut gelangen (A, vergrößert). Diese gelangen in die Leber (B), wo jeder Sporozoit einen Hepatozyten infiziert und sich vermehrt. Nach einer Woche platzen die Zellen und setzen tausende Merozoiten ins Blut frei. Dort infizieren sie die roten Blutzellen und fangen mit der asexuellen Vermehrung an (C). Einige Parasiten entwickeln sich zu Geschlechtszellen (Gametozyten) und können bei einem erneuten Moskitostich in den Moskito gelangen (D). Im Verdauungstrakt des Insekts findet die geschlechtliche Vermehrung statt. Aus männlichen und weiblichen Gametozyten bildet sich eine Ookinete, die die Epithelzellen durchdringt und dort als Oozyste mit der Sporozoitenproduktion beginnt. Diese wandern in die Speicheldrüsen, wo sie bei der nächsten Blutmahlzeit wieder einen Menschen infizieren können. Der Zyklus dauert je nach Parasitenart bis zu 30 Tagen. In den Kästen stehen geschätzte Parasitenzahlen. Modifiziert durch Dr. André Golldack nach [8].

Einleitung

Die Malariasymptome treten während des erythrozytären Stadiums auf und werden durch die asexuelle Vermehrung der Parasiten hervorgerufen. Die starken Fieberschübe gehen dabei auf das Platzen der Erythrozyten und die dadurch bedingte Freisetzung von Toxinen zusammen mit den Merozoiten zurück. Der Körper reagiert mit dem Ausschütten von Chemokinen, welche zum einen für das Fieber sorgen, aber auch durch eine Hemmung der Erythropoese eine Anämie vorantreiben. Die Parasiten verbrauchen in diesem Lebenszyklus große Mengen der Glukose im Blut, wodurch in Kombination mit der blutzuckersenkenden Wirkung der Chemokine eine Hypoglykämie mit Schwindel und Ohnmacht hervorgerufen werden kann. Dies geschieht je nach Parasitenart mehr oder weniger synchronisiert in Intervallen von 1 bis 4 Tagen. Die *Malaria tropica*, ausgelöst von *P. falciparum* hat die Besonderheit, dass befallene Erythrozyten das Antigen PfEMP1 präsentieren, mit dem es zu einer Anlagerung der Erythrozyten an Gefäßwände kommt [9]. Dadurch kann es zur lokalen Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen kommen, was im Bereich des Gehirns (cerebrale Malaria), insbesondere bei Kindern, häufig tödlich endet.

Gerade wegen der starken Resistenzentwicklung gegenüber den bisherigen Chemotherapeutika, ist die Suche nach neuen *drug-targets* aktueller denn je. Aquaporine stellen dabei vielversprechende Optionen da, weil sie lebenswichtige Aufgaben, wie Osmoregulation und Nährstofftransport, erfüllen und somit bei einer Beeinflussung durch Chemotherapeutika zu einer deutlichen Beeinträchtigung des Parasiten führen können [4].

1.2 Aquaporine

Aquaporine (AQPs) sind Transmembranproteine, die in fast allen bekannten Lebewesen vorkommen [10]. Der Name Aquaporin leitet sich von dem lateinischen *aqua* für Wasser und altgriechischen *póros* für Durchgang ab. Der Name etablierte sich nachdem Anfang der 1990er Jahre das erste Protein dieser Art durch die Arbeitsgruppe von Peter Agre funktionell charakterisiert wurde [11]. Aquaporine bilden eine eigene Familie, die auch *Major Intrinsic Proteins* (MIP) genannt werden, von denen mittlerweile 1507 Proteine aus 481 verschiedenen Organismen, deren Genom vollständig sequenziert ist, identifiziert wurden [12]. Es werden mittlerweile drei Typen unterschieden: orthodoxe Aquaporine, Aquaglyceroporine und „*super-gene channel*“ Aquaporine [2, 13]. Der Name „*super-gene channel*“ klingt allerdings sehr nach besonders guter Leitfähigkeit, weswegen in dieser Arbeit die Bezeichnung unorthodoxe Aquaporine verwendet wird. Die Unterscheidung der einzelnen Klassen erfolgt anhand charakteristischer Merkmale der Aminosäuresequenz im Zusammenhang mit hoch konservierten Motiven und der dadurch bedingten Funktion.

Einzellige Organismen wie Bakterien besitzen nur eine geringe Anzahl von Aquaporinen und in thermophilen Archaeen kommen sie praktisch gar nicht vor. Dies liegt vermutlich daran, dass die Diffusion von Wasser durch die Membran aufgrund der hohen Temperaturen deutlich erhöht ist und sie deshalb nicht benötigt werden. Prokaryotische Einzeller wie *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* besitzen zwei Aquaporine. Eukaryotische Einzeller wie *Trypanosoma brucei* und *Saccharomyces cerevisiae* besitzen drei [14] bzw. vier Aquaporine [2]. Vielzellige, höhere Organismen besitzen eine vielfältigere und größere Anzahl an Aquaporinen. So sind im Menschen bisher 13 Aquaporine bekannt, ebenso wie in der Ratte, die sich strukturell und funktionell sehr ähnlich sind, jedoch Unterschiede im Expressionsmuster aufweisen. Einige Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* verfügen sogar über 38 verschiedene Aquaporine [15].

1.2.1 Struktur der Aquaporine

Generell sind Aquaporine aus sechs transmembranären α -Helices (I-VI Abbildung 2), welche die Plasmamembran durchziehen, aufgebaut. Diese sind über drei extrazelluläre und zwei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden (Abbildung 2). Die N- und C-termini befinden sich beide auf der intrazellulären Seite der Membran. Durch eintauchen kurzer Abschnitte der Loops B und E entstehen zwei weitere halb-Helices, an deren Enden sich die für Aquaporine zwei typischen Aminosäure-Abfolgen aus Asparagin-Prolin-Alanin (NPA) befinden [16]. In der Membran sind die Transmembranspannen so platziert, dass die beiden NPA-Motive übereinanderstehen und die beiden halb-Helices eine weitere Transmembranspanne bilden (Abbildung 3).

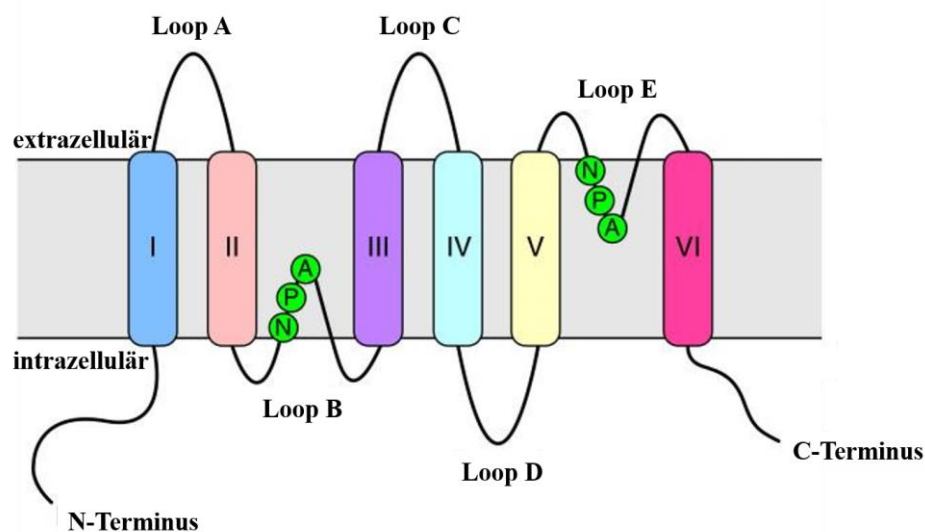


Abbildung 2: 2D Topologie eines Aquaporins. Zu sehen sind die Sechs Transmembranspannen I-VI und die beiden Halb-Helices. Modifiziert nach [17]

Einleitung

Die beiden NPA-Motive bilden dabei eine elektrostatische Barriere für Kationen innerhalb der Pore, um die Passage von Ionen zu verhindern. Dieser Ausschlussmechanismus allein reicht jedoch nicht, um die Passage von Protonen zu verhindern. Dazu befindet sich oberhalb der Pore eine Engstelle, bestehend aus einem Arginin, das von aromatischen Aminosäuren umgeben ist, der sogenannte aromatische Arginin Region (ar/R) [18]. Nur wenn beide Barrieren intakt sind, kann ein vollständiger Ausschluss positiver Ladung erfolgen [19, 20].

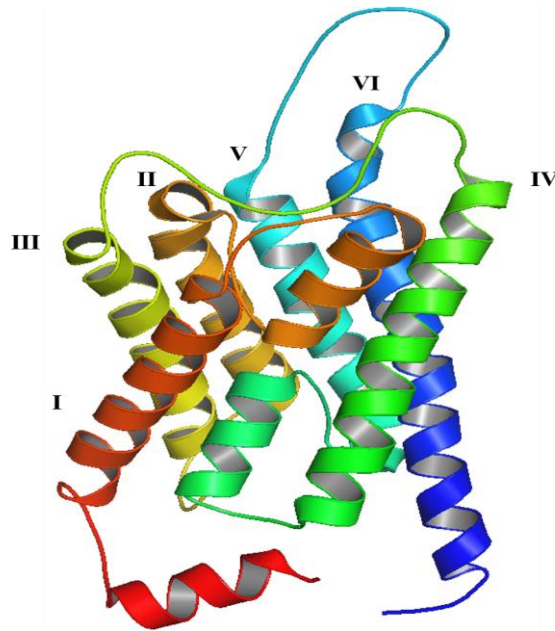


Abbildung 3: Gefaltetes humanes Aquaporin 1 (PDB 1j4n); I bis VI kennzeichnen die 6 Membranhelices, mittig in dunkel Grün (unten) und Orange (oben) sind die beiden Halbhelices zu sehen. Erstellt mit PyMol.

Gleichzeitig erfüllt die ar/R auch eine wichtige Rolle als Selektivitätsfilter. Hierbei spielt vor allem der Durchmesser der Engstelle eine entscheidende Rolle. Orthodoxe Aquaporine besitzen einen Durchmesser von ungefähr $2,8 \text{ \AA}$ [21], was dem Durchmesser eines Wassermoleküls entspricht. Aquaglyceroporine besitzen einen Durchmesser von etwa $3,5 \text{ \AA}$ [22] wodurch auch größere Moleküle wie Glycerol passieren können.

Es existieren bereits eine Vielzahl verschiedener Kristallstrukturen. Dazu gehören die bakteriellen AQPZ [23, 24] und GlpF [22, 25] aus *E. coli*, sowie AQPM [26] aus der Archaea *Methanothermobacter marburgensis*, das Hefe Aqy1 [27] aus *Pichia pastoris*, das pflanzliche SoPIP2;1 [28] aus dem Spinat, Schaf AQP0 [29, 30] und Rinder AQP0 [31] und AQP1 [21], sowie die menschlichen AQP1 [16], AQP2 [32, 33], AQP4 [34], AQP5 [35] und AQP10 [36]. Außerdem wurde das AQP4 aus der Ratte [37, 38] und das PfAQP1 [39, 40] aus dem einzelligen Parasiten *Plasmodium falciparum* kristallisiert.

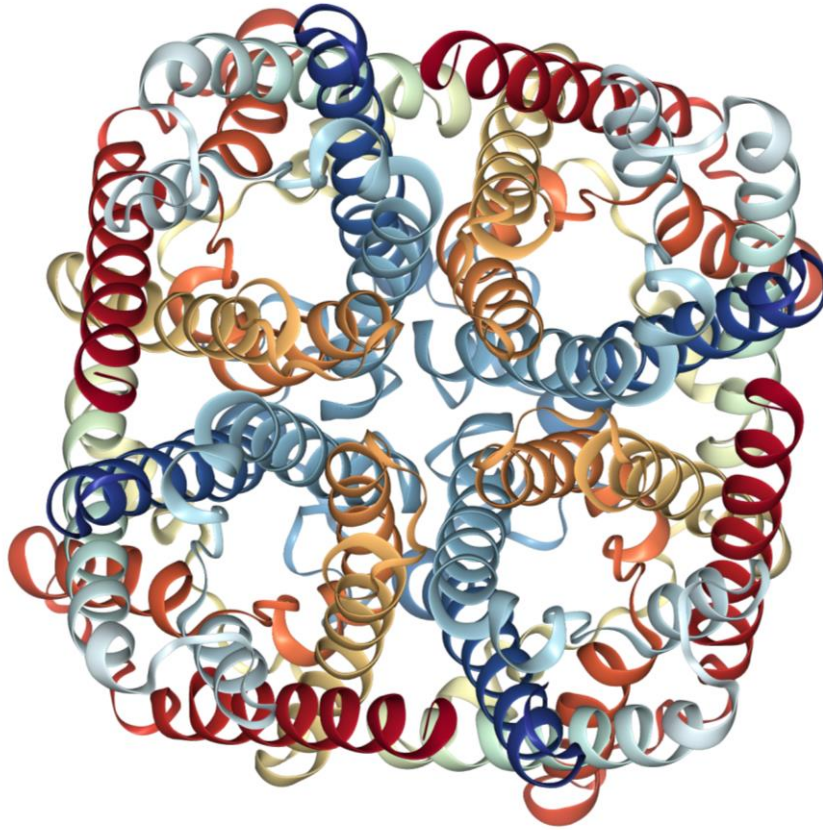


Abbildung 4: Aufsicht auf das Homotetramer von AQPM aus *Methanothermobacter marburgensis* (PDB 2evu)

Die intramolekulare Sequenzähnlichkeit innerhalb der Proteinfamilie ist insgesamt sehr groß, weshalb angenommen wird, dass die ersten Aquaporine durch Genduplikation eines halben Aquaporin-Gens entstanden sind [41]. Aus Röntgenkristallstrukturen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist außerdem bekannt, dass alle Aquaporine in ihrer Quartärstruktur Tetramere bilden (Abbildung 4). Jedes der 25 bis 35 kDa großen Monomer behält dabei seine eigene Pore, wodurch ihre Leitfähigkeit erhalten bleibt [19, 27, 42]. In der Mitte des Tetramers entsteht eine zentrale Pore, die nicht an der Leitfähigkeit für Wasser beteiligt ist. In einigen Aquaporinen wurde ein erleichterter Gasaustausch mit der Umgebung beobachtet, der dieser Pore zugeschrieben wird [43, 44]. In ihrer Tertiärstruktur unterscheiden sich Aquaglyceroporine von orthodoxen Aquaporinen nur wenig. Jedoch befindet sich bei Aquaglyceroporinen hinter dem C-terminal gelegenen, zweiten NPA-Motiv ein konservierter Asparaginsäure-Rest (D), welcher in orthodoxen Aquaporinen nicht vorkommt. Durch ihn wird der Durchmesser der Pore erweitert und größere Moleküle wie Glycerol können den Kanal passieren [45]. Die Sequenz ISG(G/A)H direkt vor dem ersten NPA-Motiv ist innerhalb der orthodoxen Aquaporine und Aquaglyceroporine hingegen stark konserviert. Die dritte Klasse der unorthodoxen Aquaporine ist hier auffällig, da diese Sequenz nicht konserviert und auch unter ihren Vertretern sehr uneinheitlich ist. Von diesen Aquaporinen existieren bisher keine

Einleitung

Kristallstrukturen und da sie eine sehr geringe Ähnlichkeit von teilweise nur 20 % zu anderen Aquaporinen aufweisen, sind genaue Aussagen zur Struktur schwierig. Auffällig ist jedoch der hoch konservierte Cystein-Rest einige Aminosäuren hinter dem zweiten NPA (NPAxxxxxxxxC). Anhand von Untersuchungen an humanem und murinem AQP11 konnte gezeigt werden, dass dieser Rest essenziell für die Funktion dieser Aquaporine ist, da Mutanten, die kein Cystein an dieser Stelle aufweisen im Mausmodell ein polyzystisches Nierenversagen hervorriefen. Den gleichen Phänotyp zeigen auch AQP11 *Knock-out*-Mäuse [46]. Für die unorthodoxen Aquaporine konnte zudem nachgewiesen werden, dass diese intrazellulär lokalisiert sind und nicht in die Plasmamembran eingebaut werden [47, 48]. Strukturell sind diese Aquaporine jedoch bisher wenig untersucht und aufgrund der geringen Ähnlichkeit ist es schwierig zuverlässige Modelle zu erstellen.

Mit Voranschreiten vieler Genomsequenzierungen wurden auch viele Aquaporin-ähnliche Sequenzen gefunden, die nicht über die sonst hoch konservierten NPA-Motive verfügen [49-51]. Dies hat zu der Zuordnung vieler pflanzlicher Membrankanäle zu den Aquaporinen, die sich von denen des Tierreichs deutlich unterscheiden, geführt. *Arabidopsis thaliana* verfügt über 38 Aquaporine, die in vier Gruppen unterteilt werden: *Short Intrinsic Protein* (SIP), *Nodulin-26 like Protein* (NIP), *Plasmamembrane Intrinsic Protein* (PIP) und *Tonoplast Intrinsic Protein* (TIP) [2]. Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit mit orthodoxen Aquaporinen vor dem ersten NPA-Motiv und dem Fehlen des für Aquaglyceroporine typischen Asparaginsäure-Restes werden sie als orthodoxe Aquaporine eingeordnet.

1.2.2 Funktion von Aquaporinen

Die Ergebnisse vieler Studien zeigen, dass die Hauptfunktion der orthodoxen Aquaporine darin besteht, Wasser die Passage durch eine Membran zu ermöglichen. AQP2 defiziente Mäusen und Menschen leiden an einem Diabetes insipidus und ein Mangel an AQP5 verringert die Speichelsekretion bei Mäusen [52]. Aquaporine sind außerdem an der Zellmigration beteiligt [53–55]. Unter den orthodoxen Aquaporinen gibt es jedoch auch Vertreter, die nicht nur für Wasser permeabel sind. So wurde *in-vitro* für das orthodoxe Aquaporin AQP6 eine Nitrit- und Chloridleitfähigkeit und eine geringe Nitratleitfähigkeit gezeigt [56]. AQP8, sowie die TIPs in Pflanzen sind zusätzlich durchlässig für Ammonium und Wasserstoffperoxid [57, 58] obwohl diese ebenfalls zu den orthodoxen Aquaporinen gehören.

Aquaglyceroporine haben die Hauptaufgabe, die Aufnahme von Glycerol in die Zelle zu ermöglichen, wobei abhängig vom Protein entweder Wasser und Glycerol geleitet werden können oder nur Glycerol. So nimmt der humanpathogene Parasit *P. falciparum* in einem intraerythrozytären Stadium große Mengen Glycerol über PfAQP1 aus seiner Umgebung für

die Lipidsynthese auf [59]. Bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* liegt der Fall genau anders. Hier sorgt das Aquaglyceroporin Fps1p für eine Osmoregulation, indem es intrazelluläres Glycerol herauslässt und somit eine Verringerung des Turgors bewirkt. Hierbei kommt zudem eine weitere Eigenschaft von Aquaporinen zum Tragen. Fps1 verfügt über einen Mechanismus zur Steuerung der Durchlässigkeit für Glycerol [60]. Dabei kommt es zu einer Interaktion von einem Peptid in dem ungewöhnlich langen N-Terminus von Fps1 und der Transmembranspanne 6 [61]. Insgesamt sind einige solcher *gating* oder *trafficking* Mechanismen für Aquaporine beschrieben [62]. Das bekannteste und am besten untersuchte Beispiel für *trafficking* bei Aquaporinen ist sicher AQP2 in den Zellen des Sammelrohrs der Nieren. Dabei wird durch das Hormon Vasopressin ein Einbau von AQP2 bestückten Vesikel in die apikale Membran der Zellen induziert und dadurch eine Steigerung der Wasseraufnahme in die Zellen bewirkt [63–65]. Außerdem sind bei Eukaryoten häufig Phosphorylierungen [66], pH-Unterschiede [67–69], zweiwertige Kationen [66–68, 70, 71], Protein-Protein-Interaktionen [72] und die Osmolarität von Zellen und ihrer Umgebung [60, 73] an der Regulierung beteiligt. In Pflanzen kommen keine Aquaglyceroporine vor. Hier übernehmen die *Nodulin-26 like Proteins* (NIPs) den Glyceroltransport, welche wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer von Bakterien auf die Pflanzen übertragen wurden. Diese sind außerdem für Borat und Silikat durchlässig [74, 75]. Der Prototyp der Aquaglyceroporine ist der Glycerolkanal GlpF aus *E. coli* ist nur sehr schlecht für Wasser durchlässig. Auch wenn für den Wassertransport bessere Alternativen vorhanden sind, ist dieser bei Aquaglyceroporinen physiologisch nicht irrelevant [52, 76]. Interessant ist auch, dass einige Aquaglyceroporine für Metalloide wie Antimonat und Arsenat durchlässig sind [77]. Humanes AQP9 ist sogar für noch größere Solute wie Purine, Carbamide aber auch protonierte Monocarboxylate durchlässig [78, 79].

Unorthodoxe Aquaporine waren anfangs durch die atypische Aminosäuresequenz und die in *Xenopus* Oozyten fehlende Wasser- und Glycerolleitfähigkeit [80, 81] als Mitglieder der Aquaporinfamilie umstritten. Jedoch konnte mit in Liposomen rekonstituiertem humanem AQP11 eine Wasserleitfähigkeit festgestellt werden, die vergleichbar mit AQP1 ist [82].

Über die zu erwartende Funktion als Kanal und die Permeation von kleinen geladenen Molekülen hinaus, spielen viele Aquaporine durch ihre Lokalisation an der Zelloberfläche auch eine Rolle in vielen anderen physiologischen Prozessen. Diese sind häufig mit Autoimmunerkrankungen assoziiert oder spielen eine Rolle in der Signalübermittlung [83–85]. Zudem gibt es immer mehr Hinweise, dass Aquaporine auch an allgemeiner Strukturgebung von Zellen beteiligt sind. So wird AQP0 vorwiegend in der Linse des Auges exprimiert, wo es

Einleitung

neben der allgemeinen Funktion als Wasserkanal auch an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt ist [86–88].

1.3 *Plasmodium falciparum* Aquaporine

1.3.1 Aquaporin 1

Bis vor einigen Jahren war es Stand der Forschung, dass *Plasmodium falciparum* über ein einziges Aquaporin (PfAQP), genauer ein Aquaglyceroporin, verfügt. Dies passt auch zu der allgemeinen Annahme, dass diese Art von Parasiten eine möglichst kleine Anzahl potenzieller Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren [89].

PfAQP ist aus sechs Transmembranspannen und zwei halb-Helices aufgebaut (Abbildung 5). Die beiden NPA-Motive sind zu einem NLA im N-terminalen Teil und einem NPS im C-terminalen Teil mutiert. Die Funktion ist hierdurch jedoch nicht beeinträchtigt. Es bildet eine typische Pore, mit den beiden Engstellen aus ar/R Selektivitätsfilter und NLA/NPS ([40]). Direkt hinter dem Arginin der ar/R-Region befindet sich das für Aquaglyceroporine charakteristische Aspartat (D).

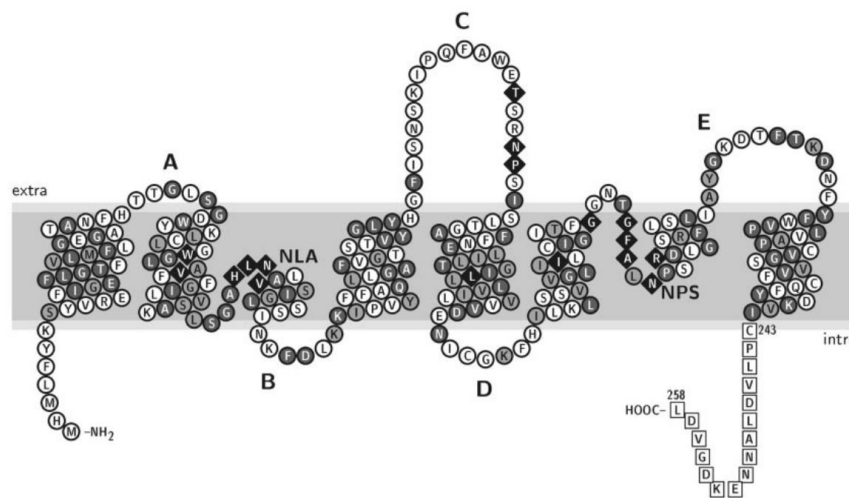


Abbildung 5: Topologieplot der Primärsequenz von PfAQP. Dunkel graue Aminosäuren sind im Vergleich zum Prototyp der Aquaglyceroporine, GlpF, konserviert. Die hell grauen sind zum GlpF ähnlich. Schwarze Rauten zeigen Aminosäuren, die bei GlpF direkt mit Glycerol wechselwirken. Die Topologie wurde mit dem TeXtopo Paket für LaTeX erstellt [90].

PfAQP besitzt ausgezeichnete Wasserleitfähigkeit und eine gute Glycerolleitfähigkeit [91]. Außerdem konnte eine Leitfähigkeit für weitere Zuckeralkohole bis zu einer Kettenlänge von 5 Kohlenstoffatomen, sowie für Harnstoff nachgewiesen werden. Die Leitfähigkeit nimmt dabei mit steigender Kettenlänge ab [91]. Sorbitol, ein Zuckeralkohol mit einer Länge von 6 Kohlenstoffatomen, kann zwar noch in die Pore eindringen, diese jedoch nicht passieren. Dadurch kommt es zu einer Hemmung jeglicher Leitfähigkeit [92].

Für den Parasiten nimmt PfAQP eine zentrale Rolle als bi-funktionales Aquaglyceroporin ein. In seinem Lebenszyklus passiert der Parasit mehrmals mit dem Blut die Niere, wo harsche osmotische Bedingungen vorherrschen, vor denen ihn das Aquaporin schützt. Im intraerythrozytären Stadium findet eine sehr schnelle Vermehrung statt. Dadurch wird innerhalb kurzer Zeit eine große Menge an Lipiden *de-novo* synthetisiert wofür Glycerol und andere Substrate benötigt werden [93]. Diese stehen dem Parasiten in seiner Umgebung, dem Blut, in großer Konzentration zur Verfügung [59]. Eine weitere Wichtige Funktion erfüllt die Leitfähigkeit von PfAQP für Ammoniak. Ammoniak entsteht während der Vermehrung im Erythrozyten durch Abbau von Aminosäuren und würde innerhalb kürzester Zeit zum Tod des Parasiten führen. Durch die Pore von PfAQP kann Ammoniak nach außen passieren, wo es im saureren pH protoniert wird und so der Efflux-Gradienten aufrechterhalten wird [94].

Durch einen *Knock-out* von *Plasmodium berghei* AQP konnte beobachtet werden, dass PbAQP-null-Parasiten ein deutlich langsames erythrozytäres Wachstum zeigen, wodurch infizierte Mäuse länger überleben [95]. Zusätzlich konnte eine Verzögerung der Differenzierung vom Leber- zum Blutstadium bei PfAQP-null-Parasiten beobachtet werden [96]. Dies unterstreicht die wichtige Rolle die PfAQP im Stoffwechsel des Parasiten.

1.3.2 Aquaporin 2

Im Genom des Erregers der Malaria tropica, *Plasmodium falciparum*, befindet sich seit einiger Zeit eine automatisch annotierte Proteinsequenz (PF3D7_0810400), die für ein weiteres, putatives Aquaporin, demnach PfAQP2, kodiert [97]. Die Aminosäuresequenz ist mit 603 Aminosäure ungewöhnlich lang für ein Aquaporin. Daraus ergibt sich eine molekulare Masse von etwas über 71 kDa, wodurch es im Vergleich zu den 30 kDa anderer Aquaporine sehr groß ist. Die vorhergesagte Topologie von PfAQP2 spiegelt im Kern die Merkmale eines Aquaporins wieder. 6 Transmembranspannen, 2 Halbhelices die mit 5 Schleifen verbunden sind und beide Termini auf der intrazellulären Seite der Membran. Eine Transmembranspanne braucht im Durchschnitt 26 Aminosäuren, um die Plasmamembran zu durchziehen [98]. Bei einem sehr großen Protein wie PfAQP2 ergeben sich deshalb die in Abbildung 6 zu sehenden untypisch großen Schleifen A und D, sowie verhältnismäßig lange Termini. Bei genauerer Betrachtung der Aminosäuresequenzen N- und C-terminal der NPA-Motive ist bei PfAQP2 ein konserviertes NPA und ein verändertes NPM-Motiv zu sehen. Vor dem N-terminalen NPA befindet sich eine Abfolge von LLGAH die bis auf ein Serin und ein Isoleucin, welche beide durch Leucin ersetzt sind, sehr ähnlich zu ISG(G/A)H der orthodoxen Aquaporine ist. Des

Einleitung

Weiteren befindet sich vor dem NPM kein Cystein, welches humanes Aquaporin 1 empfindlich für Quecksilber macht [99].

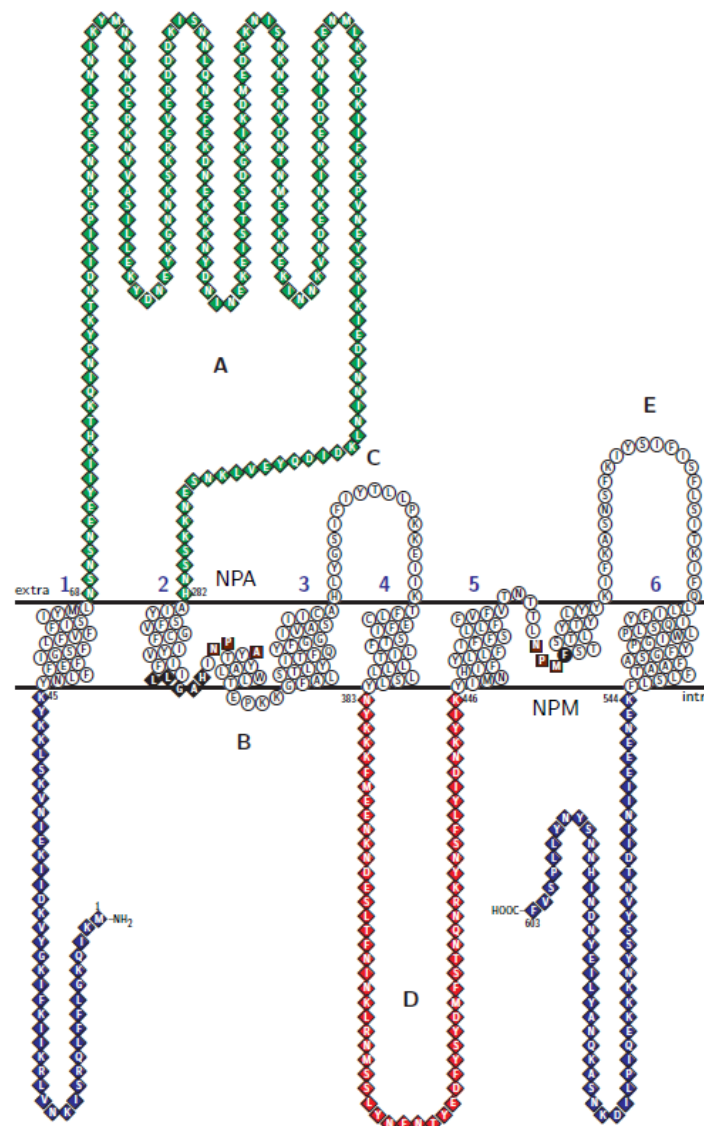


Abbildung 6: Putativer Topologieplot von PfAQP2. Die 6 Transmembranspannen sind mit 1-6 gekennzeichnet, die Loops mit den Buchstaben A bis E. Die Charakteristischen NPA-Motive sind in rotbraun dargestellt. Farblich hervorgehoben sind die auffälligen Loops A (grün) und D (rot), sowie die beiden langen Termini (blau). Schwarze Rauten kennzeichnen in orthodoxen Aquaporinen konservierte Aminosäuren, die bei PfAQP2 ähnlich sind. Das untypische Phenylalanin an Stelle des konservierten Arginins des Selektivitätsfilters ist mit einem schwarzen Kreis markiert. Erstellt auf Grundlage der Primärstruktur von PfAQP2 mit Hilfe des TeXtopo Pakets für LaTeX [90].

Das bei orthodoxen und Aquaglyceroporinen hoch konservierte Arginin der Filterregion ist bei PfAQP2 durch ein großes, aromatisches Phenylalanin ausgetauscht, wodurch zum einen die Lipophilie des Poreneingangs stark erhöht wird, zum anderen, durch den Wegfall der positiven Ladung, eine wichtige Funktion als Barriere für Protonen nicht mehr besteht. Unorthodoxe

Aquaporine wie die humanen AQP11 und 12 verfügen ebenfalls über kein Arginin dafür verfügen sie über ein kleineres, Leucin. Das konservierte Cystein in Richtung C-Terminus findet sich im PfAQP2 allerdings nicht.

Beim Vergleich mit anderen typischen und untypischen Vertretern der Aquaporine weist PfAQP2 eine Sequenzähnlichkeit von nur 10 bis 20 % auf. Dadurch wird es ähnlich schwierig wie bei AQP11 und 12 verlässliche 3D Strukturmodelle zu erstellen. Zur Funktion von PfAQP2 gibt es bisher keine Daten. Allerdings deuten Transkriptom-Untersuchungen darauf hin, dass das Gen PfAQP2 vor allem von geschlechtsreifen Gametozyten (Gametozyten V Abbildung 7) vor der Aufnahme in den Moskito verstärkt abgelesen wird.

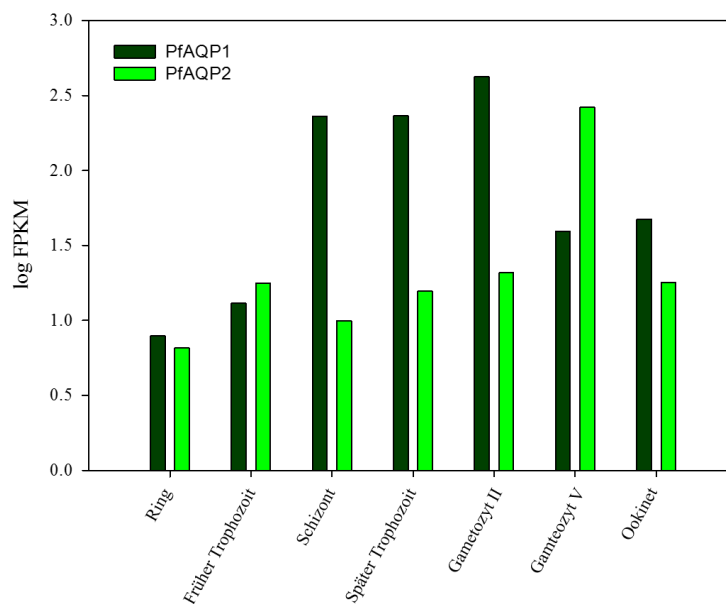


Abbildung 7: log FPKM (*Fragments Per Kilobase Million*) Werte für PfAQP1 und PfAQP2 [100]. Sieben bidirektionale Bibliotheken aus Ring-, frühem und späterem Trophozoiten, Schizont, Gametozyten II, Gametozyten V und Ookineten wurden mit Lumineszenz-Methoden sequenziert.

Strukturell weist PfAQP2 die Kernmerkmale eines Aquaporins auf. Bei der vorläufigen Einordnung fällt jedoch auf, dass es zu einer Ähnlichkeit mit orthodoxen Aquaporinen hinsichtlich der ersten NPA-Box und der vermutlich engen Porenregion, deren Eingang durch große Aminosäuren gekennzeichnet ist, zeigt. Zum anderen ähnelt die zweite NPA- (hier NPM) Box eher den unorthodoxen Aquaporinen hinsichtlich des fehlenden Arginins der Filterregion, jedoch fehlt das hoch konservierte Cystein. In Kombination mit der auffälligen Topologie steht die Frage, welche Funktion die auffälligen Loops A und D haben. Besonders vor dem physiologischen Hintergrund der parasitischen Lebensweise von Plasmodien, der Verfügbarkeit eines bifunktionellen Aquaglyceroporins, dem PfAQP1, welches Wasser und Glycerol leitet und nicht zu Letzt, der verstärkten Transkription in den geschlechtsreifen Gametozyten.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Anwesenheit eines zweiten möglichen Aquaporins stellt die wichtige Rolle von PfAQP1 im Stoffwechsel in Frage. Viele typische Aufgaben von Aquaporinen wie Wasser, Glycerol und Ammoniaktransport sind durch PfAQP1 bereits abgedeckt. Durch einen PfAQP1 *Knock-out* wurde ein langsames Wachstum von *P. falciparum*, jedoch kein Absterben des Parasiten festgestellt.

Ziel der Arbeit war die Expression und funktionelle Charakterisierung des putativen *Plasmodium falciparum* Aquaporin 2. Mit Hilfe von *Saccharomyces cerevisiae* als auch durch das *Continuous Exchange Cellfree System* (CECF) sollte überprüft werden, ob es sich um ein Aquaporin handelt und ob es die Funktionen von PfAQP1 im *knock-out* übernehmen kann. Dafür sollte das Substratspektrum des Proteins aufgeklärt und eine Zuordnung zu einer Aquaporin-Klasse vorgenommen werden. Außerdem soll die Beteiligung der Loops A und D, aufgrund ihrer besonderen Struktur, an der Funktion näher beleuchtet werden.

Im Laufe der Arbeit sollten spezifische Antikörper aus Kaninchenserum extrahiert, gereinigt und anschließend bezüglich ihres Bindungsverhaltens mit PfAQP2 untersucht werden.

Material

2. Material

2.1 Chemikalien

Alfa Aesar, Karlsruhe

Zymolyase 20 T

AppliChem, Darmstadt

Natriumlaurylsulfat, Tween®20, L-(+)-Natriumlaktat

BD, New Jersey, USA

Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids and Ammoniumsulfate

Beckman Coulter, Krefeld

Genome Lab™ DTCS – Quick Start Kit

Biogenes, Berlin

Antikörperherstellung *complete and easy*

Bio-Rad, München

Bio-Rad Protein Assay

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Milchpulver blottinggrade, D-(+)-Saccharose, LB-Medium, Agar Agar Kobe I, Glycerin 86 % Rotipuran®, Glycerin 99,5 % Rotipuran®, Ethylendiamin tetraessigsäure, Lithiumacetat, Citronensäure, Calciumchlorid Dihydrat, 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure, 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Natriumchlorid, L-Leucin, Albumin Fraktion V, Natriumacetat, 2-Mercaptoethanol, Ammoniumperoxidisulfat, Natriumhydroxid, L-Prolin, Bromphenolblau, D-Glucose

Genaxxon BioScience, Ulm

Ampicillin, TEMED

Jackson Immuno Research Europe LTd., Suffolk, UK

Peroxidase conjugated Goat Anti Mouse Antibody

Peroxidase conjugated Goat Anti Rabbit Antibody

J.T. Baker, München

Methanol, Ethanol, Isopropanol, Salzsäure

Merck, Darmstadt

Polyethylenglycol 300

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

Zymolyase 20 T, Ethidiumbromid

Oxoid, Basingstoke, USA

Agar bacteriological

Material

Peqlab, Erlangen

Peq GOLD Prestained Protein Marker III

Promega, Madison, USA

Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System

Qiagen, Hilden

Ni-NTA-Agarose

Roche, Mannheim

Anti HA 12CA5 Mouse Monoclonal Antibody

cOmplete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets

Sigma Aldrich Chemie, Steinheim

L-Lysin, L-Histidin, L-Tryptophan, Adenin, Methylaminhydrochlorid, *Sperm Nuclei from Salmon (ss-carrier DNA)*, Coomassie G250

Stratagene, La Jolla, USA

Pfu Turbo[®] DNA Polymerase

Süd-Laborbedarf, Gauting

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

Thermo Fischer Scientific, Schwerte

Restriktionsendonukleasen, T4 DNA Ligase, Fast AP[™] Thermosensitive Alkaline Phosphatase, dNTPs, λ-DNA, Orange G, SulfoLink Immobilization Kit, Slide-A-Lyzer Dialysis Casette MWCO 12 kDa 3 mL

2.2 Geräte

Beckmann Coulter, Krefeld

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

Bio-Rad, München

Transblot[®] SD semidry transfer cell, Gene Pulser[®] II Electroporation System

Clemens, Waldbüttelbronn

Dualblock Primus advanced HT2X und Primus 25 mit HT Manager Software

Eppendorf, Hamburg

BioPhotometer, Kühlzentrifuge Centrifuge 5415R

GE Healthcare, Freiburg

Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System, Whatman Chromatography Paper 3 MM, Blottingmembranen

Hamamatsu Photonics, Herrsching

150 W Xenon Lampe für die Stopped-Flow

Material

Heraeus Holding, Hanau

Multifuge 1S-R, Kelvitron[®] t, Biofuge pico

Infors, Bottmingen, Schweiz

Brutschränke Infors HAT

Jasco, Gross-Umstadt

Stopped-Flow BioLogic: BioKine Ver 4.42, Küvette FC-08, Lichtbox mit 150W Xe(Hg)-Lampe, Microprocessor Unit MPS-60, Mischeinheit SFM-300, Modular UV/Vis-Fluoreszenzspektrometer MOS-200, Monochromator BH-10-61UV, Spannungsquelle ALX 250, Photomultiplier PMS 250

LI-COR Biosciences, Bad Homburg

DNA Sequencer 4200 mit Auswertesystem

Peqlab, Erlangen

SDS-PAGE-Kammer PerfectBlue[®] vertikales Doppelgelsystem Twin S Perfect Spin 24R
Refrigerated microcentrifuge, SDS-Gelgießstand mit Laufkammer, Primus (HT) PCR-Blöcke

Roche Diagnostics, Mannheim

Lumi Imager[™] F1

Sarstedt, Nümbrecht

Filtropur S 0.2 µm

Savant Instruments, Farmingdale, USA

Vakuumzentrifuge DNA SpeedVac[®] DNA 110

SCHOTT Instruments, Mainz

Digital-Labor-pH-Meter Lab 850

Seton Scientific Inc., Petaluma, USA

Seton *open-top centrifuge tubes Polyclear*[®]

Sigma Aldrich Chemie, Steinheim

Glass *beads* (säuregewaschen)

Süd-Laborbedarf, Gauting

Vortex[®]-Genie 2

2.3 Plasmide

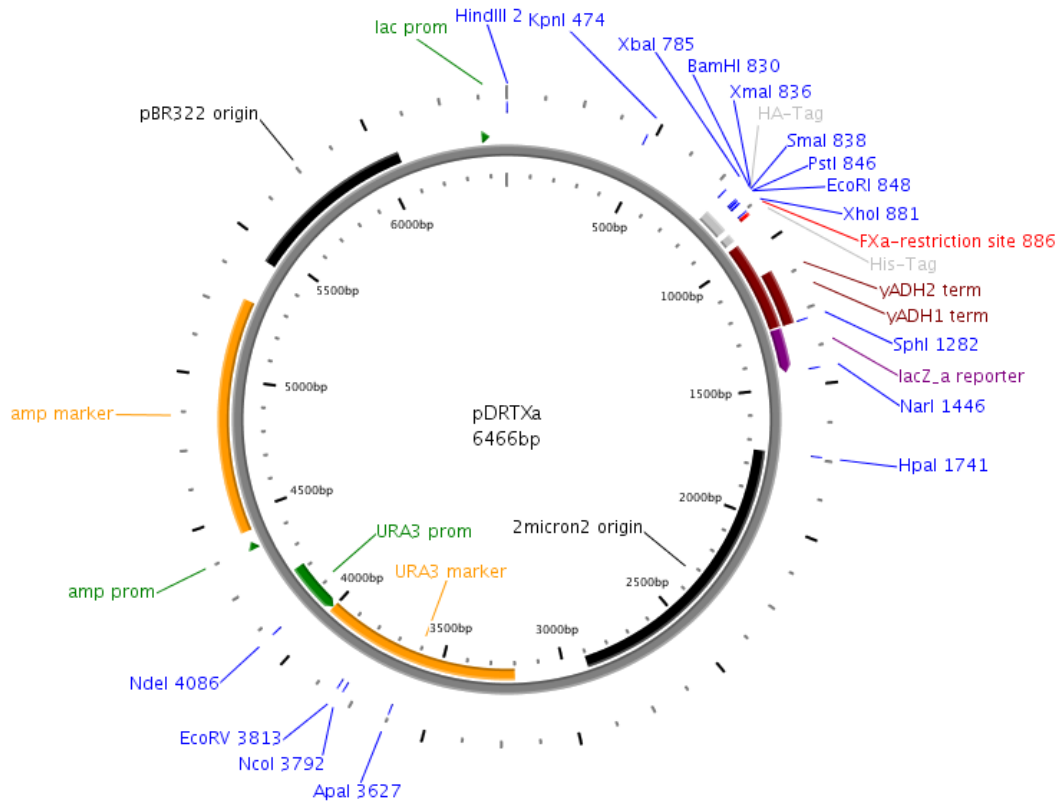


Abbildung 8: pDRTXa; *high copy number* Hefeexpressionsvektor

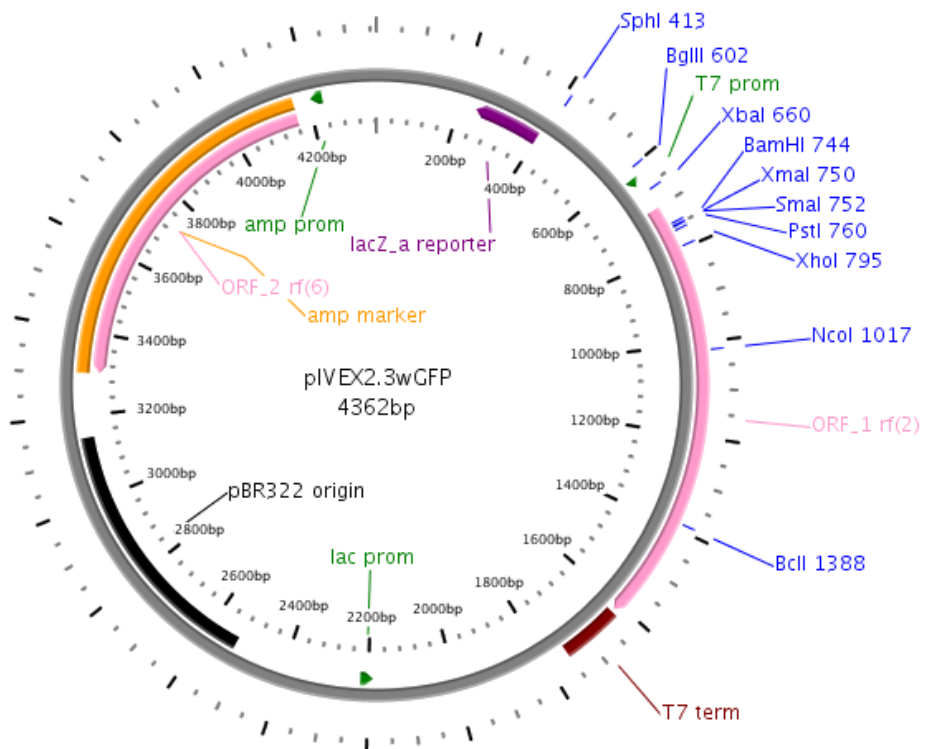


Abbildung 9: pIVEX2.3wGFP; Zellfreiexpressionsvektor mit GFP C-terminal

Material

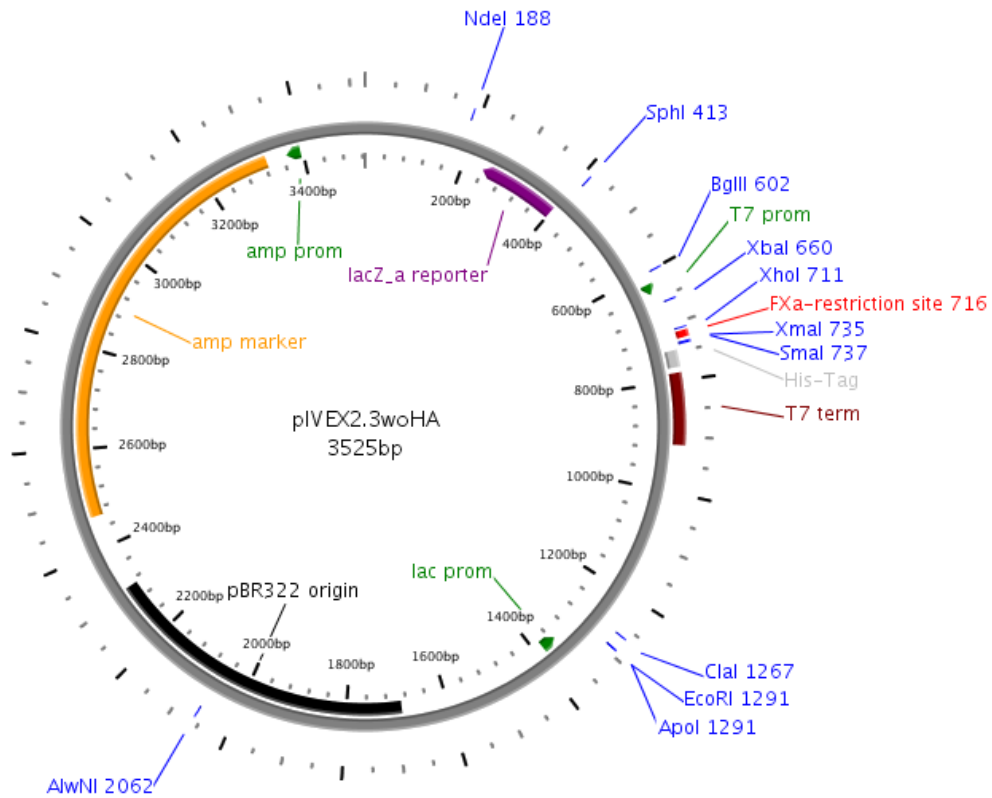


Abbildung 10: pIVEX2.3woHA; Zellfreiexpressionsvektor ohne GFP und ohne HA-tag

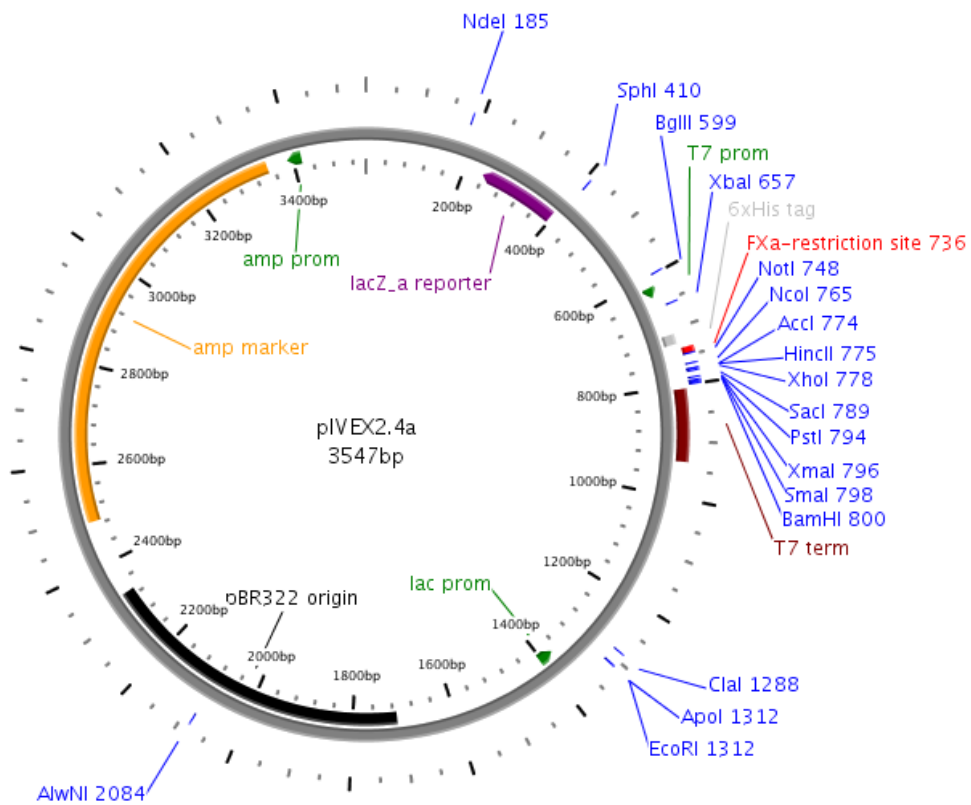


Abbildung 11: pIVEX2.4a; Zellfreiexpressionsvektor ohne HA-tag, His-tag N-terminal

2.4 Oligonukleotide

Sequenzierprimer

Name	Sequenz (5' – 3')
PMA 5'	AAT CGT TGG TAG ATA CGT TGT
ADH 3'	CAT AAA TCA TAA GAA ATT CGC
T7_s	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
pIVEX2.4a_Sequ_as	GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG
pIVEX2.3oHA_Sequ_as	CAG CCA ACT CAG CTT CCT TT
PfAQP2_Seq_132	AAG TAC AAC TTG TTC TTC GAA
PfAQP2_Seq_412	CTA AGA GAG AAG TTG AAA GAG
PfAQP2_Seq_934	GGT TGA CTG AAC CAA AGA AGT
PfAQP2_Seq_1303	CTC TTT CTT GTA CAT CGA CAA
PfAQP2_Seq_1338	TAC ATC ATG AAC CAC ATC TTC
PfAQP2_Seq_1584	CCA TAC TTC GGT TCT GCT TTC

Mutageneseprimer (Mutierte Sequenzen sind **fett** dargestellt)

Name	Sequenz (5' – 3')
PfAQP2 F ₄₇₇ R s	ACT TTG AAC CCA ATG CGC TCT ACT TCT ACT
PfAQP2 F ₄₇₇ R as	CAT TGG GTT CAA AGT AGT GTT AGT AAC GAA
PfAQP2 Y ₄₅₄ A s	ATC ATG AAC CAC ATC TTC TAC GGC TTG TTC ATC TTC TTC T
PfAQP2 Y ₄₅₄ A as	GAA GAT GTG GTT CAT GAT GTA CTT GAT GTA CTT GTT GTC G

Material

Primer zur Amplifikation

Name	Genotyp
A-Loop_for	GTC GCG GCC GCA ACT CTA ACT CTA ACG AAG AAT ACA TC
A-Loop_rev	GTC GGA TCC GTG GTT AGA AGA CTT CTT GTT TTC AGA
PfAQP2opt_as_BamHI	GTC GGA TCC GAA AAC AGA TGG CAA CAA GTA GTT CTT TGT TAG CAG CCG GAT CCG AAA ACA GAT GGC
PfAQP2opt_pIVEX2.4_as	AAC AAG T
PfAQP2opt_pIVEX2.4_s	GCA TCG AAG GCC GCG GCC GCA TGA AGA TCC AAA AGG GTT T
PfAQP2opt_s_NotI	GTC GCG GCC GCA TGA AGA TCC AAA AGG GTT TGT TC

2.5 Hefe-Stämme

Name	Genotyp
BY4742 Δ fps1	MAT α ; his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 fps1::KanMX4
W3031A Δ jen1 Δ ady2	MAT α ; leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11-15 jen1::kanMX4 ady2::hphMX4

2.6 *E. coli*-Stämme

Name	Genotyp
DH5 α	F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -
BL21(DE3)pRep4	F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm (DE3) pRep4 (neo)

2.7 Antikörper

Name	
<i>mouse anti-HA</i>	monoklonaler Antikörper (Maus) gerichtet gegen die Aminosäure-Sequenz <i>YPYDVPDYA</i>
<i>mouse anti-penta-His</i>	monoklonaler Antikörper (Maus) gerichtet gegen die Aminosäure-Sequenz <i>HHHHH</i>
<i>rabbit anti-A-Loop 268-281</i>	polyklonaler Antikörper (Kaninchen) gerichtet gegen Aminosäuren 268 bis 281; <i>YEV LKNSENKKSSN</i> im A-Loop des Wildtyp PfAQP2 (Biogenes, Berlin)
<i>rabbit anti-590-603C-Term</i>	polyklonaler Antikörper (Kaninchen) gerichtet gegen Aminosäuren 590 bis 603; <i>IHNNSYNYLLPSVF</i> des Wildtyp PfAQP2 (Biogenes, Berlin)
<i>rabbit anti-A-Loop 132-147</i>	polyklonaler Antikörper (Kaninchen) gerichtet gegen Aminosäuren 132 bis 147; <i>YKGNNKSKREVERDDD</i> im A-Loop des Wildtyp PfAQP2 (Biogenes, Berlin)
<i>goat-anti-mouse</i>	polyklonaler, sekundärer Antikörper POD-konjugiert (Ziege) (Jackson Immuno Research, Suffolk, UK)
<i>goat-anti-rabbit</i>	polyklonaler, sekundärer Antikörper POD-konjugiert (Ziege) (Jackson Immuno Research, Suffolk, UK)

Material

2.8 Puffer & Lösungen

Molekularbiologie

2.8.1 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer:

40 mM Tris-Acetat pH 8,0

1 mM EDTA

10x Probenpuffer (Orange G):

0,4 % Orange G

30 % Glycerol

100 mM EDTA

Ethidiumbromid (10 mg mL⁻¹):

1 Tablette Ethidiumbromid

10 mL *Aqua bidest.*

2.8.2 Nährmedien

LB-Flüssigmedium:

20 g LB-Medium (Lennox)

1 L *Aqua bidest.*

LB-Agar:

35 g LB-Agar

1 L *Aqua bidest.*

als Selektionsmedium + 100 µg/mL
Ampicillin und/oder Kanamycin

YPD-Flüssigmedium:

20 g Pepton

10 g Hefeextrakt

20 g Glucose

ad 1 L *Aqua bidest.*

20 min autoklavieren

YPD-Platten:

1 L YPD Flüssigmedium

0,1 g NaOH

20 g Oxoid Agar

20 min autoklavieren

auf 50 °C abkühlen und ausgießen

YNB-ura-Flüssigmedium:

1,7 g YNB

5 g Ammoniumsulfat

20 g Glucose

ad 1 L *Aqua bidest.*

20 min autoklavieren

YNB-Platten:

1 L YNB-ura Flüssigmedium

pH 5,6 mit 5 N NaOH

20 g Oxoid Agar

20 min autoklavieren

auf 50 °C abkühlen und ausgießen

Material

YNB-ura-Selektionsmedium:

KHL (für BY4742)

20 mg L⁻¹ L-Lysin

20 mg L⁻¹ L-Histidin

100 mg L⁻¹ L-Leucin

AHLW (für W3031A)

25 mg L⁻¹ Adenin

20 mg L⁻¹ L-Histidin

100 mg L⁻¹ L-Leucin

10 mg L⁻¹ L-Tryptophan

Aminosäuren für Selektionsmedien erst nach dem Autoklavieren zugeben.

2.8.3 Transformation von *S. cerevisiae*

1x Transformations-Mastermix:

240 µL PEG 3500 50 % (m/v)

36 µL Lithiumacetat 1 M

50 µL Einzelstrang-carrier-DNA

37 µL *Aqua bidest.*

+ 0,5 bis 2 µL der Plasmid-DNA

Material

Proteinchemie

2.8.4 Isolierung von Proteinen aus *S cerevisiae*

Puffer B:

25 mM Tris
5 mM EDTA
pH 7,5 mit HCl einstellen
20 min autoklavieren

Puffer M:

100 mM Na₂HPO₄
50 mM NaCl
pH 8,0 mit HCl einstellen
20 min autoklavieren

2.8.5 Zellfreie Herstellung von Proteinen

Reinigungspuffer:

20 mM Tris-HCl
150 mM bis 500 mM NaCl
Detergens je nach Methode
pH 8,0 mit NaOH einstellen

NTP-Mix:

360 mM ATP
240 mM CTP, GTP und UTP

S30-Puffer:

10 mM Tris-Acetat
14 mM Magnesiumacetat
0,6 mM Kaliumacetat
pH 8,2 mit KOH einstellen

RCWMDE:

je 16,7 mM L-Arginin, L-Cystein,
L-Tryptophan, L-Methionin,
L-Asparaginsäure,
L-Glutaminsäure

HEPES-EDTA-Puffer:

2,5 M HEPES
0,5 M EDTA
pH 8,0 mit KOH einstellen

50x cOmplete™:

1 Tablette cOmplete™, EDTA-free
1 mL Aqua bidest.

50x Aminosäure-Mix:

je 4 mM L-Arginin, L-Asparagin, L-Alanin, L-Aspartat, L-Glutamat, L-Glutamin, Glycin,
L-Histidin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Lysin, L-Serin,
L-Tryptophan, L-Threonin, L-Valin, L-Cystein, L-Methionin, L-Tyrosin

Material

2.8.6 S30-Extrakt

S30 Puffer A:

10 mM Tris-Acetat, pH 8,2
14 mM Magnesiumacetat
0,6 mM Kaliumchlorid
6 mM β -Mercaptoethanol

S30 Puffer B:

10 mM Tris-Acetat, pH 8,2
14 mM Magnesiumacetat
0,6 mM Kaliumchlorid
6 mM β -Mercaptoethanol
1 mM DTT

S30 Puffer C:

10 mM Tris-Acetat, pH 8,2
14 mM Magnesiumacetat
0,6 mM Kaliumchlorid
6 mM β -Mercaptoethanol
0,5 mM DTT

2x YTPG-Medium:

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

2.8.7 SDS-PAGE

4x Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris
0,4 % SDS
pH 6,8 mit HCl einstellen

10x Kathodenpuffer:

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS
pH 8,2-8,8 mit HCl einstellen

4x Trenngelpuffer:

1,5 M Tris
0,4 % SDS
pH 8,8 mit HCl einstellen

Material

4x SDS-Ladepuffer:

250 mM Tris
40 % Glycerol (100 %)
0,02 % Bromphenolblau
8 % SDS
400 mM DTT
pH 6,8 mit HCl einstellen

10 % APS-Lösung:

5 g Ammoniumpersulfat
ad 50 mL *Aqua bidest*
In 1,5 mL Eppendorfgefäße aliquotiert,
Lagerung -20 °C

2.8.8 Westernblot

5x Transferpuffer:

12,5 mM Tris
96 mM Glycin
0,2 % SDS

M-TBST 5 %

2 g Magermilchpulver
ad 40 mL 1x TBST-Puffer

10x TBS-Puffer:

0,2 M Tris
1,35 M NaCl
pH 7,6 mit HCl einstellen

1x Transferpuffer:

10 mL 5x Transferpuffer
10 mL Methanol
30 mL *Aqua bidest.*

1x TBST- Puffer:

100 mL 10x TBS-Puffer
900 mL *Aqua bidest.*
1 mL Tween 20TM

2.8.9 Dichtegradientenzentrifugation

Saccharose-Gradient-Puffer:

50 mM HEPES
0 % bis 60 % Saccharose
pH 6,8 mit HCl einstellen
sterilfiltrieren 0,2 µm

Material

2.9 Funktionsassays

2.9.1 Präparation von Hefeprotoplast

Puffer I:

50 mM MOPS
pH 7,2 mit einstellen
20 min autoklavieren
+ 0,2 % β -Mercaptoethanol

Puffer II:

50 mM MOPS
1,8 M Saccharose
sterilfiltrieren 0,2 μ m
pH 7,2 mit einstellen
+0,2 % β -Mercaptoethanol

Puffer III:

10 mM MOPS
1,2 M Saccharose
50 mM NaCl
5 mM CaCl₂
sterilfiltrieren 0,2 μ m

2.9.2 Stopped-flow Messpuffer

Hyperosmolarer Saccharose-Puffer:

10 mM MOPS pH 7,2
1,8 M Saccharose
50 mM NaCl
5 mM CaCl₂

Hyperosmolarer Glycerol-Puffer:

10 mM MOPS pH 7,2
1,2 M Saccharose
0,6 M Glycerol
50 mM NaCl
5 mM CaCl₂

Hyperosmolarer Formiat-Puffer:

10 mM MES pH 6,8/ 10 mM Citrat pH 4,5
1,2 M Saccharose
0,6 M Natriumformiat
50 mM NaCl
5 mM CaCl₂
pH-Wert 6,8 und 4,5 einstellen

Hyperosmolarer Laktat-Puffer:

10 mM MES pH 6,8/ 10 mM Citrat pH 4,5
1,2 M Saccharose
0,6 M Natriumlaktat
50 mM NaCl
5 mM CaCl₂
pH-Wert 6,8 und 4,5 einstellen

Material

2.9.3 Proteoliposomen

10x Proteoliposomenpuffer:

1 M KCl

2 M Saccharose

50 mM HEPES

50 mM MES

pH 7,2 mit KOH einstellen

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* wurde die Calciumchlorid-Methode angewandt. Hierbei wurde ein frischer Klon DH5 α *E. coli* in 5 mL LB-Flüssigmedium über 8 Stunden bei 37 °C unter schütteln inkubiert. Anschließend wurden mit 4 mL dieser Vorkultur 100 mL LB-Medium inokuliert und bei 20 °C und 200 U Min⁻¹ über Nacht inkubiert. Die OD₆₀₀ lag zwischen 0,4 und 0,6. Nach zehn minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 2.000 g und 4 °C geerntet. Dem Zellpellet wurde sofort 30 mL einer 0,1 M CaCl₂ Lösung zugesetzt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert, bevor die Zellen resuspendiert wurden. Nach weiteren 10 Minuten auf Eis wurde erneut zentrifugiert (2.000 g, 4 °C, 10 Minuten) und die Prozedur mit 20 mL CaCl₂ wiederholt. Anschließend wurde das Pellet 20 Minuten auf Eis gelagert und mit 10 mL CaCl₂ mit 20 % Glycerol überschichtet. Die Zellen wurden dann bei 4 °C auf Eis über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zu 100 μ L in Eppendorfgefäße aliquotiert und sofort bei -20 °C eingefroren. Die Zellen wurden mit 1 ng Plasmid-DNA transformiert, um die Effizienz der Zellen zu beurteilen. Ab einer Transformationseffizienz von 10⁶ Kolonie bildende Einheiten (KBE) μ g⁻¹ war diese ausreichend zum Klonieren.

3.1.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Ein bei -80 °C gelagertes Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde für 3 bis 5 Minuten auf Eis gelagert, bis die Zellen gerade angetaut waren. Es wurde die einzubringende DNA hinzugegeben. Entweder wurden 10 μ L eines Ligationsansatzes (3.1.9) oder 5 μ L eines PCR-Ansatzes (3.1.10) verwendet. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Danach wurde 45 Sekunden bei 42 °C erhitzt und für weitere 2 Minuten auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 900 μ L LB-Flüssigmedium ohne Antibiotikum (2.8.2) wurde 45 Minuten unter schütteln bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion der erfolgreich transformierten Klone wurden LB-Agar Platten (2.8.2) mit einem entsprechenden Antibiotikum verwendet. Dazu wurden die Zellen für 20 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und 900 μ L des Überstandes abgenommen. Die verbleibenden 100 μ L wurden zum Resuspendieren der Zellen verwendet und mit Hilfe eines Spatels auf dem Agar verteilt. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Methoden

3.1.3 Schnelltransformation chemisch kompetenter *E. coli*

Ein bei -80 °C gelagertes Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde für 3 bis 5 Minuten auf Eis gelagert, bis die Zellen gerade angetaut sind. Bis zu $2\text{ }\mu\text{L}$ der einzubringenden DNA aus einer MiniPrep (3.1.5) wurde hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen 15 Minuten auf Eis inkubiert und auf LB-Agar Platten mit Selektionsantibiotikum (2.8.2) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.4 *E. coli* Dauerkulturen

Die Langzeitlagerung von transformierten *E. coli* geschah als Dauerkultur bei -80 °C . Hierfür wurde ein einzelner Klon gepickt und über Nacht in 5 mL LB-Flüssigmedium mit Ampicillin (2.8.2) unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 1 mL dieser Kultur mit $500\text{ }\mu\text{L}$ Glycerol 80 % versetzt und nach gründlichem Vortexen sofort bei -80 °C eingefroren.

Bei Bedarf kann aus dieser Kultur ein Ausstrich auf LB-Agar Platten (2.8.2) erfolgen.

3.1.5 Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*. Die benötigten Zellen wurden aus einer 5 mL LB-Flüssigkultur mit Ampicillin (2.8.2) eines einzelnen Klones durch Zentrifugation gewonnen. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren, mit der Ausnahme, dass keine alkalische Phosphatase zugesetzt wurde.

3.1.6 Bestimmung von DNA-Konzentration und Reinheit

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von isolierter Plasmid-DNA wurde diese mit *Aqua bidest.* verdünnt und anschließend gegen reines *Aqua bidest.* als Referenz, mit einem BioPhotometer vermessen. Hierbei wurde die Absorption bei 260 nm Wellenlänge bestimmt. Aus dieser kann die Konzentration durch Multiplikation mit einem spezifischen Faktor und dem Verdünnungsfaktor berechnet werden:

$$c\ (\mu\text{g mL}^{-1}) = A_{260\text{ nm}} \cdot f_{\text{Verdünnungsfaktor}} \quad \begin{array}{l} f = 0,04 \text{ für Doppelstrang-DNA} \\ f = 0,02 \text{ für Einzelstrang-DNA} \end{array}$$

Das BioPhotometer bietet zudem die Möglichkeit, die Absorptionen bei einer Wellenlänge von 280 nm und 230 nm zu messen. Bei 280 nm absorbieren vor allem typische Verunreinigung, die bei der Isolation auftreten, etwa durch Proteine oder Phenole.

Methoden

Der Quotient aus $A_{260\text{nm}}$ und $A_{280\text{nm}}$ kann hierbei zu Rate gezogen werden. Gute Reinheit liegt ab einem Verhältnis $> 1,8$ vor.

Bei 230 nm sind vor allem Substanzen wie EDTA für die Absorption verantwortlich. Der Quotient aus $A_{260\text{nm}}$ und $A_{230\text{nm}}$ sollte > 2 sein.

3.1.7 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von Plasmiden erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 μL . Dabei wurde für 1 μg DNA 5 Einheiten des gewünschten Enzyms eingesetzt. Wurden unterschiedliche Enzyme benötigt, so wurde ein sequentieller Verdau durchgeführt, bei dem jeder Verdau im vom Hersteller empfohlenen Puffer stattfand. Dabei ist es notwendig nach jedem Schritt eine Reinigung mittels Agarose-Gel (3.1.8) oder *Hi Yield[®] PCR Clean-up/Gel-Extraction Kit* durchzuführen. Beim Doppelverdau mit zwei Enzymen wurde ein Puffer eingesetzt, der nach Angaben des Herstellers für beide Enzyme die größte Aktivität gewährleistet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37 °C.

3.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurde eine qualitative Bewertung von DNA-Fragmenten sowie deren Trennung nach Ligation (3.1.9) und Restriktion (3.1.7) durchgeführt.

Für die Herstellung eines 1%igen Agarose-Gels wurden 50 mL 1x TAE-Puffer (2.8.1) mit einem Messzylinder abgemessen und in einen Erlenmeyerkolben überführt. Darin wurden 0,5 g Agarose suspendiert. Die Mischung wurde 2 bis 3 Minuten in einer Mikrowelle bei maximaler Leistung zum Sieden erhitzt bis sämtliche Agarose gelöst war. Nach 5 Minuten wurde verdunstetes Wasser ersetzt und 1 μL Ethidiumbromid (2.8.1) zugesetzt. Nach dem Aushärten wurde das Gel in einem Schlitten in eine mit 1x TAE-Puffer (2.8.1) gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. In jede Tasche des Gels kann bis zu 20 μL einer Probe, die mit 10x Orange G Probenpuffer (2.8.1) versetzt wurde, pipettiert werden. In eine der Taschen wurden 5 μL eines λ -*Pst*I-Größenmarker (Abbildung 12) pipettiert und anschließend die elektrophoretische Trennung für etwa 20 bis 60 Minuten, abhängig von der Größe der DNA-Fragmente, bei einer konstanten Spannung von 120 V durchgeführt.

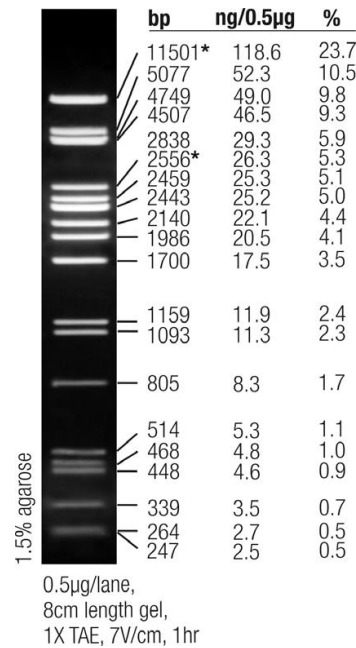


Abbildung 12: Größenmarker für die DNA-Trennung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde die DNA durch die unspezifische Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA bei einer Wellenlänge von 365 nm zur Fluoreszenz angeregt. Die Größe der Fragmente kann dabei durch den Vergleich mit dem Größenmarker in Abbildung 12 bestimmt werden. Die Dokumentation erfolgte durch Photographieren und Ausdrucken auf Thermopapier.

DNA-Fragmente konnten aus dem Agarose-Gel zur späteren Ligation oder Transformation mit einem Skalpell ausgeschnitten werden und mit Hilfe des *Hi Yield® Gel-Extraction Kit* zur weiteren Verwendung extrahiert werden.

3.1.9 Ligation

Die Ligation von zwei DNA-Fragmenten mit der T4-DNA Ligase wurde bei *sticky-ends* in 10 µL, bei *blunt-ends* in 20 µL Gesamtvolumen durchgeführt. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert lag dabei zwischen 1:3 und 1:7. Die Inkubation im spezifischen T4-DNA Ligase Puffer erfolgte für 15 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C.

3.1.10 Polymerase-Kettenreaktion

Die verschiedenen PfAQP2-Mutanten und der separate, lösliche A-Loop wurden mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (*PCR*) unter Verwendung der in 2.4 aufgelisteten *primer* amplifiziert. Die *PCR*-Ansätze wurden nach folgendem Schema (Tabelle 1) pipettiert:

Methoden

Tabelle 1: Standard-Zusammensetzung für Mutagenese-PCR

5 µL	10x <i>Pfu</i> -Puffer
4 µL	dNTPs (je 2,5 mM ATP, CTP, GTP, TTP)
1,5 µL	<i>sense primer</i> (25 µM)
1,5 µL	<i>antisense primer</i> (25 µM)
0,5 µL	<i>Pfu</i> -Turbo® Polymerase (2,5 U µL ⁻¹)
0,5 µL	DNA
ad 50 µL	<i>Aqua Bidest.</i>

In Tabelle 2 ist das standardmäßig verwendete Temperaturprogramm für die Amplifizierung aufgeführt.

Tabelle 2: Temperaturprogramm für die PCR

Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)		
95	0,75	Denaturieren	
95	0,75	Denaturieren	
45-65	1	Anlagerung der <i>primer</i>	16-30 Zyklen
72	2-18	Elongation	
72	20	Elongation	
8	∞	Lagerung	

Dabei richtete sich die Zeit für die Elongation nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Stangs, da die *Pfu*-Polymerase 500 bis 1.000 Basenpaare pro Minute amplifiziert. Des Weiteren richtet sich die Auswahl der Anlagerungstemperatur nach der Schmelztemperatur T_m der verwendeten *primer*. Diese wiederum wird vor allem durch ihre Länge und maßgeblich durch den GC-Gehalt bestimmt. Die Schmelztemperatur kann mit Hilfe der folgenden Formel berechnet werden:

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

GC (%) – GC-Gehalt des *primers* in %

N – Anzahl der Basenpaare des *primers*

Methoden

Im Falle einer *in-vitro*-Mutagenese, wurde die eingesetzte, nicht mutierte, methylierte Mutterstrang-DNA im Anschluss an die durchgeführte PCR durch Verdau mit 1 μL *DpnI* bei 37 °C für 3 Stunden entfernt.

Für Ansätze, bei denen lediglich eine Amplifikation durchgeführt wurde, reicht die Reinigung und Kontrolle durch Agarose-Gelelektrophorese (3.1.8). Anschließend wurde das Amplifikat ausgeschnitten und mit Hilfe des *Hi Yield® Gel-Extraction Kit* rückgewonnen.

3.1.11 DNA Sequenzierung

Um DNA-Konstrukte bezüglich gewollter oder ungewollter Mutationen in ihrer Sequenz zu untersuchen, wurde eine Ketten-Abbruchsynthese Sequenzierung mit dem GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit durchgeführt. Die anschließende Trennung und Identifizierung anhand der fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide geschah mit Hilfe der Kapillar-Gelelektrophorese im CEQ™ 8000 Genetic Analysis System von Beckmann Coulter®. Für jede Probe wurden 50 bis 100 fmol der DNA ad 9,5 μL mit *Aqua bidest.* vermischt und für 5 Minuten vorgeheizt. Direkt im Anschluss wurden auf Eis 1,5 μL eines der Sequenzier-Oligonukleotide (5 μM ; 2.4) und 2 μL DTCS Quick Start Master Mix zugegeben. Die zugegebene Menge an Oligonukleotid wurde so gewählt, dass ein Überschuss von mindestens Faktor 40 im Vergleich zur Plasmid-DNA vorlag. Nach gründlichem Mischen wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet (Tabelle 3):

Tabelle 3: Temperaturprogramm für die DNA Sequenzierung

Temperatur °C	Zeit	
86	5 Minuten	Vorheizen (Denaturierung)
96	20 Sekunden	Denaturierung
50	20 Sekunden	Anlagerung der <i>primer</i> 30 Zyklen
60	4 Minuten	Elongation
8	∞	Lagerung

Nach Abschluss des Temperaturprogramms wurde die Reaktion gestoppt, indem ein Mastermix aus 2 μL Na-Acetat Lösung (3 M), 2 μL Na₂EDTA Lösung (100 mM) und 1 μL Glykogen (20 mg mL⁻¹) zu jeder Probe pipettiert wurde. Danach wurde das Amplifikat mit 60 μL eiskaltem Ethanol 96 % (V/V) gefällt, der Überstand durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 13.500 g bei 4 °C abgetrennt und noch zwei Mal mit je 200 μL eiskaltem Ethanol 70 % (V/V) gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde im Vakuum für 30 Minuten

Methoden

getrocknet und anschließend in 20 μL *sample loading solution* resuspendiert. Anschließend wurden die Proben mittels Kapillargelelektrophorese aufgetrennt und die Sequenz analysiert.

3.1.12 Transformation von *S. cerevisiae*

Untransformierte Klone der *S. cerevisiae* Stämme By4742 (2.5) und W3031A (2.5) wurden auf YPD-Agar Platten aus einem Glycerolstock für 3 bis 5 Tage bei 29 °C inkubiert. Alle 3 Monate wurden diese Platten frisch ausgestrichen und erneut inkubiert. Während dieser 3 Monate lagerten die Platten im Kühlschrank.

Für die Transformation mit einem Plasmid wurde eine Kolonie des gewünschten Stammes über Nacht in 5 mL YPD-Flüssigmedium bei 29 °C und 220 U min^{-1} geschüttelt. Von dieser Übernachtskultur wurde eine 50 mL YPD-Flüssigkultur mit einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,2 hergestellt und bei 29 °C inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,6 wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 2.500 g und 4 °C geerntet. Nach einmaligem Waschen mit 25 mL eiskaltem *Aqua bidest.* wurde das Zellpellet in 1 mL *Aqua bidest.* resuspendiert und in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet, das durch erneute Zentrifugation für 30 Sekunden bei 13.000 g gewonnen wurde, wurde in 100 μL *Aqua bidest.* für jede geplante Transformation resuspendiert. Anschließend wurden 100 μL Zellsuspension für jede Transformation in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, erneut für 30 Sekunden bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Jeder der Transformationsansätze wurde dann mit 360 μL des Transformations-Mixes (2.8.3) und 0,5 bis 2 μL der gewünschten Plasmid-DNA versetzt. Anschließend kamen die Proben für 45 Minuten in einen auf 42 °C temperierten Heizblock. Der Transformations-Mastermix wurde durch Zentrifugation für 30 Sekunden bei 13.000 g abgetrennt und das Zellpellet in 1 mL *Aqua bidest.* resuspendiert. Die Zellsuspension wurde je nach Bedarf 1 zu 10 bis 1 zu 1.000 mit *Aqua bidest.* verdünnt und anschließend 100 μL der verdünnten Zellsuspension auf Agarplatten mit einem geeigneten Selektionsmedium (SD-KHL oder SD-AHLW; 2.8.2) ausgestrichen.

3.1.13 *S. cerevisiae* Dauerkultur

Die Langzeitlagerung von transformierten *S. cerevisiae* geschah als Dauerkultur bei -80 °C. Hierfür wurde ein Klon gepickt und über Nacht für BY4742 Δfps1 -Hefen in 5 mL SD-KHL-Flüssigmedium, und für W3031A $\Delta\text{jen1}\Delta\text{ady2}$ -Hefen in 5 mL SD-AHLW-Flüssigmedium für 24 Stunden unter Schütteln bei 29 °C inkubiert. Am nächsten

Methoden

Morgen wurden 500 μL dieser Kultur mit 500 μL Glycerol 80 % versetzt und nach gründlichem vortexen sofort bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Isolierung rekombinanter Proteine aus *S. cerevisiae*

Für die Isolierung von Proteinen aus *S. cerevisiae* wurde eine 5 mL Übernachtskultur mit einem einzelnen Klon frisch transformierter Hefe-Zellen vorbereitet und über Nacht bei $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Bei der Vorkultur und allen Hauptkulturen wurde für BY4742 Δfps1 -Hefen SD-KHL-Flüssigmedium und für W3031A $\Delta\text{jen1}\Delta\text{ady2}$ -Hefen SD-AHLW-Flüssigmedium verwendet. Die OD_{600} der Vorkultur wurde bestimmt und eine zur Generationszeit passende Menge Hefezellen in 50 mL frischem Selektionsmedium suspendiert. Diese Hauptkultur wurde dann bei $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 220 U Min^{-1} geschüttelt, bis die Ziel OD_{600} von 1 erreicht war. Dann wurden die Zellen durch zentrifugieren für 5 Minuten bei 2.500 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ geerntet. Das Pellet wurde einmal mit 50 mL eiskaltem Wasser und einmal mit 10 mL kaltem Puffer B (2.8.4) gewaschen. Der Puffer wurde wieder vollständig abgetrennt und die Zellen für mindestens 30 Minuten bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Im Anschluss wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in 500 μL Puffer B resuspendiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens säuregewaschener Glasperlen wurde 20 Mal für 30 Sekunden gevortext, wobei die Zellen nach jedem vortexen für 60 Sekunden auf Eis gelassen wurden. Die entstandenen Zelltrümmer wurden mit den Glasperlen durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 1.000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgetrennt und der Überstand in einem Eppendorfgefäß auf Eis gelegt. Trümmer und Glasperlen wurden mit 500 μL frischem Puffer B resuspendiert und erneut abgetrennt (1.000 g , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 Min.). Die beiden Überstände wurden vereinigt. Anschließend wurde durch erneute Zentrifugation bei 10.000 g die restlichen größeren Zellfragmente abgetrennt. Das erhaltene Pellet wurde für die SDS-PAGE (3.2.4) mit Puffer M und Probenpufferversetzt und der Überstand ein letztes Mal für 45 Minuten bei 100.000 g im Vakuum zentrifugiert. Das hierbei entstandene Pellet enthält die Bestandteile der mikrosomalen Fraktion, welche in 100 μL Puffer M (2.8.4) für 10 Minuten auf Eis solubilisiert wurden. Für eine SDS-PAGE wurde Probenpuffer zugesetzt.

3.2.2 Bestimmung der Konzentration von Proteinproben

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bio-Rad Protein Assay verwendet. Dabei wurde die Proteinprobe mit 800 μL *Aqua bidest.* verdünnt und mit 200 μL des Bradford-Reagenzes vermischt. Als Leerwert wurden 800 μL *Aqua bidest.* und ggf. eine

Methoden

repräsentative Menge Puffer mit 200 µL Bradford-Reagenz versetzt. Nach fünf minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Kalibrierung wurde mit Rinderserum-Albumin durchgeführt und lag zwischen 0,1 und 0,6. Proben außerhalb der Kalibrierung wurden mit angepasster Verdünnung erneut durchgeführt.

3.2.3 Trichloressigsäure Proteinfällung

Um die Konzentration stark verdünnter Proteinlösungen zu erhöhen wurde eine Trichloressigsäure (TCA) Fällung durchgeführt. Hierbei wurde eine frische 100 %ige TCA-Lösung hergestellt (1 g mL^{-1}) und anschließend 1 Teil TCA-Lösung zu 4 Teilen Proteinlösung gegeben. Nach dem Mischen wurden die Proben 30 Minuten auf Eis gelagert. Das gefällte Protein wurde 10 Minuten lang bei 13.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Es erfolgten 2 Waschschrte, bei denen das Pellet mit 200 µL eiskaltem Aceton gewaschen wurde und dieser durch erneutes zentrifugieren abgetrennt wurde. Um sicher zu stellen, dass kein Restaceton mehr in der Probe verblieben ist, wurden die Proben mit offenen Deckeln für 5 Minuten in den auf 70 °C temperierten Heizblock gestellt. Die Resuspendierung erfolgte durch Zugabe von 20 µL PBS-Puffer über Nacht im Kühlschrank.

3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von hergestellten Proteinen nach ihrem molekularen Gewicht wurde die SDS-PAGE verwendet. Hierbei wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamid-Gel, bestehend aus einem 5 %igen Sammel- und einem 10 %igen Trenngel, gegossen. Tabelle 4 zeigt die dafür verwendete Reagenzien nach Art und Menge.

Tabelle 4: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel bei der SDS-PAGE

5 % Sammelgel		10 % Trenngel	
4x Sammelgelpuffer	1 mL	4x Trenngelpuffer	3 mL
<i>Aqua bidest.</i>	2,4 mL	<i>Aqua bidest.</i>	6 mL
Rotiphorese 40	0,6 mL	Rotiphorese 40	3 mL
TEMED	6 µL	TEMED	10 µL
APS 10 %	25 µL	APS 10 %	80 µL

Methoden

Es wurden Gele mit 10 oder 12 Taschen für Proben hergestellt, wobei mindestens eine Spur mit 2 µL des PeqGOLD *prestained* Protein Marker III beladen wurde. In der Sammelphase wurden die Proben für 10 bis 15 Minuten bei 160 V im Sammelgel konzentriert. Im Anschluss erfolgte die Trennung der Proben bei 200 V für 60 bis 90 Minuten. Die Gele konnten danach entweder für einen Western Blot (3.2.5) oder eine Coomassie Färbung (3.2.6) verwendet werden.

3.2.5 Western Blot

Um Proteine, die mit Hilfe der SDS-PAGE (3.2.4) getrennt wurden, spezifisch zu detektieren wurden die Gele mit der Trans Blot® *SD Semi-Dry Transfer Cell* von Bio-Rad auf eine PVDF Membran übertragen. Die Membran wurde hierzu zuvor für 20 bis 60 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit sechs Whatman-Papieren in 1x Transferpuffer getaucht. Das SDS-Gel wird dann auf der Membran platziert und zwischen drei Lagen Papier oben, wie unten, in die *Blotting*-Apparatur eingebracht. Der Transfer wurde 60 Minuten mit 17 V Spannung durchgeführt.

Nach dem Blotten wurden unbesetzte Bindestellen auf der Membran mindestens 60 Minuten lang in 5 % M-TBST (2.8.8) bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken geblockt. Die Membran wurde mit einem primären Antikörper gegen ein spezifisches Epitop der Proteine bei 4 °C über Nacht unter leichtem Schwenken inkubiert. Dabei richtete sich die Verdünnung in 5 % MTBST nach der Art des Antikörpers zwischen 1 zu 2.000 und 1 zu 100.000. Als sekundär-Antikörper kamen sowohl *goat anti mouse*, als auch *goat anti rabbit* Antikörper, an die eine Meerrettichperoxidase gekoppelt wurde, in einer Verdünnung von 1 zu 5000 in 5 % M-TBST zum Einsatz. Die Inkubation wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach jeder Antikörper-Behandlung wurde die Membran drei Mal direkt mit TBST vorgewaschen und anschließend drei Mal für 15 Minuten unter leichtem Schwenken.

Die gekoppelte Peroxidase am Sekundärantikörper katalysiert die Umsetzung des Amersham ECL Plus-Reagenz. Dabei entstehende Chemilumineszenz wurde mit dem Lumi-Imager F1™ aufgezeichnet und in Form eines Bildes ausgewertet.

3.2.6 Coomassie Färbung

Durch SDS-PAGE (3.2.4) aufgetrennte Proteinproben konnten mit Hilfe des Coomassie G250 Reagenzes unspezifisch eingefärbt werden. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese für mindestens 60 Minuten unter Schwenken in das Färbereagenz gegeben. Anschließend erfolgte die Entfärbung mit Entfärber-Lösung und *Aqua bidest.*

Methoden

3.2.7 Herstellung von Antiseren

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörperseren wurde die Firma BioGenes in Berlin beauftragt, insgesamt 6 Kaninchen mit 3 verschiedenen Peptiden zu immunisieren. Zwei der Peptide bestanden aus 14 Aminosäuren, YELVKENSENKKSSN mit C-terminaler Amid-Modifikation als Sequenz aus dem extrazellulär gelegenen A-Loop und IHNSYNYLLPSVF repräsentiert die letzten 14 Aminosäuren des C-Terminus. Außerdem wurde ein 16 Aminosäuren Peptid, YKGNNKSKREVERDDD mit C-terminaler Amid-Modifikation, aus der Mitte des extrazellulären A-Loops ausgewählt. Zur späteren Aufreinigung über eine Affinitätschromatographiesäule wurde C-terminal ein Cysteinrest eingefügt. Zur Steigerung der Immunogenität wurden die Peptide an LPH-Carrier (Pfeilschwanzkrebs-Hämocyanin-Carrier) gekoppelt. Die Analyse der Reinheit der Peptide erfolgte durch HPLC und Massenspektrometrie durch die Firma BioGenes. Mit dem jeweiligen Peptid wurden dann zwei Kaninchen immunisiert, um die Bildung von Antikörpern auszulösen. Es folgte eine fünfmalige Boosterinjektion über einen Zeitraum von 3 Monaten. Den Kaninchen wurde vor der Immunisierung (Präimmuns Serum), sowie nach 35, 63 und 91 Tagen Blut entnommen (20-50 mL). Die Antikörpertiter wurden an Tag 35 mit einem ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) bestimmt.

3.2.8 Affinitätsreinigung der Antiseren

Um die Antikörper aus den Kaninchenseren zu extrahieren wurde das Sulfolink[®] *Immobilization Kit* der Firma ThermoScientific verwendet. Zuerst wurden die Immunisierungspeptide, die vom Hersteller mitgeliefert wurden, kovalent über das zusätzliche Cystein an die Affinitätssäule gekoppelt. Die Bindung erfolgt unter Ausbildung eines Thioethers zwischen einer Iodoacetyl-Gruppe des Säulenmaterial und der Sulfhydryl-Gruppe des Cysteins am Peptid bei einem pH von 7,5 bis 9,0. Die Säule wurde dann 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 mL einer Lösung die 1 bis 2 mg des Peptids in Puffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA; pH 8,5) enthielt inkubiert. Die Peptidlösung wurde von der Säule entfernt und die Menge an ungebundenem Peptid mit dem BioPhotometer bestimmt, um die Kopplungseffizienz zu ermitteln. Die Peptide wurden so designt, dass sich in ihrer Sequenz mindestens eine aromatische Aminosäure befindet und waren somit einer direkten Konzentrationsbestimmung am Photometer zugänglich. Nach dem Waschen der Säule wurden freie Reaktionsstellen des Säulenmaterials mit L-Cystein umgesetzt, um unspezifische kovalente Bindungen zu verhindern.

Methoden

Zunächst wurde die Absorption des Ausgangsserums photometrisch bei 280 nm bestimmt. Auf die vorbereitete Säule wurden dann 2 mL dieses Serums pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert. Nach Zentrifugieren für 1 Minute bei 1.000 g wurde der Durchfluss für photometrische Messungen gesammelt. Diese Schritte wurden vier Mal mit je 2 mL Serum wiederholt. Die Säule wurde solange mit Waschpuffer gewaschen bis die Absorption des Durchflusses bei 280 nm unter 0,005 lag.

Zur Elution des Antikörpers wurde die Säule in ein 15 mL Gefäß gesteckt, das mit 100 μ L Neutralisationslösung (1M Tris-HCl pH 8,5-9,0) gefüllt war. 2 mL Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl; pH 2,5-3,0) wurden auf die Säule pipettiert und der Antikörper so durch einen pH Sprung denaturiert, wodurch sich dieser von der Säule eluieren ließ. Durch die Neutralisationslösung wird der Antikörper wieder renaturiert. Der Elutionsschritt wurde fünf bis sieben Mal durchgeführt und die erhaltenen Antikörperlösungen photometrisch vermessen, wobei die letzte Fraktion eine Absorption bei 280 nm \leq 0,05 hatte. Um die Stabilität der gewonnenen Antikörper zu gewährleisten und diese in eine einfach zu verwendende Form zu bringen, wurden die Lösungen zunächst dialysiert. Die Dialyse erfolgte gegen 2 L Phosphatpuffer zunächst für eine Stunde. Nach Pufferwechsel wurde über Nacht bei 4 °C weiter dialysiert. Zur Aufkonzentrierung der Antikörperlösungen wurden Amicon Ultra-4 *Centrifugal Filter Unit with Ultracel-30 membrane*, verwendet. Mittels Bradford-Reagenz wurde die Proteinkonzentration bestimmt und die Antikörperlösungen mit Glycerol 80% im Verhältnis 1 zu 1 versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.3 Zellfreie Proteinsynthese

Alle Schritte der zellfreien Proteinsynthese und der Herstellung der Bestandteile wurde nach dem Protokoll von Schwarz *et al.* [101] durchgeführt und durch Dr. Annika Müller-Lucks und Dr. Sinja Bock im Arbeitskreis etabliert.

3.3.1 S30 Extrakt

Der S30 Extrakt enthält eine Reihe verschiedener Proteine, vor allem jedoch die für die zellfreie Proteinsynthese zwingend notwendigen Ribosomen, Aminoacyl-tRNA Synthetasen und sämtliche Transkriptionsfaktoren [101]. Für den S30 Extrakt kann eine Reihe verschiedener *E. coli* Stämme verwendet werden. In unserer Arbeitsgruppe wurden BL21(DE3) Zellen auf LB-Platten ausgestrichen und ein Klon zur Inokulation von 50 mL LB-Medium verwendet. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 220 U Min⁻¹ geschüttelt. 5 Liter

Methoden

zweifachkonzentriertes YTPG-Medium wurden im Fermenter ohne die Glucose und den Phosphatpuffer autoklaviert. Der Phosphatpuffer wurde separat autoklaviert und die Glucose sterilfiltriert. Nach dem Vorbereiten des Fermenters wurden 500 μL Antifoam Y-30 sowie die Vorkultur zum Inokulieren hinzugefügt. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{600} von 2,5 bis 3,0 bei 37 °C und einem Sauerstoffgehalt von mindestens 80 % kultiviert. Während dieses Prozesses wurden zur Kontrolle alle 20 Minuten Proben gezogen, um die OD_{600} zu bestimmen. Das Wachstum der Zellen wurde in der exponentiellen Phase durch das schnelle Abkühlen auf unter 12 °C in einem Eis-Wasser-Bad innerhalb von 45 Minuten gestoppt, hierbei durfte eine OD_{600} von 4 nicht überschritten werden. Es wurde bei 4.500 g für 15 Minuten bei 4 °C geerntet, die Zellen in insgesamt 450 mL kaltem S30 Puffer A dreimal gewaschen und schließlich bei -80 °C eingefroren. Das Pellet wurde in 110 % (V m^{-1}) S30 Puffer B resuspendiert und die Zellen mit der French Press bei 20.000 *psi* aufgeschlossen. Im Anschluss an eine Zentrifugation bei 30.000 g für 30 Minuten bei 4 °C wurden die oberen 2/3 des Überstandes vorsichtig abpipettiert und erneut zentrifugiert. Die oberen 2/3 des zweiten Überstandes wurden wieder vorsichtig abgenommen und mit 4 M NaCl versetzt, dass sich eine finale Konzentration von 400 mM NaCl ergab und für 45 Minuten bei 42 °C im Wasserbad geschüttelt. Der Extrakt wurde zwei Mal gegen je 2,5 L S30 Puffer C bei 4 °C dialysiert. Die erste Dialyse dauerte hierbei 60 Minuten. Dann wurde der Puffer erneuert und der zweite Dialyseschritt bis zum nächsten Morgen durchgeführt. Der dialysierte Extrakt wurde erneut für 30 Minuten bei 30.000 g zentrifugiert, die oberen, nicht getrübbten 2/3 des Überstandes mit einer Pipette abgenommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die geeignete Konzentration an Magnesium für zellfreie Ansätze und die Qualitätskontrolle des frischen Extraktes wurden nach dem Protokoll des analytischen Ansatzes (3.3.2) durch die zellfreie Synthese von GFP durchgeführt. Im analytischen Screen wurden die entstandenen Proteinmengen an GFP über die Fluoreszenzintensität bestimmt. Es wurden Magnesiumkonzentrationen von 8 mM bis 16 mM getestet und das Ergebnis der besten Bedingung mit dem eines früheren Extrakts im gleichen Ansatz verglichen.

3.3.2 Analytischer Ansatz

Sowohl die analytischen als auch die präparativen Ansätze der zellfreien Proteinsynthese wurden mit der *Continuous-Exchange*-Methode hergestellt, die eine Proteinsynthese von bis zu 24 Stunden mit stetig steigender Proteinmenge ermöglicht. Für den analytischen Ansatz wurde eine selbstgebaute Dialysekammer nach dem Vorbild von Frau B. Schneider genutzt [102]. In diesen war eine simultane Doppelbestimmung für die Detergenzcreens und Bestimmung

Methoden

der idealen Magnesiumkonzentration einer Charge des S30 Extrakts (3.3.1) möglich. Der Reaktionsmix von 55 μL Volumen wurde hierbei vom *Feeding-Mix* mit 850 μL durch eine Dialysemembran mit 12 kDa MWCO getrennt. Es ergab sich somit ein Verhältnis von etwa 1 zu 15 zwischen dem Reaktionsmix und dem *Feeding-Mix*. Der *Feeding-Mix* wurde in einer 24-Well-Platte vorgelegt, in die die Dialysekammern luftblasenfrei eingesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C unter leichtem Schwenken im Wasserbad für bis zu 24 Stunden. Die Reaktionsansätze wurden im Anschluss entnommen und eine Stunde auf Eis gelagert. Die Komponenten und deren Konzentrationen sind in Tabelle 5 gezeigt. Bei dem Ansetzen wurde zunächst der Mastermix pipettiert, 290 μL für den Reaktionsmix abgenommen, und der S30-Puffer und weitere Aminosäuren zum *Feeding-Mix* hinzugefügt. Zu den 290 μL des Mastermixes wurden die übrigen Komponenten zugegeben. Je nach Art des Screens wurde anschließend der Reaktionsmix und der *Feeding-Mix* aliquotiert und z.B. mit den Detergenzien versetzt, die untersucht werden sollten. Die Konzentrationen, der für die Analyse und präparativen Synthese eingesetzten Detergenzien sind in Tabelle 6 für eine gängige Beispiele zusammengefasst.

Tabelle 5: Bestandteile des Präparativen und Analytischen Zellfreiensatzes nach Art und Menge

Konzentration.	Einheit	Endkonzentration.	Komponente
10	%	0,05	NaN_3
40	%	2,0	PEG ₈₀₀₀
4000	mM	150,8	KOAc
1000	mM	7,1	$\text{Mg}(\text{OAc})_2$
24	x	1,0	Puffer HEPES-EDTA
50	x	1,0	<i>Complete</i> [®]
10	mg mL^{-1}	0,1	Folinsäure
500	mM	2,0	DTT
75	x	1,0	NTP-Mix
1000	mM	20,0	Phosphoenolpyruvat
1000	mM	20,0	AcP
1	x	0,35	S30-Extrakt
4	mM	0,50	Aminosäure-Mix
16,67	mM	1,0	RCWMDE
15	%	1,0	Brij 78
1	x	0,35	S30-Puffer
10	mg mL^{-1}	0,08	Pyruvat Kinase
40	mg mL^{-1}	0,7	tRNA <i>E.coli</i>
350	$\text{U } \mu\text{L}^{-1}$	15,0	T7-RNA Polymerase
40	$\text{U } \mu\text{L}^{-1}$	0,3	<i>RiboLock</i> [®]
0,4	mg mL^{-1}	0,023	Plasmid
			H_2O

Methoden

Tabelle 6: Typische Detergenzien, ihre kritische Mizell Konzentration (CMC) und die Endkonzentration bei der zellfreien Proteinsynthese

Detergens	CMC (mM)	Endkonzentration
Brij [®] 35	0,09	0,2 %
Brij [®] 58	0,077	1,5 %
Brij [®] 78	0,046	1,0 %
Brij [®] 98	0,025	0,2 %
Digitonin	0,5	0,4 %
Triton X-100	0,24	0,1 %
β -Octylglycosid	19	0,75 %
DDM	0,19	0,1 %
Tween 20	0,059	0,075 %
CHAPS	8	0,75 %

3.3.3 Präparativer Ansatz

Die Bedingungen, die sich im analytischen Ansatz als optimal herausgestellt hatten, wurden im präparativen Ansatz in einem Maßstab von 1 bis 3 ml in *Slide-A-Lyzer* Dialysekassetten angesetzt und in ebenfalls selbst hergestellten Kammern nach dem Vorbild von Schneider *et al.* [102] inkubiert. Die Zusammensetzung unterschied sich nur in dem Verhältnis zwischen Reaktionsmix und *Feeding-Mix*, dieser betrug präparativ 1 zu 17. Bei den Ansätzen wurde zunächst der Mastermix pipettiert, 472,3 μ L für den Reaktionsmix abgenommen, und der S30-Puffer, sowie Wasser und weitere Aminosäuren hinzugefügt. Die übrigen Bestandteile des Reaktionsmixes wurden zum Mastermix gegeben und diese Mischung in die Dialysekammer eingefüllt. Nach der Inkubation im Wasserbad wurden die Proben mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt (3.3.4).

3.3.4 Nickel-Affinitätschromatographie

Für die zellfreie Proteinsynthese wurden pro Milliliter Proteinansatz 150 μ L Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure (NTA)-*beads* als 50%-, „*slurry*“ eingesetzt. Die Ni²⁺-*beads* wurden vorher mit dem Reinigungspuffer und dem gewünschten Detergens gewaschen und zu der Proteinlösung pipettiert. Die Inkubation erfolgte rotierend bei 4 °C über Nacht. Das Waschen und Eluieren wurde aufgrund des kleinen Maßstabs manuell in gewaschenen Minipräparationssäulen mit einer 1 mL-Spritze durchgeführt. Zunächst wurden die Ni²⁺-*beads* vom Zellfrei-Reaktionspuffer abgetrennt und mit dem 20-fachen Säulenvolumen 20 mM Imidazol im Reinigungspuffer mit Detergens gewaschen. Anschließend wurde stufenweise mit

Methoden

je 5 Säulenvolumina 80 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM und 500 mM Imidazol im Reinigungspuffer nach einer zehn minütigen Inkubation bei Raumtemperatur pro Schritt eluiert. Für wiederholte Ansätze von Proteinen, deren Elutionsverhalten in den verwendeten Detergenzien bereits bekannt war, wurden vereinzelt Stufen übersprungen. Bei den Vorversuchen wurden die benötigten Konzentrationen des Imidazols durch Hinzufügen entsprechender Volumina eines 1 M Imidazol *Stocks* zum Reinigungspuffer erzeugt. Das Imidazol musste vor dem Konzentrieren des Proteins oder vor der Herstellung von Proteoliposomen mit den *PD Desalting Columns* entfernt werden. Im Anschluss an die Reinigung wurden die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und von zwei Gelen eines mit Coomassie gefärbt und eines mittels Immuno-Blot analysiert.

3.3.5 Herstellung von Liposomen und Proteoliposomen

Zuerst wurden multilamellare Liposomen aus *E. coli* Lipiden der Firma Avanti hergestellt. Hierzu wurden 100 mg *E. coli* Lipide in 4 mL Chloroform mit einer Pasteurpipette aus Glas gelöst. Die 4 mL wurden in 4 Glasröhrchen mit Stopfen zu je 1 mL aufgeteilt und mit Stickstoff unter ständigem Drehen begast, bis sämtliches Chloroform verdunstet war. Damit sichergestellt ist, dass kein Chloroform mehr zurückgeblieben war, erfolgte eine 30-minütige Trocknung bei 400 bis 600 mbar Unterdruck. Der entstandene dünne Lipidfilm wurde mit 1000 µL 1x Proteoliposomenpuffer (2.9.3) mit 20 mM β -Mercaptoethanol bei pH 7,2 versetzt und darin unter Schütteln und Vortexen resuspendiert. Zum Schluss wurde die Suspension zu 200 µL in 1,5 mL Eppendorfgefäße aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80°C .

Für die Herstellung der Proteoliposomen wurde für jedes Konstrukt ein Aliquot mit 200 µL multilamellaren Liposomen auf Eis aufgetaut und mit 20 µL 1x Proteoliposomenpuffer versetzt. Nachdem die Liposomen vollständig aufgetaut waren, wurden diese mit einer Pasteurpipette in Glasröhrchen überführt und sofort mit Stickstoff begast. Im Anschluss wurden die Röhrchen mit einem Stopfen und Parafilm[®] luftdicht verschlossen und für 90 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Dabei wurde alle 30 Minuten das Wasser gewechselt, um einen zu starken Temperaturanstieg zu verhindern. Dann wurden die Liposomen mit der jeweiligen Proteinlösung (100 µg Protein) und dem Detergens, mit dem das Protein solubilisiert ist, versetzt und anschließend auf 1 mL mit 1x Proteoliposomenpuffer aufgefüllt. Nach 30 Minuten auf Eis wurden die Mischungen auf 25 mL Proteoliposomenpuffer aufgefüllt, in Ultrazentrifugenröhrchen austariert und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Im Anschluss wurde 45 Minuten bei 4°C und 140.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde

Methoden

vollständig entfernt und die Proteoliposomen im Pellet in 1 mL 1x Proteoliposomenpuffer resuspendiert.

Um für die spätere Messung z.B. an der Stopped-flow eine möglichst gleichmäßige Größenverteilung der Proteoliposomen zu haben und Konglomerate zu vermeiden wurden die Proteoliposomen durch einen 0,2 µm Filter zehn Mal extrudiert.

3.3.6 Dichtegradientenzentrifugation

Um die Rekonstitution von Proteinen in Liposomen zu überprüfen wurde eine Charge Proteoliposomen parallel mit Leerliposomen einer Zentrifugation in einem sechs Stufigen Saccharosegradienten unterzogen. Dabei reichern sich Proteoliposomen und nicht rekonstituierte Proteine entsprechend ihrer Dichte in unterschiedlichen Stufen an.

Zunächst wurden 350 µL 60 % Saccharose-Lösung in Seton *open-top centrifuge tubes Polyclear*[®] vorgelegt. Diese wurde mit 350 µL der Liposomen- oder Proteoliposomen-Suspension gut gemischt. Anschließend wurde ein Korkstück auf der Oberfläche platziert und in absteigender Konzentration jeweils 700 µL der Saccharose-Lösungen mit 25 % bis 0 % vorsichtig geschichtet. Die Gefäße wurden mit 0 % Saccharose-Lösung exakt austariert und dann bei 4 °C und 164.000 g für sechs Stunden zentrifugiert. Die einzelnen Schichten wurden nach der Zentrifugation vorsichtig abgenommen und in 1,5 mL Eppendorfgefäße überführt. Anschließend wurde mittels TCA-Fällung (3.2.3) das Protein gereinigt und konzentriert. Die Auswertung erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot.

3.3.7 Herstellung von Hefeprotoplasten

Bei den Lichtstreuungsmessungen mit der Stopped-flow Aparatur kann qualitativ die Passage von Soluten über Zellmembranen untersucht werden. Besonders interessant sind hierbei Veränderungen durch im Modelorganismus exprimierte exogene Kanalproteine und Transporter. Um ein Schwell- und Schrumpfverhalten der Hefezellen und damit ein auswertbares Signal-Rausch-Verhältnis der Messung zu gewährleisten, wurde die starre Zellwand mit Zymolyase 20T aus *Arthrobacter luteus* verdaut. Es handelt sich hierbei um ein Enzymgemisch, welches vorwiegend β-1,3 Glucanbindungen spaltet, aber auch eine Proteaseaktivität von 10⁴ U g⁻¹ aufweist, weshalb die zu untersuchenden Kanalproteine durch Zusatz von Rinderserum-Albumin (BSA) im Überschuss geschützt wurden. Für die Herstellung wurden aus einer Vorkultur der transformierten Hefe eine 50 mL Kultur in SD-KHL-Medium für BY4742Δfps1-Hefezellen oder in SD-AHLW bei W3031AΔjen1Δady2-Hefezellen

Methoden

angeimpft und über Nacht bei 29 °C unter Schütteln bei 220 U min⁻¹ auf eine OD₆₀₀ von 1 herangezogen und durch zentrifugieren für 5 Minuten bei 2.000 g und 4 °C für 5 Minuten geerntet. Nach Waschen mit 5 mL Puffer I (2.9.2) wurde das Nasspelletgewicht notiert, dieses in 2 mL Puffer I resuspendiert, und für 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 4 mL Puffer II (2.9.2), etwa 100 mg BSA und Zymolyase 20T entsprechend dem Nasspelletgewicht (200 U g⁻¹) zugegeben und unter leichtem Schütteln bei 140 U min⁻¹ für 60 bis 120 Minuten inkubiert und die entstandenen Protoplasten vorsichtig bei 2.000 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Waschen mit 5 mL Puffer III wurde das Pellet in 2 mL Puffer III (2.9.2) unter vorsichtigem Schwenken resuspendiert und für die Messung auf eine OD₆₀₀ von 2 mit Puffer III eingestellt.

3.4 Funktionsassays

3.4.1 Lichtstreuungsmessung Stopped-flow

Es handelt sich um ein Verfahren zur kinetischen Untersuchung schnell ablaufender Prozesse. So können durch ein schnelles Mischen zweier oder mehrerer Flüssigkeiten in einer Messküvette und eine zeitabhängige Aufnahme des Messsignals mittels eines Fluoreszenzdetektors spektroskopische Änderungen der Analyse registriert werden. Praktisch wurden hierbei Hefeprotoplasten (3.3.7) osmotischem Stress ausgesetzt und über ihr Schwell- und Schrumpfverhalten Rückschlüsse auf die Permeabilität der Plasmamembran oder darin exprimierte endogene oder exogene Proteine gezogen. Ähnlich wurde mit in Liposomen rekonstituierten Proteinen (3.3.5) verfahren. Dabei ist die Signalstärke der Lichtstreuung durch die suspendierten Hefeprotoplasten umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Selbes gilt für Proteoliposomen. Ein Schrumpfen oder Schwellen wird dadurch erreicht, dass die äußeren osmotischen Bedingungen mit verschiedenen Puffern (hyperosmotisch) verändert und die Signalstärke der resultierenden Lichtstreuung mit der Biokine[®]-Software als Spannung in Volt gegen die Zeit aufgezeichnet werden.

Der Puffer III in dem die Protoplasten zu Beginn der Messung suspendiert vorliegen, enthält 1,2 M Saccharose als Osmolyt. Damit wird eine Umgebung geschaffen, die an die natürliche Osmolarität des Zellinneren angepasst ist und somit den normalen Zellturgor imitiert. Durch Mischen mit einem hyperosmolaren Messpuffer in der Küvette der Stopped-Flow-Apparatur wurde diese Zellsuspension in ein Ungleichgewicht zwischen innen und außen gebracht und die daraus resultierende Änderung der Lichtstreuung, bedingt durch Schwellen und Schrumpfen registriert. Hierbei kamen neben den primär für die Wasserleitfähigkeit bestimmten Puffern mit

Methoden

1,8 M Saccharose als Osmolyt auch Kombinationen aus 1,2 M Saccharose + 0,6 M Glycerol für die Glycerolleitfähigkeit zum Einsatz.

Tabelle 7: Parameter für die Messung mit der Stopped-flow Aparatur

Xe/Hg-Bogenlampe	150 W
Monochromator	526 nm
Output Filter	300 μ s
Photomultiplier	400 x
Temperatur	20 °C
Injektionsvolumen	150 μ L
Mischungsverhältnis	1 : 1
Injektionsgeschwindigkeit	7 mL s ⁻¹
Erwartete Totzeit	5,2 ms
Datenpunkte	2000

Für jedes Experiment wurden 6 bis 9 Kurven aufgezeichnet und mit der Biokine[®]-Software gemittelt. Die Mischung der Protoplastensuspension mit hyperosmotischem Glycerol-Testpuffer im Verhältnis 1 zu 1 erzeugte einen biphasischen Kurvenverlauf, der sich durch folgende Gleichung beschreiben lässt, welche zudem die Grundlage für das Kurvenfitting mit Biokine[®] bildete:

$$y = at + b - c_w e^{-d_w t} + c_{sol} e^{-d_{sol} t}$$

a: Steilheit

t: Zeit in s

b: Achsversetzung (Offset)

c_w: Amplitude Wasserausstrom

d_w: Ratenkonstante Wasserausstrom

c_{sol}: Amplitude Soluteinstrom

d_{sol}: Ratenkonstante Soluteinstrom

Im ersten Kurvenabschnitt kommt es zu einem exponentiellen Anstieg des Streulichtsignals durch ein Schrumpfen der Protoplasten, welches durch den osmotisch bedingten Wasserausstrom hervorgerufen wird. Im zweiten Abschnitt wird das Protoplastenvolumen

Methoden

durch einen chemischen Solutgradienten überkompensiert. Der Solut strömt in die Protoplasten und sorgt durch die resultierende Änderung des osmotischen Gradienten zu einem Wiedereinstrom von Wasser. Dadurch schwellen die Protoplasten und das Streulichtsignal nimmt wieder ab.

Bei Konstrukten, die keine Leitfähigkeit für eines der verwendeten Osmolyte zeigen, bleibt das Abfallen der Streulichtkurve im zweiten Abschnitt der Messung aus. In dem Fall kann mit Hilfe eines einfach exponentiellen *fittings* die Ratenkonstante für die Wasserleitfähigkeit direkt bestimmt werden.

$$y = a (1 - e^{-k_w t})$$

a: Steilheit

t: Zeit in s

k_w : initiale Wassereinstromskonstante in s^{-1}

Um eine Vergleichbarkeit verschiedener Messkurven zu erreichen wurde der Startpunkt der Signaländerung der Messkurve auf 0 Volt festgelegt und das Plateau durch Multiplikation mit einem Faktor auf 1 Volt gestreckt.

4. Ergebnisse

Bei der Betrachtung der Funktion eines möglichen Aquaporins ist es naheliegend sich mit der Eigenschaft dieser, für Wasser und im Falle der Aquaglyceroporine auch kleine ungeladene Solute, wie Glycerol, permeabel zu sein, näher zu beschäftigen. Deswegen wurden mit einem auf Hefe basierten Assay unter Verwendung der Stopped-flow Apparatur die Permeabilität untersucht.

Die Expression von PfAQP2 erfolgte wie in 3.2.1 beschrieben nach vorheriger Transformation von *S. cerevisiae* Zellen (3.1.12). Dies geschah als einfache und günstige Möglichkeit um durch Protoplastierung (3.3.7) eine Charakterisierung hinsichtlich der Passage von Wasser und anderen für Aquaglyceroporine typische Solute mit Hilfe der Stopped-flow Apparatur durchzuführen. Die erfolgreiche Expression konnte zunächst nicht durch einen Western-Blot nachgewiesen werden. Ein ähnliches Problem war schon für das durch Hefen hergestellte PfAQP1 bekannt, für das trotzdem eine Funktion in Hefe nachgewiesen werden konnte. Es konnte allerdings keine Leitfähigkeit für PfAQP2 gezeigt werden. Deshalb wurde zusätzlich, mit der Expression im zellfreien System (3.3), eine alternative Methode herangezogen, um die erhaltenen Daten abzusichern.

Als letztes wurden für die bessere Charakterisierung spezifische Antiseren aus Kaninchen generiert (3.2.7) die letztendlich eine zuverlässige Detektion ermöglichen sollen und in Zukunft für biologische Untersuchungen eingesetzt werden.

4.1 Expression und Funktionsuntersuchung von PfAQP2 in *S. cerevisiae*

4.1.1 Nachweis der Expression in *S. cerevisiae*

Die Kontrolle der Expression erfolgte direkt aus den für Messung an der Stopped-flow präparierten Protoplasten. Diese wurden zunächst wie normale Hefezellen aufgeschlossen (3.2.1) und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (3.2.4). In Abbildung 13 ist das Ergebnis der Detektion mittels Western-Blot zu sehen. Verwendet wurde der N-terminale Anti-HA-Antikörper. Im Blot sind keine unspezifischen Banden beim Leervektor pDRTXa (-) zu sehen. TbAQP2 liefert eine deutliche Bande bei etwa 35 kDa, was dem theoretischen Molekulargewicht entspricht. Es finden sich keine Banden für die *Plasmodium falciparum* Proteine. Weder PfAQP1 noch PfAQP2 liefern ein Signal. Für PfAQP1 war in der Arbeitsgruppe jedoch bekannt, da es trotz fehlender Bande im Western-Blot eine Funktion

Ergebnisse

nachweisbar ist. Deswegen wurde der Lichtstreuungsassay mit den Protoplasten trotzdem durchgeführt.

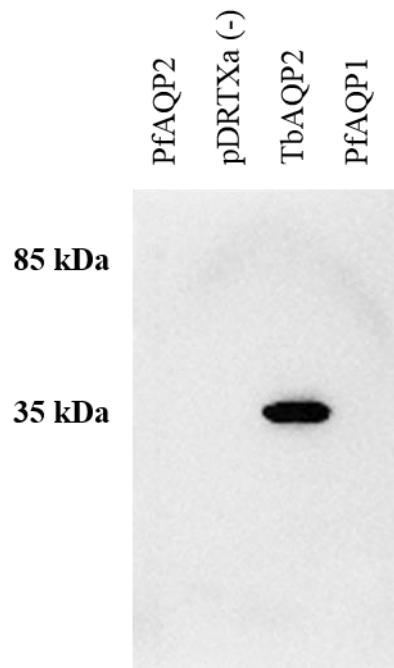


Abbildung 13: Western-Blot des Proteinextraktes der Hefeprotoplasten; Die Proteine besitzen einen N-terminalen HA-tag. Deshalb wurde nach SDS-PAGE mit einem Anti-HA-Antikörper entwickelt. PfAQP1 hat ein Soll-Molekulargewicht von 28 kDa und PfAQP2 von 71 kDa, beide nicht zu sehen. TbAQP2 liefert eine deutliche Bande bei 35 kDa. Die Belichtungszeit beträgt 2 Minuten.

4.1.2 Untersuchung der Leitfähigkeit für Wasser und Glycerol

Die Wasserleitfähigkeit von PfAQP2 wurde durch Messung der Lichtstreuung mit Hilfe der Stopped-flow Apparatur untersucht. Hierzu wurden Hefezellen BY4742 Δ fps1 verwendet, da diese durch einen *Knock-out* keine endogenen Wasser und Glycerol Kanäle exprimieren können. Dies ist wichtig damit bei der Messung einer Leitfähigkeit diese nur vom Protein, welches untersucht werden soll, abhängt. Dazu wurden die Hefen mit DNA, die für PfAQP2 kodiert, transformiert und in SD-KHL-Flüssigmedium kultiviert. Die Hefe-Zellen wurden dann mit Zymolyase, einem Enzymgemisch das vorwiegend β -1,3-glykosidische Bindungen spaltet, behandelt, um die rigide Zellwand zu entfernen. Die dabei erhaltenen Protoplasten sind gut geeignet, um Wasserbewegung durch Membranen zu untersuchen, da sie auf osmotische Veränderungen mit Schwellen oder Schrumpfen reagieren. Für die Messung der Wasserleitfähigkeit wurde dabei standardmäßig Saccharose als Osmolyt verwendet. Diese ist in der Lage einen osmotischen Gradienten zu erzeugen, ohne selbst die Membran der Protoplasten passieren zu können. Bei der Messung wird ein Saccharose-Gradient von 300 mOsm erzeugt. Dieser ist zum extrazellulären Bereich gerichtet und sorgt dafür, dass die Protoplasten in einem Einphasigen exponentiellen Verlauf schrumpfen, da Wasser dem

Ergebnisse

Gradienten nach außen folgend ausströmt. Alternativ wurde ein 300 mOsm Glycerol-Gradient verwendet, um in einem zweiphasig exponentiellen Kurvenverlauf Auskunft über die Leitfähigkeit für Glycerol zu erlangen, und die Frage zu beantworten ob es sich um ein Aquaglyceroporin handelt.

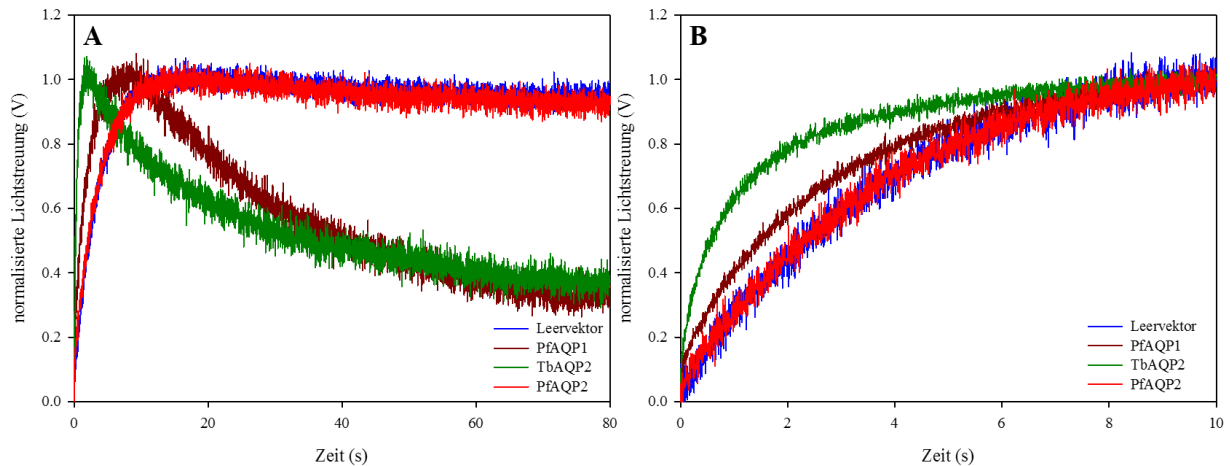


Abbildung 14: Stopped-flow Messung von TbAQP2 (grün), PFAQP 1 (lila) und PFAQP2 (rot) exprimierenden Hefen im Vergleich zu Hefen, die kein Protein exprimieren (blau); **A** zeigt die Messung über 80 Sekunden mit einem 300 mM hyperosmotischen Glycerolgradienten, **B** zeigt die Messung der gleichen Protoplasten über 10 Sekunden mit 300 mM hyperosmotischem Saccharosegradienten; jede Kurve stellt den Mittelwert einer Messreihe von 9 Kurven da

Als Positivkontrolle wurden Hefeprotoplasten, die TbAQP2 exprimieren eingesetzt, da dieses sowohl Wasser als auch Glycerol leitet. Diese zeigen einen schnellen initialen Wasserausstrom. Durch ein einfach exponentielles *fitting* der Messkurven aus Abbildung 14 mit SigmaPlot® lässt sich die Ratenkonstante für den Wasserausstrom mit $k_i = 0,92 \text{ s}^{-1}$ bestimmen. Protoplasten, die kein heterologes Protein exprimieren, zeigen einen deutlich langsameren Wasserstrom ($k_w = 0,27 \text{ s}^{-1}$). PFAQP2 unterscheidet sich im Schrumpfverhalten praktisch nicht vom Leervektor ($k_w = 0,27 \text{ s}^{-1}$). PFAQP1 zeigt Wasserleitfähigkeit ($k_w = 0,35 \text{ s}^{-1}$) und Glyceroleinstrom ($k_{sol} = 0,024 \text{ s}^{-1}$) in einer Größenordnung, wie sie bereits in der Arbeitsgruppe beschrieben wurde. In Tabelle 8 sind die Wasserleitfähigkeitskonstanten für die Messung zusammengefasst.

Ergebnisse

Tabelle 8: Wasserleitfähigkeitskonstanten k_w (s^{-1}) und τ (s) für TbAQP2, PfAQP1 und PfAQP2 sowie die Negativkontrolle. Die τ -Wert gibt den Initialen Wassereinstrom als Zeit, bis zu der 63,5% des Einstroms abgeschlossen sind an und stellt den reziproken Wert der Leitfähigkeitskonstante dar.

	Wasserleitfähigkeitskonstante	Glycerolleitfähigkeitskonstante	τ (s)
	k_w (s^{-1})	k_{sol} (s^{-1})	
TbAQP2	0,92	0,030	1,1
PfAQP2	0,27	0,004	3,7
Leervektor	0,27	0,003	3,7
PfAQP1	0,35	0,024	2,9

Obwohl im Western-Blot keine Expression gezeigt werden konnte, ist die Funktion von PfAQP1 deutlich am Wasserausstrom und Glyceroleinstrom in Abbildung 14 zu erkennen. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Protein exprimiert wird, allerdings die Detektion nicht funktioniert. Möglicherweise trifft dies auch auf PfAQP2 zu.

4.1.3 Einfluss der Loops auf die Wasserleitfähigkeit von PfAsQP2

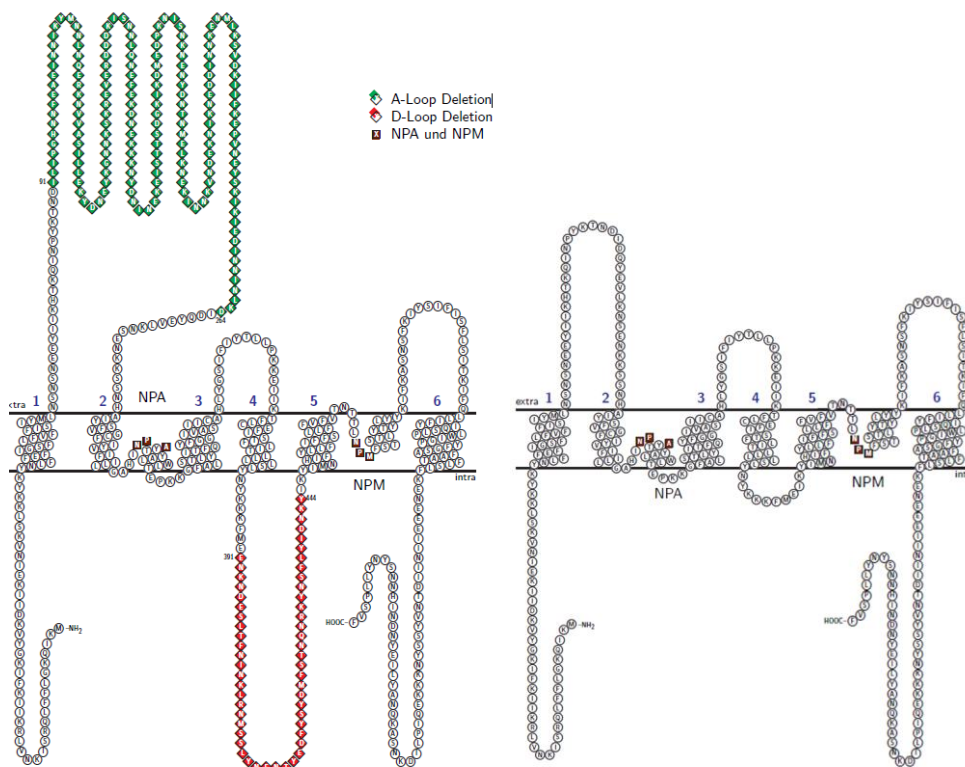


Abbildung 15: Topologieplots von PfAQP2 links vor Verkürzung und rechts nach Verkürzung der Loops A und D. Topologieplots wurden mit dem TeXtopo Packet für LaTeX erstellt [90].

Ergebnisse

In bisherigen Experimenten zeigt das Wildtyp PfAQP2 keine Leitfähigkeit für Wasser. Anhand der Sequenzanalyse ist zu erkennen, dass die Primärstruktur im Vergleich zu anderen orthodoxen Aquaporinen, selbst für Aquaporine stark unterschiedlich ist. In den entscheidenden Kernregionen gibt es viele konservierte Bereiche. Andere Bereiche sind untypisch, wie der außerordentlich große A-Loop und der lange D-Loop des Proteins, welche beide in der Lage sein könnten, den Porendurchgang zu verschließen oder nur unter bestimmten Bedingungen freizugeben. Deswegen wurden die beiden Loops verkürzt (PfAQP2 Δ A Δ D, Abbildung 15). Der A-Loop wurde dabei durch Restriktionverdau (3.1.7) mit *EcoRV* und anschließender Ligation (3.1.9) entfernt. Der D-Loop wurde durch eine Deletions-PCR (3.1.10) entfernt. Abbildung 16 zeigt das Schwellverhalten von Hefeprotoplasten, bei einem hyperosmotischen Saccharosegradienten von 300 mOsm. Hierbei ist die A und D Loop deletierten Variante von PfAQP2 untersucht worden, da eine Leitfähigkeit des Wildtyp PfAQP2 sehr wahrscheinlich auch in dieser Form sichtbar ist. Als Kontrolle dient mit Leervektor transformierte Protoplasten. Im zugehörigen Western-Blot sind mit dem Anti-*penta*-His Antikörper keine Banden zu sehen gewesen.

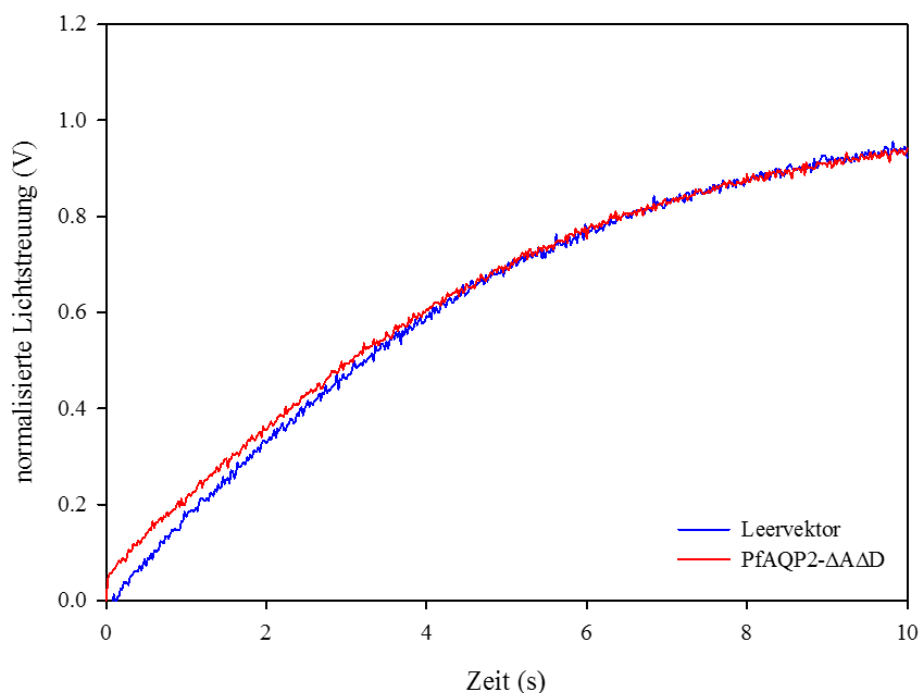


Abbildung 16: Schwellkurven von PfAQP2 Δ A Δ D. Die Kurven wurden über eine Messdauer von 10 Sekunden bei einem 300 mOsm Saccharosegradienten aufgenommen. Jede Kurve stellt den Mittelwert aus einer Messreihe von 9 Kurven da

Mit verkürztem A und D-Loop zeigt PfAQP2 keine bessere Leitfähigkeit für Wasser als die Negativkontrolle ($k_w = 0,24 \text{ s}^{-1}$).

Ergebnisse

4.1.4 Wasserleitfähigkeit der Mutanten F477R und Y454A

Neben den bereits erwähnten Ähnlichkeiten gibt es auch einige wichtige Unterschiede. Das bei orthodoxen Aquaporinen hochkonservierte Arginin des Selektivitätsfilters, ist gegen ein ungeladenes und aromatisches Phenylalanin ausgetauscht. Eine weitere im Porenbereich vermutete Aminosäure ist das Tyrosin an der Position 454. Diese befindet sich im Bereich der intrazellulären Konstriktion des NPA/NPM-Motivs. Dieser Bereich ist bei anderen Aquaporinen durch eher kleinere, lipophile Aminosäuren wie Glycin, Valin und Leucin gekennzeichnet. PfAQP2 besitzt in diesem Bereich viele Phenylalanine und das Tyrosin 454. Ein anderes Merkmal ausgehend von diesem Konstrukt wurden zusätzlich das Tyrosin 454 zu Alanin (Y454A) und Phenylalanin 477 zu Arginin (F477R) mittels PCR mutiert.

Abbildung 17 zeigt das Schwellverhalten von Hefeprotoplasten, bei einem hyperosmotischen Saccharosegradienten von 300 mOsm. Hierbei sind die beiden Mutanten F477R und Y454A in der A und D Loop deletierten Variante von PfAQP2 untersucht worden, da eine Leitfähigkeit des Wildtyp PfAQP2 sehr wahrscheinlich auch in dieser Form sichtbar ist. Als Kontrolle dienen mit Leervektor transformierte Protoplasten. Im zugehörigen Western-Blot sind mit dem Anti-*penta*-His Antikörper keine Banden zu sehen

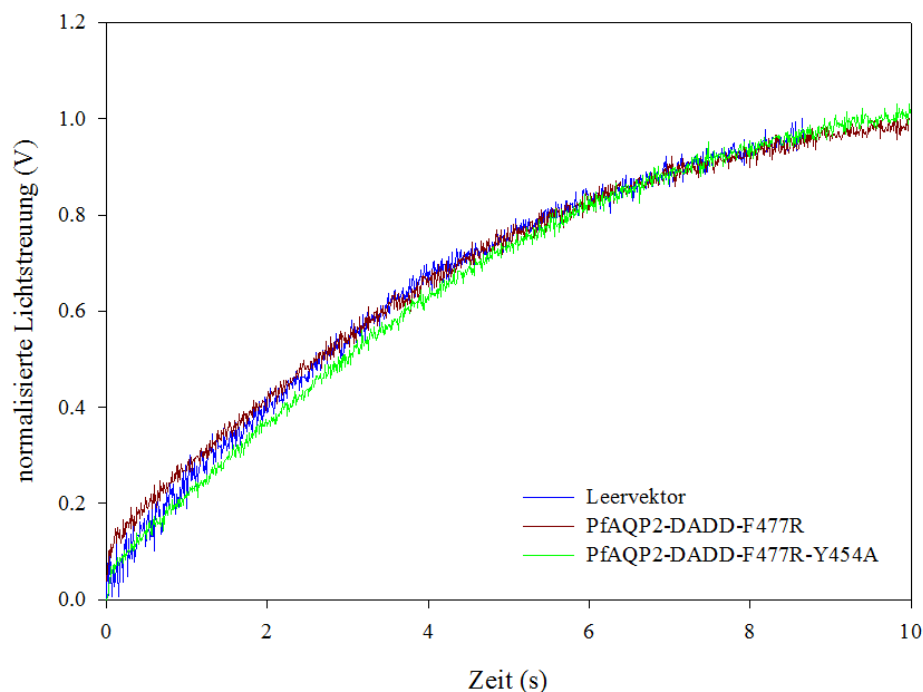


Abbildung 17: Schwellkurven der PfAQP2 Δ A Δ D Mutanten PfAQP2 Δ A Δ D-F477R und PfAQP2 Δ A Δ D-F477R.-Y454A. Die Kurven wurden über eine Messdauer von 10 Sekunden bei einem 300 mOsm Saccharosegradienten aufgenommen. Jede Kurve stellt den Mittelwert aus einer Messreihe von 9 Kurven da

Ergebnisse

Die Ratenkonstanten für den initialen Wassereinstrom (k_w) der einzelnen Mutanten wurden durch exponentielles *fitting* mit SigmaPlot bestimmt. Der k_w -Wert für das nicht mutierte verkürzte Protein PfAQP2 $\Delta\Delta$ AD liegt bei $0,23 \text{ s}^{-1}$, für die einfache Mutante PfAQP2 $\Delta\Delta$ DF477R bei $0,26 \text{ s}^{-1}$ und die Doppelmutante PfAQP2 $\Delta\Delta$ DF477R-Y454A bei $0,22 \text{ s}^{-1}$. Da diese Werte alle vergleichbar mit den Ratenkonstanten von Leervektorhefen ($k_w = 0,27 \text{ s}^{-1}$) und dem Wildtyp PfAQP2 ($k_w = 0,27 \text{ s}^{-1}$) sind, zeigen die einzelnen Mutationen keinen Einfluss auf die Leitfähigkeit für Wasser. Möglicherweise sind die untersuchten Stellen nicht alleine oder entscheidend für die Abwesenheit der Wasserleitfähigkeit verantwortlich. Ohne eine aufgeklärte Proteinstruktur oder bekannte Proteine, die eine größere Ähnlichkeit zum PfAQP2 aufweisen, kann über die tatsächliche Porenstruktur und die Ursachen für die ausbleibende Leitfähigkeit nur spekuliert werden. Sie ist jedoch definitiv komplexer und stärker abgewandelt, als die untersuchten Aminosäuren abbilden können.

4.1.5 Leitfähigkeit für organische Anionen

Für das humane Aquaporin 9 ist die Leitfähigkeit für protonierte Monocarboxylate und größere organische Verbindungen gut untersucht [79]. Es ist nicht klar, ob PfAQP2 eine vergrößerte Pore bildet, aber durch den natürlichen Austausch von Arginin 477 zu Phenylalanin wird die Lipophilie der Engstelle am Poreneingang deutlich erhöht. Wasser und Glycerol könnten demnach als Substrate durch einen Mangel an Wasserstoffbrückenbindungen ausgeschlossen sein. Deshalb soll in einem Experiment getestet werden, ob eine Permeabilität für kleinere und lipophilere Monocarboxylate wie Formiat oder auch Laktat besteht. Hierbei wurden wieder Hefeprotoplasten vorbereitet, um durch Messung der Lichtstreuung das Schwell- und Schrumpfverhalten zu untersuchen. Dabei wurde zum einen der Hefestamm W3031A Δ jen1 Δ ady2 verwendet, da dieser keine endogenen Monocarboxylat-Transporter exprimiert, die bei der Messung die Ergebnisse verfälschen könnten. Zum anderen wurde als Osmolyt Formiat oder Laktat mit einem finalen Gradienten von 300 mOsm eingesetzt. Die Ergebnisse der Messung mit Formiat sind in Abbildung 18 zu sehen. Dabei wurden zwei pH-Werte, 4,5 und 6,8, als Messbedingung gewählt, um verschiedene Protonierungsgrade abzubilden. Unter der Annahme, dass wie beim AQP9 die ungeladene, protonierte Form der Säure passiert, sollte bei pH 4,5 ein schnellerer Strom als bei 6,8 zu beobachten sein. Als Testkonstrukte wurden PfAQP2, sowie die A und D-Loop Doppeldeletions-Mutante verwendet. Zur Kontrolle wurden Protoplasten präpariert, die kein exo- oder endogenes Protein herstellen. Abbildung 18 zeigt jeweils die aufgenommenen Streulichtkurven für die erste Messung der Formiatleitfähigkeit bei pH 6,8. In Abbildung 18 D sind die durch exponentielles *fitting* berechneten Ratenkonstanten für Wasser und Formiat bei pH 6,8 zu sehen. Bei pH 6,8 findet

Ergebnisse

kein Formiateinstrom in die Protoplasten statt. Der Wasserausstrom verändert sich zwischen den Konstrukten bei pH 6,8 nicht. Unter physiologischen Bedingungen kann demnach weder PfAQP2 noch die verkürzte Variante Formiat leiten.

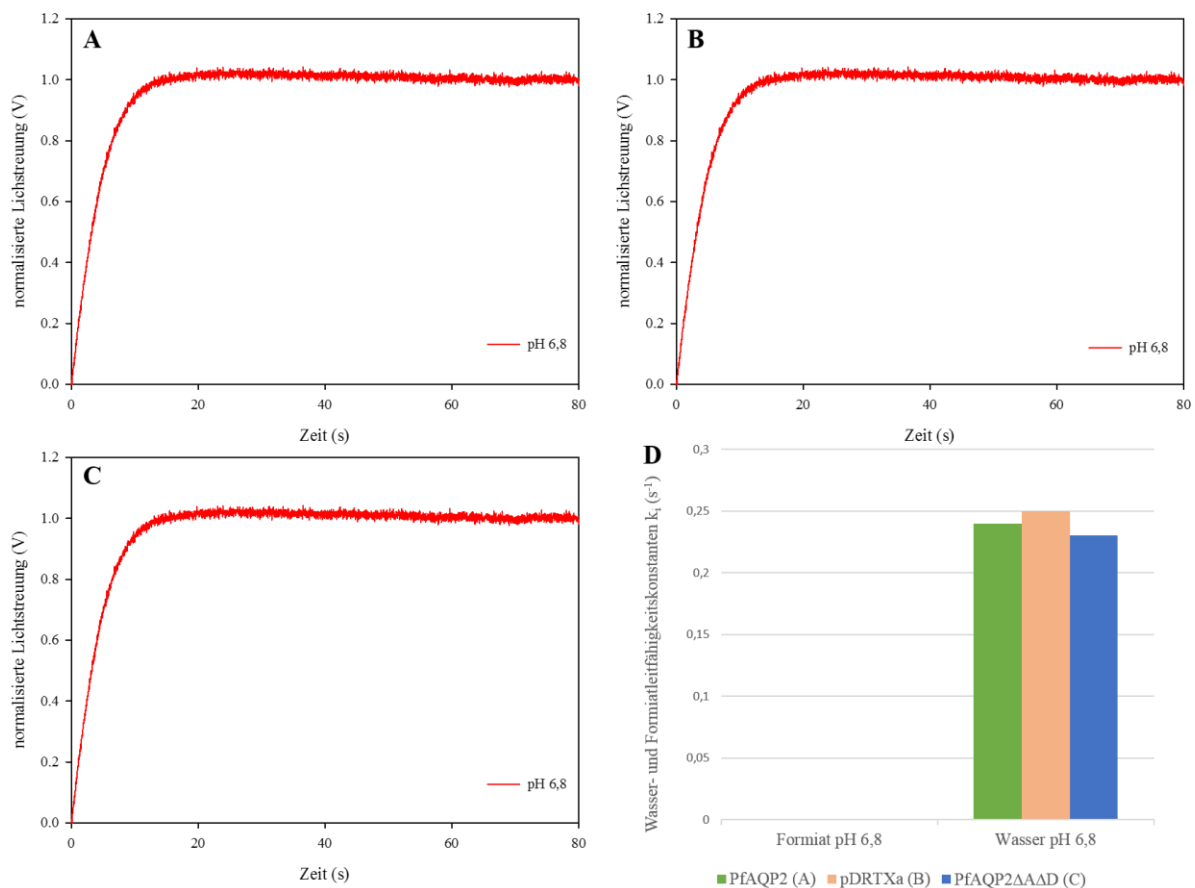


Abbildung 18: A-C zeigen jeweils die Formiatleitfähigkeit von Hefeprotoplasten bei pH 6,8 (rot) für A) PfAQP2, B) pDRTXa (-) und C) PfAQP2ΔAΔD. D zeigt die durch zweifach exponentielles *fitting* berechneten Ratenkonstanten für Wasser und Formiat. Jede Kurve stellt den Mittelwert einer Messreihe von 9 Kurven da

Das Experiment wurde mit Laktat als Osmolyt bei pH 6,8 wiederholt. Abbildung 19 zeigt hierbei die Streulichtkurven der Messung. Auch für Laktat ist kein Solutstrom zu beobachten. In Abbildung 19 D sind die durch exponentielles *fitting* berechneten Ratenkonstanten für Wasser und Laktat bei pH 6,8 zu sehen. Auch hier ist wie zuvor bei Formiat kein Wassereinstrom im Vergleich zur Kontrolle zu sehen.

Laktat und Formiat weisen beide ähnliche Säurestärken auf. Ihr pK_a -Wert liegt im Bereich von 3,8. Dies bedeutet, dass bei einem pH-Wert von 6,8 praktisch die komplette Carbonsäure deprotoniert vorliegt. Leitfähigkeit von Monocarboxylaten wurde aber bisher nur für die neutrale, protonierte Form beschrieben. Deshalb wurde das Experiment erneut bei einem pH von 4,5 durchgeführt. Abbildung 20 zeigt in blau die Messkurven mit Formiat als Osmolyt und

Ergebnisse

in rot die Messkurven mit Laktat als Osmolyt. Die Erniedrigung des pH-Wertes um 2 Einheiten hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Laktatleitfähigkeit.

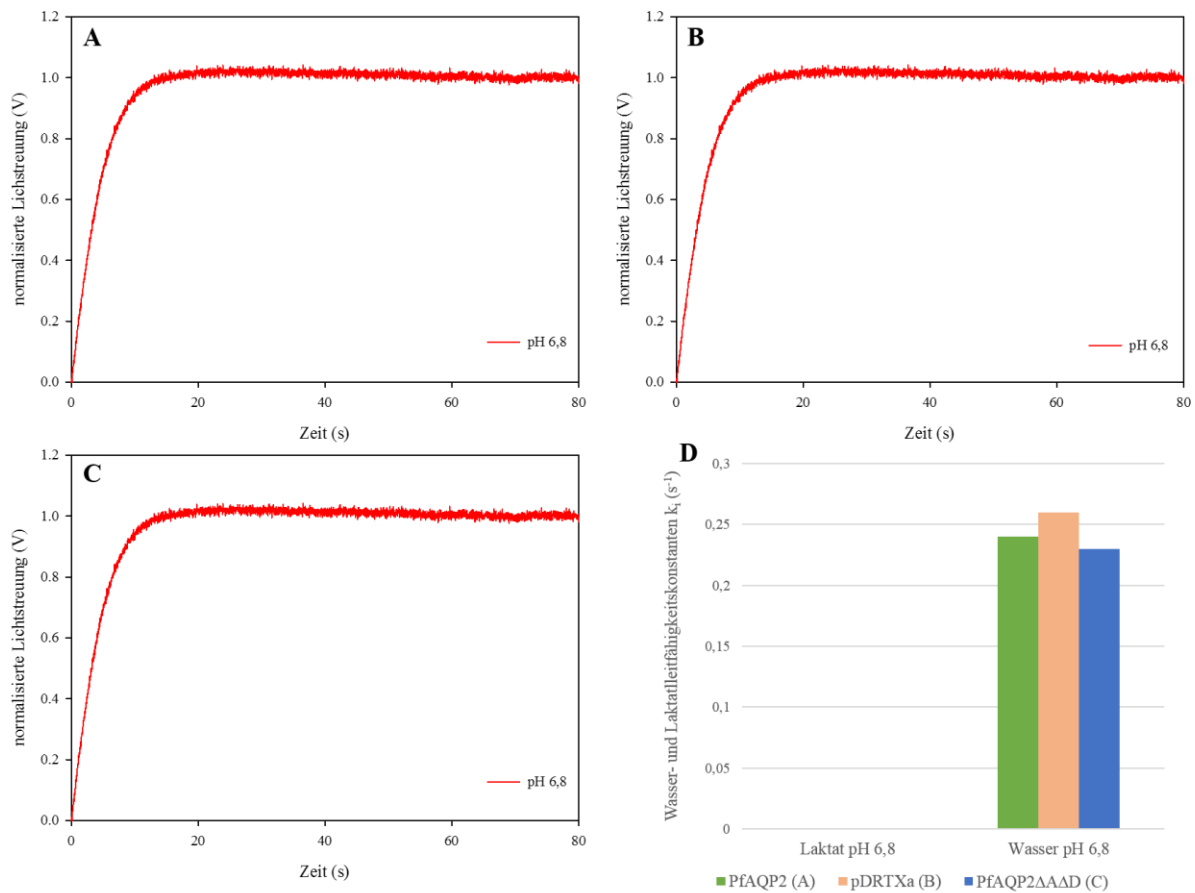


Abbildung 19: **A-C** zeigen jeweils die Laktatleitfähigkeit von Hefeprotoplasten bei 6,8 (rot) für **A**) PfaQP2, **B**) pDRTXa (-) und **C**) PfaQP2ΔAΔD. **D** zeigt die durch zweifach exponentielles *fitting* berechneten Ratenkonstanten für Wasser und Laktat. Jede Kurve stellt den Mittelwert einer Messreihe von 9 Kurven da

Die Formiat Kurven deuten im zweiten Kurvenabschnitt auf einen Einstrom des Osmolyten bei pH 4,5 hin. Dies ist jedoch unabhängig vom untersuchten Konstrukt und deutet auf ungehinderte Diffusion von Formiat über die Plasmamembran hin. Die Wasserleitfähigkeiten im ersten Abschnitt der Kurve sind durch die Erniedrigung des pH-Wertes, sowohl für Laktat als auch Formiat, unverändert. Bei pH 4,5 liegt nach Henderson-Hasselbalch-Gleichung ungefähr 18,5 % der Ameisensäure protoniert vor. Diese ist demnach ungeladen und kann als kleines ungeladenes Molekül offenbar ganz gut die Membran, auch ohne Kanal oder Transporter, passieren. Bei der Milchsäure ist dieser Effekt nicht zu sehen. Obwohl die Säurestärke ähnlich ist und nach Henderson-Hasselbalch-Gleichung sogar bis zu 25 % der freien Säure vorliegen. Jedoch befindet sich noch eine Hydroxyl-Gruppe am α -Kohlenstoffatom der Milchsäure. Dadurch ist das Molekül auch in der protonierten Form

Ergebnisse

deutlich hydrophiler als die Ameisensäure. Außerdem ist das Molekül der Milchsäure größer, weshalb offensichtlich keine Diffusion durch die Membran erfolgen kann.

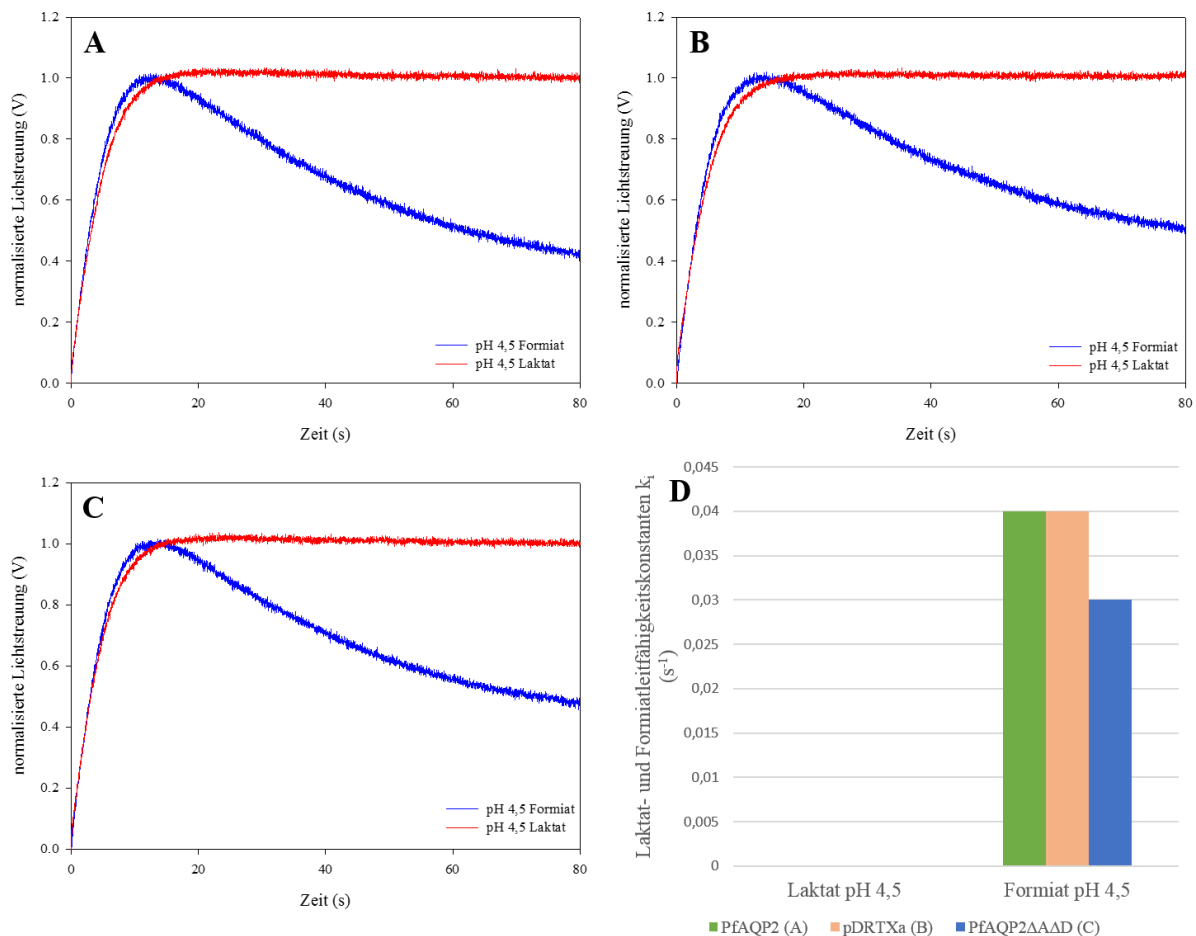


Abbildung 20: A-C zeigen jeweils die Laktatleitfähigkeit (rot) und Formiatleitfähigkeit (blau) von Hefeprotoplasten bei pH 4,5 für A) PfaQP2, B) pDRTXa (-) und C) PfaQP2ΔAΔD. D zeigt die durch zweifach exponentielles *fitting* berechneten Ratenkonstanten für Laktat und Formiat. Jede Kurve stellt den Mittelwert einer Messreihe von 9 Kurven da

Diesen Ergebnissen nach ist die Hypothese, PfaQP2 könnte vielleicht Monocarboxylate durch seine deutlich lipophilere Filterregion leiten, widerlegt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein Absinken des pH-Wertes zu keiner Beeinflussung der Wasserleitfähigkeit von PfaQP2 geführt hat. Hinzu kommt, dass die Lokalisation, sowohl innerhalb der Hefe als auch beim Parasiten nicht untersucht ist. Es wäre also denkbar, dass PfaQP2 gar nicht oder nur unter bestimmten Bedingungen an die Plasmamembran lokalisiert wird. Deshalb bietet es sich an, die Leitfähigkeit mit Hilfe eines alternativen Testsystems zu untersuchen. Die Untersuchung von zellfrei hergestelltem Protein in Liposomen bietet hierbei den Vorteil eines auf vesikulärer Ebene deutlich einfacheren Systems.

4.2 Zellfreie Proteinsynthese von PfAQP2

4.2.1 Detergenzienscreen

Der erste Schritt bei der zellfreien Proteinsynthese von Membranproteinen ist das Screening von verschiedenen Detergenzien. Hierbei soll empirisch ein Detergens ermittelt werden, welches zum einen die Synthese einer großen Menge Protein ermöglicht, zum anderen soll es die richtige Faltung des Proteins begünstigen, zumindest aber nicht behindern. Im Arbeitskreis konnte durch Dr. Annika Müller-Lucks bereits gezeigt werden, dass sich ein C-terminal fusioniertes grün fluoreszierendes Protein (GFP) als Indikator für die richtige Faltung eines Proteins eignet. GFP kann durch Anregung mit elektromagnetischer Strahlung bei 395 nm oder 470 nm zur Fluoreszenz angeregt werden. Dabei ist der Fluorophor aus den drei Aminosäuren Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ essenziell. Dieses bildet sich autokatalytisch durch räumliche Nähe, die jedoch nur gegeben ist, wenn das GFP richtig gefaltet ist. Durch die Fusion mit dem C-Terminus, kann bei Vorliegen der GFP-Fluoreszenz davon ausgegangen werden, das PfAQP2 ebenfalls richtig gefaltet vorliegt.

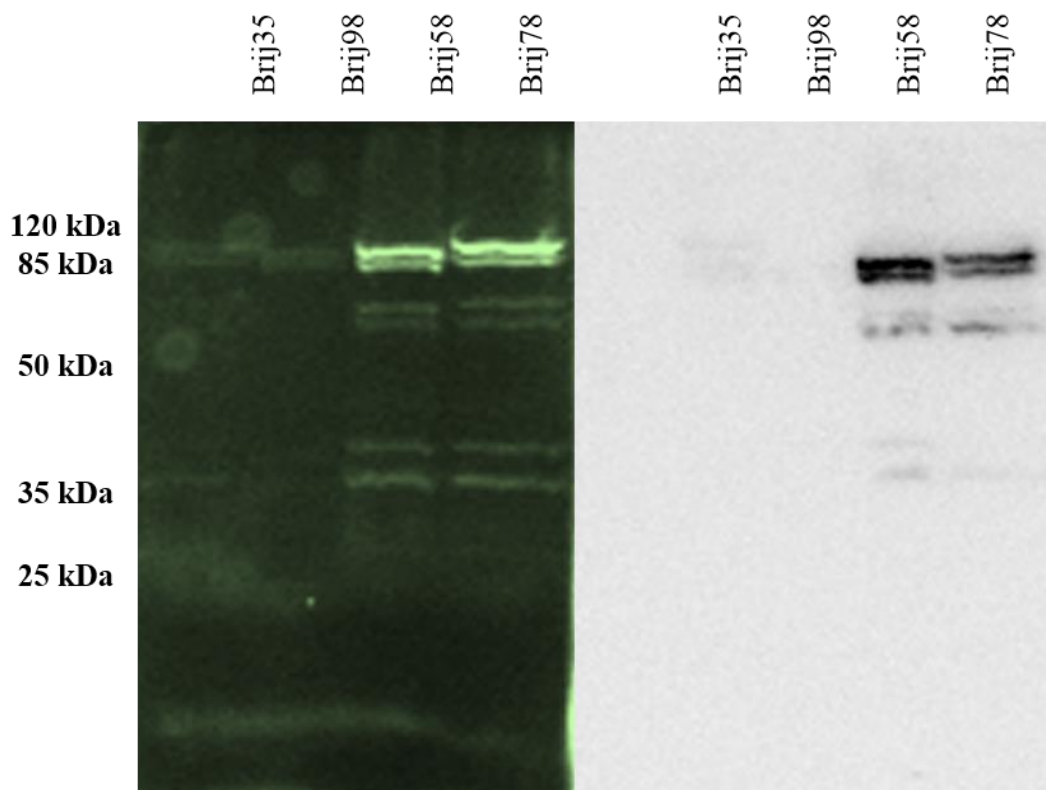


Abbildung 21: Detergenzien-Screen von Brij[®]35 – 98 für die Zellfreie Proteinsynthese von PfAQP2; links: In-Gel Fluoreszenz des GFP, rechts: Western-Blot des Gels; detektiert mit anti-*penta*-His Antikörper 1 zu 5000, 10 Sekunden belichtet

Ergebnisse

Im Screening wurden die Detergenzien Brij[®] 35 (0,2 %), Brij[®] 58 (1,5 %), Brij[®] 78 (1,0 %) und Brij[®] 98 (0,2 %) getestet. Das Reaktionsvolumen von 55 μ L pro Detergens wurde hierfür mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Dann wurde das Gel mit dem Lumi-Imager[™] F1 der Firma Roche angeregt und die Fluoreszenz bei 520 nm als Bild aufgenommen. Das Resultat ist in Abbildung 21 auf der linken Seite zu sehen. Es zeigt eine deutliche Fluoreszenz bei Brij[®] 58 und 78. Die anderen beiden Detergenzien zeigen kaum Fluoreszenz. Die Größe des fluoreszierenden Proteins lässt sich am Proteinmarker abschätzen und entspricht bei der Obersten Bande mit etwa 100 kDa dem Fusionsprotein aus PfAQP2 (71 kDa) und GFP (26 kDa). Die kleineren Banden bei etwa 60 kDa und 40 kDa können durch verschiedene Fragmentierungen des Proteins hervorgerufen worden sein. Im rechten Teil von Abbildung 21 ist der Western-Blot des Gels zu sehen. Dieser differenziert nicht zwischen richtig gefaltet und falsch gefaltet und zeigt sämtliches Protein, das mindestens einen fünffach-His-tag hat. Da in diesem jedoch dasselbe Bandenmuster, wie bereits bei der Fluoreszenz zu sehen ist, wird ausschließlich richtig gefaltetes Protein hergestellt. Es ist somit wahrscheinlich, dass die Doppelbanden durch Fragmentierung zustande kommen.

Es ist jedoch klar zu erkennen, dass von den Detergenzien vom Brij[®]-Typ, 58 und 78 geeignet sind um darin Protein herzustellen. Da Brij[®] 78 im Arbeitskreis ein bewährtes Detergens darstellt, wurde dieses für die Herstellung des Proteins im präparativen Maßstab verwendet.

4.2.2 Reinigungsdetergenzienscreen

Nachdem ein zur Herstellung geeignetes Detergens ausgewählt wurde, konnte dies im präparativen Maßstab (3.3.3) hergestellt werden. Im nächsten Schritt der Herstellung des Proteins muss dieses für weitere Untersuchungen gereinigt werden. Hierfür wurde die Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni^{2+} -NTA) Affinitätschromatographie und ein am C-Terminus mit dem Protein fusionierter 10x His-tag genutzt. Dabei komplexiert das Ni^{2+} -NTA die Histidine des His-tags und bindet somit das Protein an die Matrix. Zur Elution wird eine Reihe von Puffern mit steigender Imidazol-Konzentration verwendet. An dieser Stelle muss erneut die Frage gestellt werden, welches Detergens dem Imidazol-Puffer zugesetzt wird, denn das richtige Detergens für die Herstellung muss nicht zwangsläufig auch für die Reinigung gut sein. Dafür wurden LDAO (0,27 %) und Brij[®] 78 (1 %) getestet.

Im Western-Blot in Abbildung 22 A) ist nach Markierung mit dem Anti-penta-His Antikörper zu sehen, dass sowohl die Fraktionen 80 mM, 100 mM und zu einem geringen Teil 200 mM Imidazol, als auch die beads-Fraktion bei LDAO eine Bande für PfAQP2 liefert.

Ergebnisse

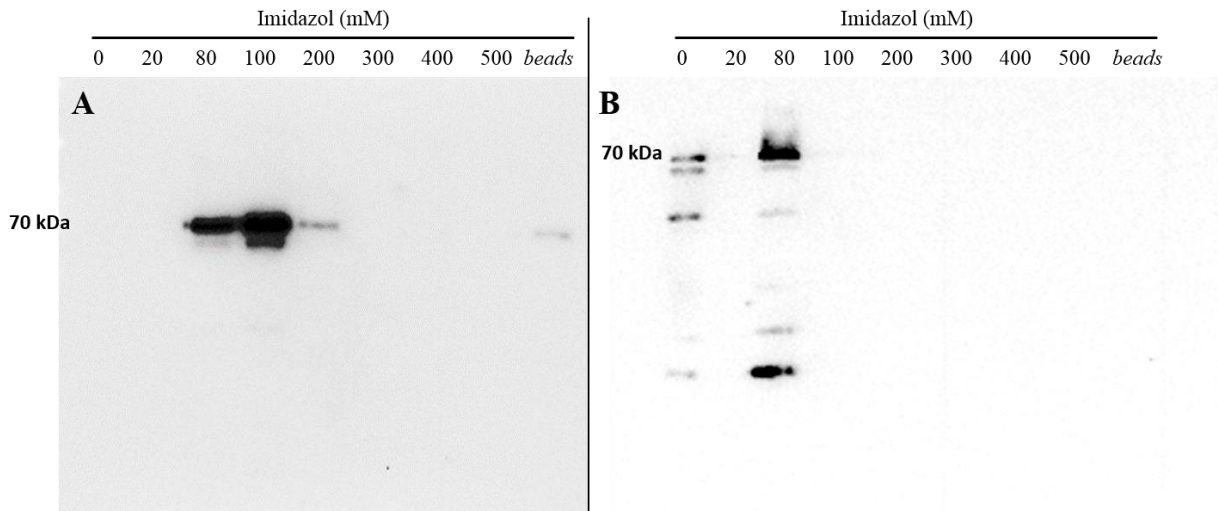


Abbildung 22: Western-Blot von zellfrei hergestelltem PfAQP2 mit C-terminalem His-tag. Protein nach Ni²⁺-NTA Reinigung durchgeführt mit **A**) LDAO und **B**) Brij[®] 78. Aufgetragen wurden 11µL jeder Imidazolfraktion. Der Western-Blot wurde mit dem Anti-*penta*-His Antikörper entwickelt und für 10 Sekunden belichtet.

Die Reinigung funktioniert sowohl mit LDAO, als auch mit Brij[®] 78. Jedoch wird im Western-Blot deutlich, dass die Stabilität des Proteins stark vom Detergens abhängig ist. Mit Brij[®] 78 lässt sich das Protein unter den Bedingungen deutlich besser eluieren, allerdings schon bei 80 mM Imidazol und unter großen Verlusten bei der Stabilität. Die geringe Menge Protein die dem Blot nach noch an die *beads* gebunden vorliegt deutet darauf hin, dass die Bedingungen durch Variation der Pufferbestandteile wie NaCl und Glycerol optimiert werden könnten. Für die Rekonstitution in Proteoliposomen ist dies jedoch nicht entscheidend, weshalb das mit LDAO-Puffer eluierte Protein zunächst für die Herstellung von Proteoliposomen verwendet werden kann. Dazu wurden die Fraktionen 100 und 200 mM Imidazol mit LDAO vereint. Das Protein wurde dann für die Herstellung von Proteoliposomen verwendet.

4.3 Funktionsuntersuchung von zellfrei hergestelltem PfAQP2

Um zu überprüfen ob das zellfrei hergestellte PfAQP2 über eine Wasserleitfähigkeit verfügt, wurde ein Verfahren analog zur Herstellung und Untersuchung von Hefe-Protoplasten angewandt. Das in 4.2.2 zellfrei hergestellte Protein wurde über Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend mit Hilfe einer PD MidiTrap G-25 Säule von Imidazol befreit, da dies im nächsten Schritt die Filtermembranen beim Konzentrieren der Proben beschädigen würde. Nach dem Konzentrieren des Proteins mit Amicon *Filter Units* wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz (3.2.2) zu 353 µg Gesamtproteinmenge in 300 µL Puffer bestimmt. Insgesamt 100 µg Protein wurden für die Herstellung von Proteoliposomen verwendet. Diese wurden zusammen mit Leerliposomen, in denen kein Protein rekonstituiert wurde, als Kontrolle an der Stopped-flow Apparatur

Ergebnisse

vermessen. Hierbei wird ein hyperosmotischer Saccharosegradient von 200 mOsm verwendet, der die Proteoliposomen zum Schrumpfen bringt.

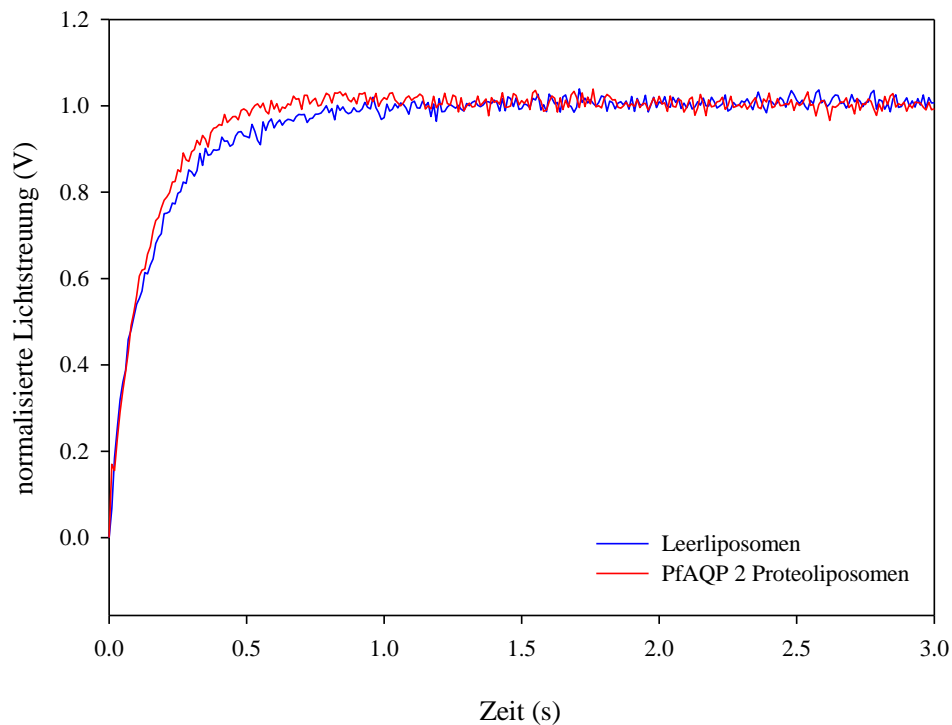


Abbildung 23: Wasserleitfähigkeitsmessung von Proteoliposomen mit PfAQP2 (rot) und Leerliposomen (blau); gezeigt sind die ersten 3 Sekunden der 10 Sekunden-Messung mit einem 200 mOsm Saccharosegradienten; Kurven sind Mittelwerte aus jeweils 9 einzeln aufgenommenen Kurven

In Abbildung 23 ist das normalisierte Streulicht bei einem Gradienten von 200 mOsm Saccharose von Proteoliposomen, in denen PfAQP2 rekonstituiert wurde im Vergleich zu reinen Liposomen gezeigt. Die Kurven zeigen einen k_w -Wert von $0,15 \text{ s}^{-1}$ für Liposomen und $0,13 \text{ s}^{-1}$ für die PfAQP2 Proteoliposomen. Das deutet darauf hin, dass das zellfrei hergestellte Protein keine Wasserleitfähigkeit besitzt. An dieser Stelle bestehen jedoch zwei Fehlerquellen, warum kein Unterschied zwischen Proteoliposomen und Liposomen zu sehen ist. Einerseits ist das Schrumpfen der Liposomen bereits nach 0,5 s fast vollständig abgeschlossen. Dadurch ergibt sich lediglich ein Fenster von 0,5 s, um eine höhere Leitfähigkeit messen zu können. Damit eine Diskriminierung durch einen zu großen osmotischen Gradienten ausgeschlossen werden kann, wurde der Gradient auf ein Viertel reduziert.

Ergebnisse

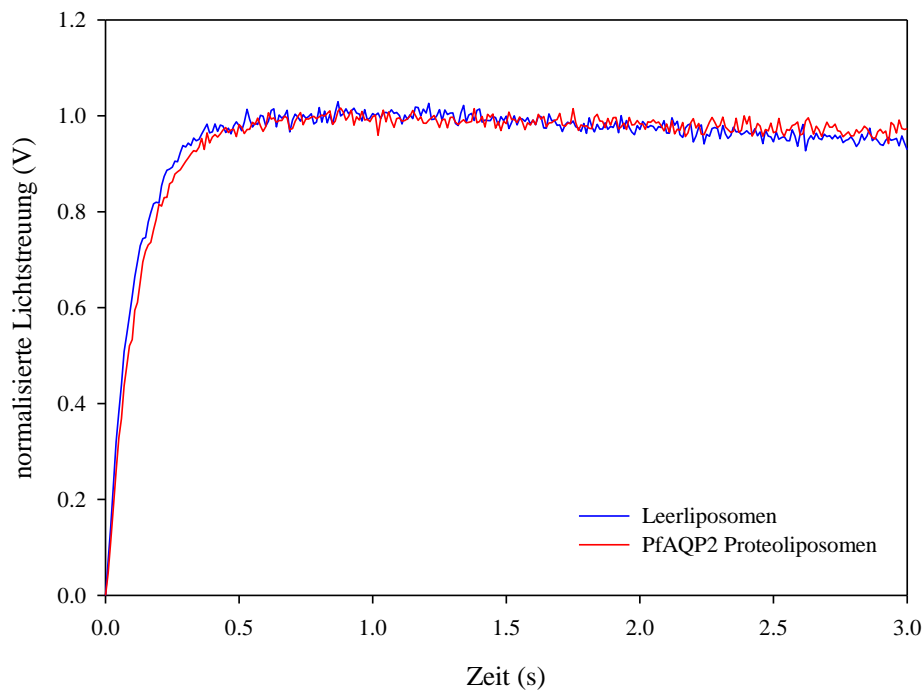


Abbildung 24: Wasserleitfähigkeitsmessung von Proteoliposomen mit PfAQP2 (rot) und Leerliposomen (blau); gezeigt sind die ersten 3 Sekunden der 10 Sekunden-Messung mit einem 50 mOsm Saccharosegradienten; Kurven sind Mittelwerte aus jeweils 9 einzeln aufgenommenen Kurven

Abbildung 24 zeigt deutlich, dass kein Unterschied zwischen den Leerliposomen und den PfAQP2 Proteoliposomen hinsichtlich der Wasserleitfähigkeit besteht. Die k_w -Werte liegen bei $0,10 \text{ s}^{-1}$ für Leerliposomen und $0,13 \text{ s}^{-1}$ für die Proteoliposomen.

Andererseits besteht die Möglichkeit, dass PfAQP2 nicht in die Liposomen rekonstituiert wurde und sich dadurch ein Kurvenverlauf ähnlich zu den Leerliposomen ergibt. Deshalb wurden die Proteoliposomen einer Dichtegradientenzentrifugation (3.3.6) unterzogen. Hierbei wurden Proteoliposomen und Proteine nach ihrer Dichte in einem Gradienten von 0 bis 30 % Saccharose durch Zentrifugation bei 164.000 g getrennt und anschließend geblottet. Die Leerliposomen wurden analog behandelt, da diese allerdings kein Protein enthalten, ist im Blot kein Signal zu sehen, lediglich die Liposomen selbst als Opaleszenz der Saccharosefraktion. In Abbildung 25 ist zu sehen, dass in praktisch allen Fraktionen, von 10 % bis 25 % Saccharose, PfAQP2 mit dem Anti-*penta*-His Antikörper detektiert werden kann. Dies deutet darauf hin, dass ein Teil des Proteins nicht rekonstituiert ist. Allerdings befindet sich in der 15 % Fraktion, in der sich die Proteoliposomen angereichert haben, die Größte Proteinmenge. Dies deutet darauf hin, dass ein großer Teil des Proteins erfolgreich rekonstituiert wurde.

Ergebnisse

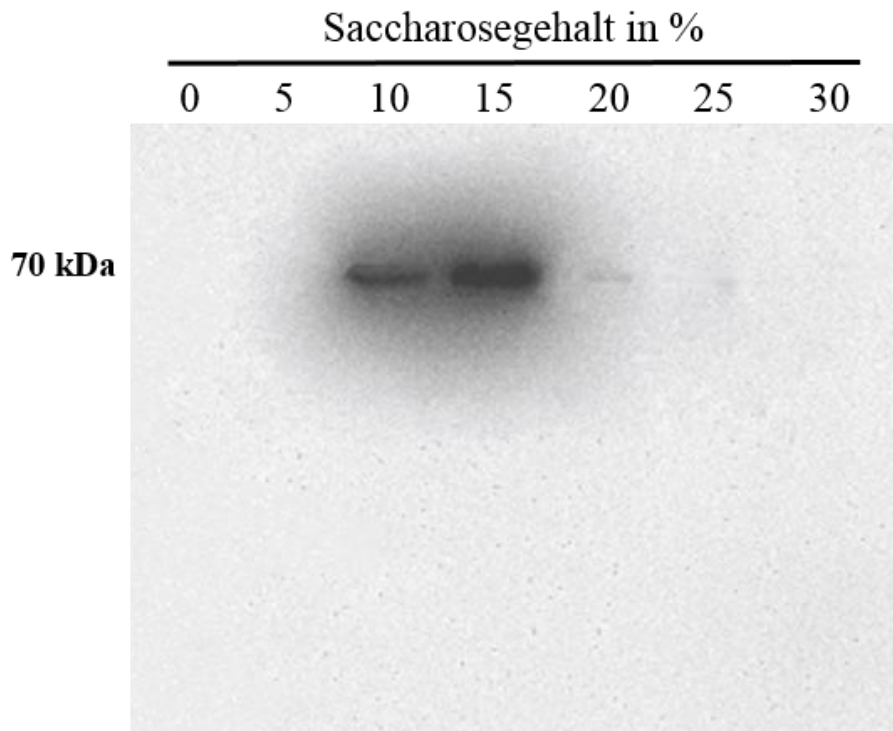


Abbildung 25: Western-Blot der sieben Fraktionen 0 bis 30 % Saccharose der Dichtegradientenzentrifugation. Aufgetragen wurde sämtliches Protein, das mit TCA-Fällung erhalten wurde. Entwickelt wurde die Membran mit dem Anti-*penta*-His Antikörper aufgrund des C-terminalen His-*tags*. Es wurde für 5 Minuten belichtet.

Somit konnte gezeigt werden, dass das Zellfreihergestellte Protein in Proteoliposomen rekonstituiert, genauso wie das In Hefezellen exprimierte PfAQP2 keine Leitfähigkeit für Wasser zeigt. Aquaglyceroporine können eine schlechtere bis abwesende Wasserleitfähigkeit besitzen, jedoch konnte beim Leitfähigkeitsexperiment mit Hefeprotoplasten in Abbildung 14 keine Leitfähigkeit für Glycerol beobachtet werden.

Für Aquaporine untypische Substrate, wie Monocarboxylate, können den Kanal ebenfalls nicht passieren. Entweder leitet PfAQP2 ein ganz anderes Substrat, vielleicht sogar etwas für Aquaporine gänzlich neues oder die eigentliche Funktion ist gar nicht die eines Kanals, sondern etwas völlig anderes.

4.4 Herstellung spezifischer PfAQP2 Antikörper

In keinem der bisherigen Experimente konnte eine Kanalfunktion für PfAQP2 nachgewiesen werden. Durch Modifikation der Loops oder Mutationen größerer oder untypischer Aminosäuren konnte ebenfalls keine Leitfähigkeit erzeugt werden. Theoretisch besteht die Möglichkeit das die Funktion unter physiologischen Bedingungen nichts die eines Kanals ist. Für zukünftige Lokalisationsstudien und mögliche biophysiological Untersuchungen sollen deshalb spezifische Antikörper gegen PfAQP2 hergestellt werden

Hierfür wurden drei Abschnitte der Proteinsequenz ausgewählt (Abbildung 26), gegen die spezifische Antiseren hergestellt wurden, um daraus Antikörper zu gewinnen. Insgesamt wurden zwei unterschiedliche Peptide für den extrazellulären A-Loop und ein Peptid für den C-Terminus des Proteins an Pfeilschwanzkrebs-Hämocyanin (LPH) über ein Cystein gekoppelt und anschließend mit jedem Peptid zwei Kaninchen immunisiert.

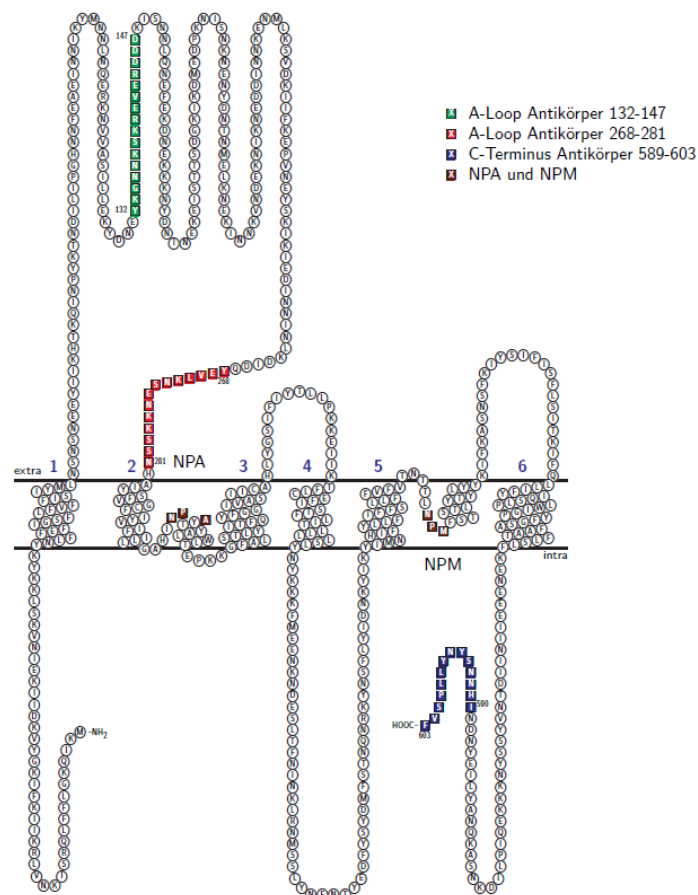


Abbildung 26: Topologie von PfAQP2 mit den Sequenzen für die Spezifischen Antikörper A-Loop Antikörper 132-147 (grün), A-Loop Antikörper 268-281 (rot) und C-Terminus Antikörper 589-603 (blau)

Für zwei der Peptide wurden Sequenzen im A-Loop ausgewählt, da sich dieser sehr wahrscheinlich extrazellulär befindet und somit ein gutes Ziel bietet. Die erste Sequenz befindet sich zwischen Position 132 bis 147 (*YKGNKSKREVERDDD*) welche sich zentral im A-Loop

Ergebnisse

befindet, im Folgenden als Anti A-Loop 132-147 bezeichnet. Die zweite Sequenz im A-Loop ist zwischen den Aminosäuren 268 bis 281 (*YEV LK NSEN K K S S*) nah an der Membran gelegen, im Folgenden als Anti A-Loop 268-281 bezeichnet. Außerdem wurden die Aminosäuren 590 bis 603 (*I H N N S Y N Y L L P S V F*) des C-Terminus als intrazelluläre Sequenz ausgewählt, im Folgenden als Anti C-Terminus 590-603 bezeichnet.

Zunächst wurden die erhaltenen Antiseren getestet, ob sie an das Peptid binden. Dazu wurden Dot-Blots angefertigt, bei denen PVDF-Membranen mit 10 ng und 1 µg des jeweiligen Peptids, durch pipettieren einer verdünnten Lösung, beladen wurden. Bei Inkubation der Membranen mit dem jeweiligen Serum, bzw. Serum, das vor der Immunisierung entnommen wurde (Prä-Serum), ergibt sich nach Entwicklung, das in Abbildung 27 gezeigt Bild. Die Dot-Blots mit beiden Anti-A-Loop Seren und das Anti-C-Terminus Serum, zeigen, das alle Seren kleine Mengen bis 10 ng Peptid erkennen.

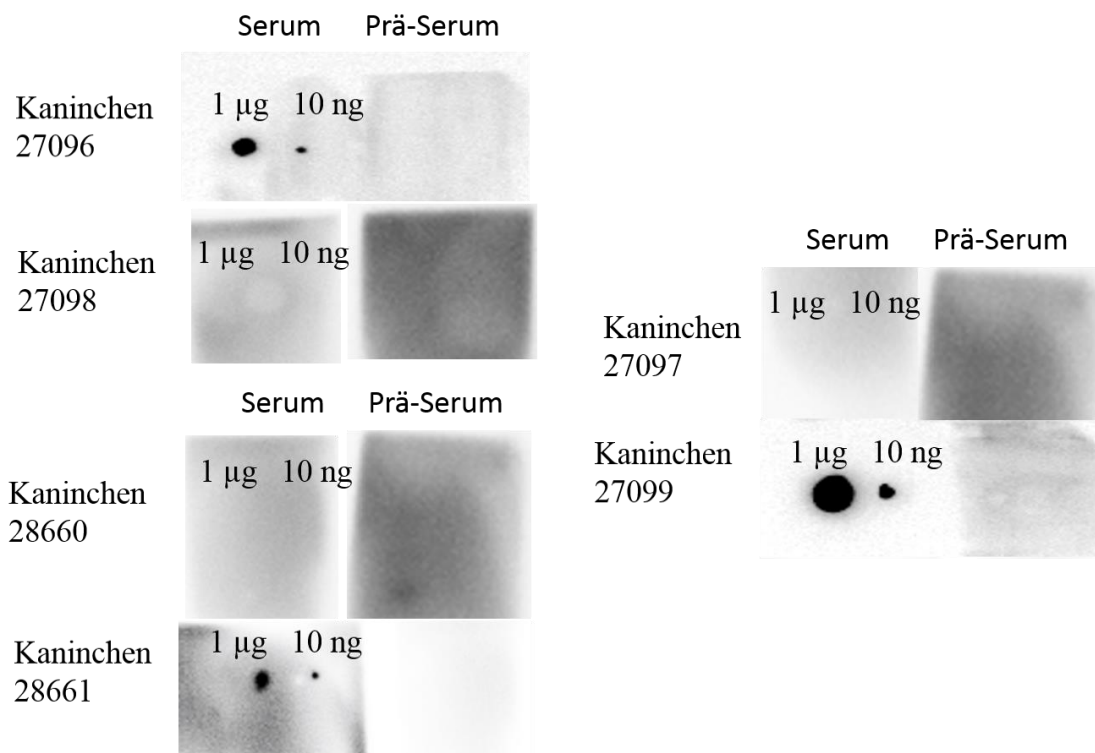


Abbildung 27: Die Dot-Blots der ungereinigten Antiseren von Kaninchen 27096 und 27098 (Anti-A-loop 268-281), Kaninchen 27097 und 27099 (Anti-C-Terminus 590-603), Kaninchen 28660 und 28661 (Anti-A-Loop 132-147) und der Prä-Immunsere der jeweiligen Kaninchen.

Die als Negativkontrolle funktionierenden Prä-Seren zeigen keine Peptidbindung. Dadurch konnte im Vorfeld der Reinigung aus allen erhaltenen Seren jene ausgewählt werden, die das Antigen binden. Aus den Seren der Kaninchen 27096, 27099 und 28661 wurden dann

Ergebnisse

Antikörper mit Hilfe des SulfoLink® Kits der Firma ThermoFisher affinitätschromatographisch gewonnen wurden. Dazu wird durch Kopplung des Immunisierungspeptids an die Säulenmatrix eine antikörperspezifische Bindungsstelle geschaffen. Bei Zugabe des Serums werden die Antikörper dann gebunden und anschließend durch einen pH-Sprung wieder vom Peptid gelöst.

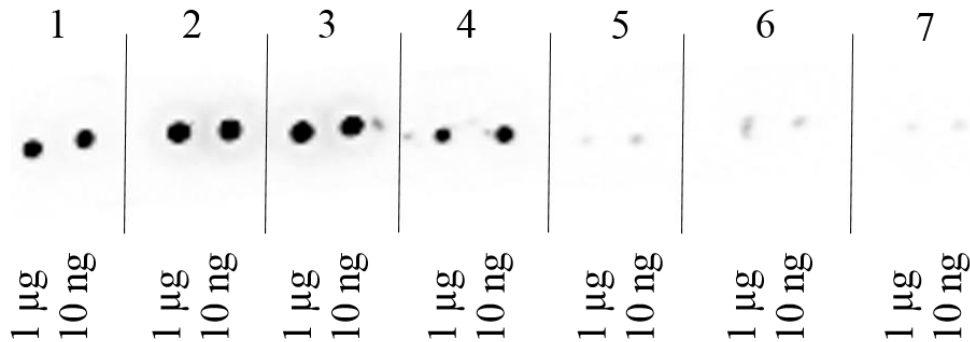


Abbildung 28: Die sieben Elutionsfraktionen des anti-A-Loop-Antikörpers 268-281 im Dot-Blot aus Kaninchen 27096.

In Abbildung 28 sind die sieben Fraktionen, die bei einer der Elutionen gesammelt wurden, zur Entwicklung eines Dot-Blot eingesetzt, zu sehen. Es wurden wieder zwei Peptidmengen, 1 µg und 10 ng, verwendet, um die Empfindlichkeit abzuschätzen. Es ist deutlich zu sehen, dass in Fraktionen 1 bis 4 die beste Peptiddetektion vorliegt. Deshalb wurden die Fraktionen 1 bis 4 vereinigt und weiter aufgearbeitet. Für die restlichen Antikörper wurden ebenfalls die Fraktionen 1 bis 4 vereint. Die weitere Aufarbeitung für alle Antikörper beinhaltet die Dialyse gegen PBS und anschließende Konzentrierung mittels Amicon Zentrifugenröhrchen. Am Ende wurde eine Konzentration von 0,5 bis 1 mg mL⁻¹ Protein in PBS und mindestens 50 % Glycerol eingestellt.

Die Testung der gewonnenen Antikörper erfolgte sowohl am Protein aus der Hefe (4.4) und am zellfrei hergestellten Protein (4.2).

4.5 Testung der PfAQP2 Antikörper

Um zu prüfen, wie gut die spezifischen Antikörper an PfAQP2 binden, wurden Western-Blots mit zellfrei in Brij® 78 hergestelltem PfAQP2 (wt), PfAQP2 mit deletiertem D-Loop (ΔD) und PfAQP2, bei dem sowohl A, als auch D-Loop (ΔAΔD) entfernt wurden, angefertigt. Dabei war es wichtig unterschiedliche Varianten zu testen, da die Erkennungssequenz für einen der beiden A-Loop Antikörper 268-281 direkt über der Transmembranspanne 2 lokalisiert und deshalb eventuell schlecht zugänglich ist. Bei der A-Loop defizienten Mutante bleibt das Epitop, das

Ergebnisse

vom A-Loop-Antikörper 268-281 erkannt wird, komplett erhalten, wodurch ggf. eine bessere Bindung erfolgt.

Die Deletion des D-Loops ist an dieser Stelle deshalb vorteilhaft, da hierdurch bei Fragmentierung des Proteins, welche bei der Expression in der Hefe (4.4) und beim Detergenzienscreen (4.2.1) schon beobachtet wurde, Rückschlüsse auf Art und Größe der Fragmente gezogen werden können. Deshalb wurden die Proteine nach der Herstellung nicht einer Ni^{2+} -NTA-Affinitätsreinigung unterzogen, um zu verhindern, dass Teile des Proteins hierbei entfernt werden und dann nicht mehr zu detektieren sind.

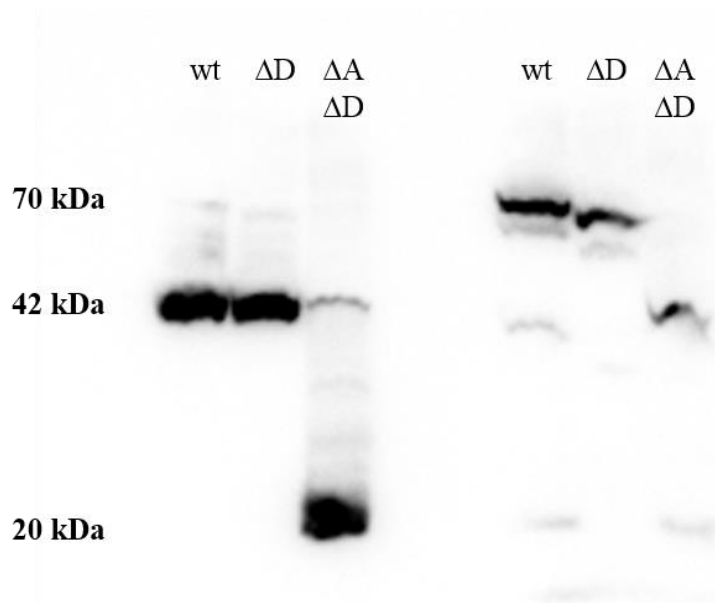


Abbildung 29: Es wurden drei Konstrukte mit N-terminalem His-tag zellfrei hergestellt. PfaQP2 (wt) M_w 71 kDa, PfaQP2 ohne D-Loop (ΔD) M_w 65 kDa und PfaQP2 ohne A- und D-Loop ($\Delta A\Delta D$) M_w 43 kDa. Links sind die Proteine mit dem Anti-A-Loop Antikörper 268-281 markiert, rechts mit dem Anti-C-Terminus Antikörper 590-603. Belichtungszeit: 10 Sekunden

Der A-Loop Antikörper liefert für wt und ΔD ein starkes Signal bei 42 kDa und ein sehr schwaches bei 71 kDa bzw. 63 kDa bei ΔD (Abbildung 29). Bei $\Delta A\Delta D$ ist eine schwache Bande bei 42 kDa. Interessanter Weise hat die Doppeldeletions-Mutante ein berechnetes Molekulargewicht von 43 kDa, was darauf schließen lässt, dass es sich bei der 42 kDa höchstwahrscheinlich um das weitestgehend intakte, verkürzte Protein handelt. Außerdem ist eine weitere starke Bande bei 20 kDa für $\Delta A\Delta D$ zu sehen. Der Unterschied zwischen beiden Fragmenten beträgt 25 kDa und ist damit genauso groß, wie der Unterschied der beiden Fragmente 71 kDa und 42 kDa bei wt und ΔD . Das Wildtyp PfaQP2 wird vom C-terminalen

Ergebnisse

Antikörper in voller Größe bei 71 kDa detektiert. Dabei finden sich drei weitere schwache Banden bei 62 kDa, 42 kDa und 20 kDa. Die D-Loop deletierte Mutante liefert das gleiche Muster, lediglich 6 kDa kleiner. Bei diesem Antikörper sind zwei Banden zu sehen, die etwa die gleiche Größe besitzen, wie bei der entsprechenden Probe mit dem Anti-A-Loop Antikörper (42 kDa und 20 kDa).

Der Umstand, dass der C-terminale Antikörper 590-603 überwiegend intaktes Protein detektiert und Fragmente lediglich in geringen Mengen unterstützt die Vermutung, dass der A-Loop Antikörper sein Epitop nur schwer erreicht. Bei der Fragmentierung wird dieses zugänglich, wodurch die hohe Intensität der Bande zu erklären ist. Außerdem wird die Bindung auch durch die Deletion des A-Loops wenigstens teilweise erleichtert.

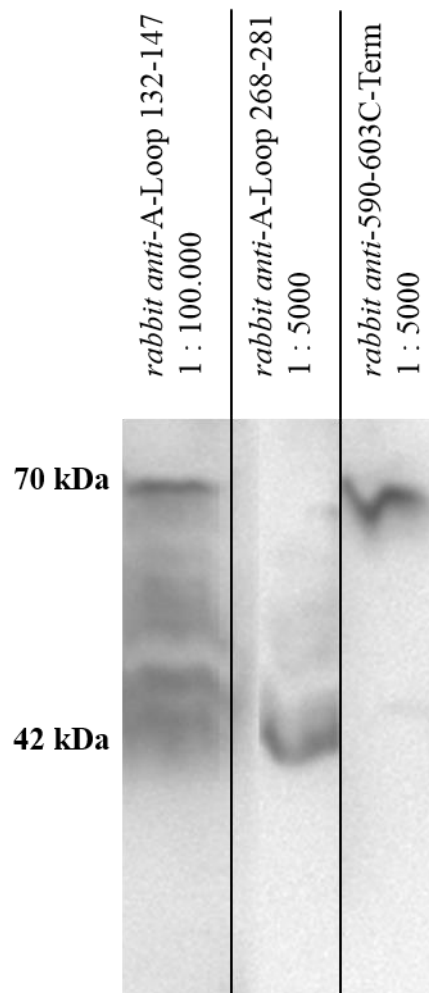


Abbildung 30: Western-Blot von zellfrei hergestelltem PfAQP2. Es wurden 3 Membranteile mit einem der drei verschiedenen Antikörper inkubiert. Anschließend zur Auswertung wieder nebeneinander gelegt. Belichtungszeit 20 Sekunden

In einem weiteren Experiment wurde der dritte Antikörper gegen PfAQP2 zusammen mit den zuvor in Abbildung 29 gezeigten Antikörper gegen zellfrei hergestelltes PfAQP2 getestet. Der

Ergebnisse

Hintergedanke zu dem dritten Antikörper war, dass dieser eine andere Sequenz innerhalb des A-Loops bindet, welche besser oder anders zugänglich für den Antikörper ist. Die Sequenz ist sehr zentral im A-Loop gelegen. Abbildung 30 zeigt den entstandenen Western-Blot. Hier sind die beiden Antikörper *rabbit anti-A-Loop 268-281* und *rabbit anti-590-603 C-Term* jeweils mit nur einer Bande bei 42 kDa und 70 kDa zu sehen.

Der *rabbit anti-A-Loop 132-147* Antikörper zeigt definitiv eine Bande bei 70 kDa, die dem C-Terminus Antikörper analog dem vollständigen Protein entspricht. Die Bande des A-Loop Antikörpers 268-281 bei 42 kDa ist auch bereits aus Abbildung 29 bekannt und entspricht einem Fragment des Proteins. Der A-Loop 132-147 Antikörper markiert deutlich mehr Fragmente in einem Bereich zwischen 42 kDa und 70 kDa. Dies zeigt zum einen, dass im Gegensatz zu den beiden anderen Antikörpern Fragment 70 und 42 kDa ähnlich gut detektiert werden, zudem aber auch eine unzählbare Anzahl von Fragmenten dazwischen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Fragmentierung im Bereich des A-Loops deutlich größer und vielseitiger ist, als die anderen Antikörper bisher detektieren konnten. Dies lässt die interessante Möglichkeit zu, dass sich der Antikörper für eine Anwendung im Biologischen System gut eignet, wenn die Fragmentierung vielleicht sogar Bestandteil der natürlichen Umgebung ist.

Da der Expressionszustand des Proteins in der Hefe unklar ist, sollte mit Hilfe der aus Kaninchen gewonnenen, spezifischen Antikörper untersucht werden, ob tatsächlich die Detektion das Problem ist. Abbildung 31 ist der entwickelte Immuno-Western-Blot nach SDS-PAGE zu sehen. Ein Zellysate aus mit dem Leervektor transformierte Hefezellen (-) liefert im Western-Blot kein Signal.

Ergebnisse

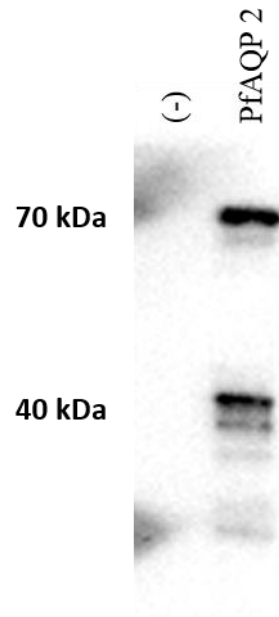


Abbildung 31: Western-Blot von Wildtyp PfAQP2 mit C-terminalem His-tag aus der Hefe mit dem Anti-C-Terminus Antikörper 589-603 entwickelt. M_w PfAQP2 71 kDa. Belichtet wurde für 5 Minuten.

Demnach sind die Banden bei PfAQP2 als spezifisch und dem PfAQP2 zugehörend einzuordnen. Anhand des verwendeten Größenmarkers lässt sich eine Bande bei ca. 70 kDa ausmachen. Diese entspricht der theoretischen Größe von PfAQP2. Es gibt weitere Banden bei 42 kDa, 36 kDa und 20 kDa, die möglichen Fragmente darstellen können, was wiederum auf eine mögliche Instabilität oder Abbau durch Proteasen des Proteins hinweist.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Funktion des putativen *P. falciparum* Aquaporin 2 hinsichtlich der Funktion als Kanalprotein für Wasser, Glycerol, Formiat und Laktat untersucht. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Expressionssysteme, Protoplasten, die aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* durch das Entfernen der Zellwand hergestellt wurden und das *continuous exchange cell free* (CECF) System, genutzt. Für das Wildtyp PfAQP2 konnte weder mit dem Hefeassay, noch mit dem zellfrei hergestellten Protein eine Wasserleitfähigkeit beobachtet werden. Eine Leitfähigkeit für Glycerol, Formiat und Laktat konnte ebenfalls nicht in Hefe nachgewiesen werden. Bei einer Ansäuerung des Extrazellulärraums tritt ebenfalls keine Veränderung der Wasserleitfähigkeit auf. Es wurden zwei Aminosäuren des Proteins durch Mutation der kodierenden DNA verändert, um ihren Einfluss bei der Leitfähigkeit zu beleuchten. Außerdem wurden zwei strukturelle Modifikationen durchgeführt, indem die Loops A und D entfernt wurden. Hierbei sollte untersucht werden, welche Rolle diese bei einer möglichen Funktion spielen. Durch verkürzen der Loops konnte jedoch keine Leitfähigkeit für Wasser hervorgerufen werden. Die beiden Mutationen F477R und Y454A bewirken ebenfalls keine Leitfähigkeit für Wasser.

Zusätzlich konnten drei verschiedene Antikörper aus Antiseren, die im Auftrag von der Firma BioGenes in Berlin durch Immunisierung von Kaninchen hergestellt wurden, isoliert, gereinigt und ihr Bindeverhalten für zukünftige Untersuchungen erfolgreich charakterisiert werden.

5.1 Expression und Western-Blot Analyse

Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass das PfAQP2, ähnlich wie PfAQP1, wenn es durch *S. cerevisiae* hergestellt wird, schwer durch klassische Epitope, wie einen Hämagglutinin-Rest, zu detektieren ist. Bei der zellfreien Herstellung hingegen ist eine Detektion des His-tags mit dem gegen 5x Histidin gerichteten Antikörper möglich. Dadurch konnte erstmals eindeutig gezeigt werden, dass das Protein hergestellt wird. Jedoch sind dabei einige deutliche Fragmente aufgetreten. Durch spezifische PfAQP2 Antikörper konnte auch das zellulär hergestellte Protein aus der Hefe detektiert werden. Die Fragmente, die bei der zellfreien Herstellung entstanden sind, waren hier ebenfalls zu finden. Bei der Charakterisierung der spezifischen Antikörper konnte anhand der zellfrei hergestellten Konstrukte, PfAQP2, PfAQP2 Δ D und PfAQP2 Δ A Δ D, ein wiederkehrendes Fragmentierungsmuster beobachtet werden. Außerdem wurde deutlich, dass der A-Loop Antikörper 268-281 beim Wildtyp zum einen das intakte Protein bei 71 kDa nur schwach, ein

Diskussion

etwa 42 kDa großes Fragment sehr stark und ein weiteres 20 kDa Fragment detektiert. Auffällig hierbei ist, dass der C-Terminus Antikörper ebenfalls bei 71 und 42 kDa Signale liefert. Allerdings sind die Intensitätsverhältnisse genau umgekehrt. Dies erscheint auf den ersten Blick eigenartig. Das Δ D-PfAQP2 liefert praktisch das gleiche Muster für beide Antikörper, lediglich um etwa 10 kDa kleiner. Das 20 kDa Fragment ist bei allen Proteinen und Antikörpern gleich und deutet darauf hin, dass der C-terminus bis etwa 20 kDa Größe erhalten bleibt und etwa 20 kDa rund um den A-Loop, wobei es schwierig ist hier genaue Grenzen zu ziehen. Sobald jedoch beide großen Loops (A und D) entfernt sind, bleiben unabhängig vom verwendeten Antikörper noch genau zwei detektierbare Fragmente übrig. Eins bei 42 kDa, welches dem intakten Protein PfAQP2 Δ A Δ D entspricht und ein Fragment bei 20 kDa, dass der Hälfte des Proteins entspricht. Dieses Muster deutet darauf hin, dass zwei Hälften mit jeweils einem der beiden Erkennungssequenzen entstehen. Dafür spricht auch, dass ein Fragment mit beiden Erkennungssequenzen mindestens 33 kDa groß sein müsste, welches im Western-Blot nicht zu sehen ist.

Tabelle 9: Fragmente der Antikörpercharakterisierung an zellfrei hergestelltem PfAQP2 (Brij[®] 78) und den modifizierten Varianten PfAQP2 Δ D und PfAQP2 Δ A Δ D. Die Größen der Fragmente wurden aus Abbildung 29 mit dem PeqGold III Proteinmarker am Lumi-Imager[™] bestimmt.

Anti A-Loop Antikörper			Anti C-Terminus Antikörper		
PfAQP2	PfAQP2 Δ D	PfAQP2 Δ A Δ D	PfAQP2	PfAQP2 Δ D	PfAQP2 Δ A Δ D
72 kDa			72 kDa	67 kDa	
	62 kDa		62 kDa	55 kDa	
43 kDa	43 kDa	44 kDa	41 kDa		43 kDa
				35 kDa	
		21 kDa	21 kDa		20 kDa

Die Fragmentierung in der Hefe liefert mit dem C-Terminus Antikörper ein vergleichbares Muster für den Wildtyp von PfAQP2 (70 kDa und 42 kDa). Somit gibt es bezüglich der Stabilität des hergestellten Proteins keinen nennenswerten Unterschied zwischen beiden Systemen. Tatsächlich könnte die Instabilität in beiden Systemen darauf hindeuten, dass etwas systemunspezifisches, wie die Struktur des Proteins selbst oder die Abwesenheit eines Interaktionspartners hierfür verantwortlich ist. Studien an pflanzlichen *Plasmamembrane Integral Proteins* (PIPs) haben gezeigt, dass diese untereinander interagieren, um ihre Wirkung zu entfalten. So konnte mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) nachgewiesen werden, dass PIPs aus der Maispflanze gegenseitig in ihrer Lokalisation beeinflussen [103]. Kürzlich

haben Studien an *Arabidopsis* und *Nicotiana* außerdem gezeigt, dass PIPs eine zentrale Rolle in der Regulierung und Rekrutierung anderer Aquaporine und Transporter spielen [104]. Ebenfalls bedeutet eine Fragmentierung im Modellorganismus nicht automatisch, dass physiologisch kein intaktes Protein vorliegen kann. Es wäre natürlich denkbar, dass eine Fragmentierung Teil der Funktion ist und die Fragmente jeweils unterschiedliche Aufgaben haben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Wahl des Detergens im zellfreien System einen großen Einfluss hat. Hierbei wurde beobachtet, dass bei der Nickel-NTA-Affinitätsreinigung von zellfrei hergestelltem Wildtyp PfAQP2 bei der Verwendung von LDAO anstelle von Brij[®] 78 eine deutliche geringere Fragmentierung stattfindet. Es wäre deshalb auch möglich, dass das Protein im Parasiten besonders stabilisiert wird, z.B. durch einen Interaktionspartner. Letztendlich gibt es bisher keine physiologischen Expressionsdaten auf Proteinebene, was bedeutet, dass die mRNA zwar hergestellt und nachgewiesen werden kann [100, 105, 106], aber nicht bekannt ist, ob diese überhaupt vom Parasiten in ein Protein übersetzt wird [107, 108].

5.2 Untersuchung der Leitfähigkeit von PfAQP2

Strukturell werden drei Klassen von Aquaporinen unterschieden: orthodoxe Aquaporine, Aquaglyceroporine und sogenannte unorthodoxe Aquaporine. Da jedoch die Struktur in der Regel auch die Funktion bedingt, kann den Klassen auch eine mehr oder weniger typische Funktionen zugeordnet werden. Orthodoxe Aquaporine sind spezialisierte Wasserkanäle, die den Wasserfluss durch die Membran regulieren. Zu ihnen gehören zum Beispiel die Säugetier-Aquaporine 0,1,2,4 und 5 [109] sowie das bakterielle AQPZ und das Archaeen AQPM [110]. Aquaglyceroporine hingegen leiten typischerweise nur im geringen Maße Wasser, da sie auf die Passage größerer ungeladener Solute wie Glycerol spezialisiert sind. Hierunter fallen auch Moleküle wie Ammonium und Harnstoff, ungeladene Monocarboxylate [79], Carbamate und Purine [78, 111]. Unorthodoxe Aquaporine sind die bis heute am wenigsten untersuchten und verstandenen Vertreter der MIP. Zu ihnen gehören die humanen Aquaporine 11 und 12 [112]. Bisher liegen nur wenige Funktionsdaten vor, jedoch deuten die wenigen die es gibt auf eine den orthodoxen Aquaporinen ähnliche Wasserleitfähigkeit für AQP11 hin [82]. Im Hinblick auf die physiologische Bedeutung gibt es jedoch einen entscheidenden Punkt. Alle bisher untersuchten unorthodoxen Aquaporine werden intrazellulär exprimiert [113–115]. Das macht sie zu potenziellen Kandidaten, die einen maßgeblichen Einfluss auf den intrazellulären Wasser- und Solutstrom haben.

Diskussion

Auf experimenteller Seite konnte für PfAQP2 in Hefeprotoplasten keine Leitfähigkeit von Wasser und Glycerol beobachtet werden. Bei der Messung mit Formiat und Laktat als Osmolyt bei unterschiedlichen pH-Werten konnte auch ausgeschlossen werden, dass ähnlich wie beim AQP9, ungeladene Monocarboxylate das Protein als Kanal durch die Membran nutzen können. Hierbei konnte auch kein Einfluss eines sauren pH-Wertes auf die Pore beobachtet werden, wodurch ein pH abhängiges *gating* unwahrscheinlich ist. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass PfAQP2 gar nicht oder nur in geringer Menge in die Plasmamembran gelangt. Als Membranprotein, wird es zwar direkt in die Membran des endoplasmatischen Retikulums exprimiert, das Hauptproblem hierbei ist jedoch, dass das PfAQP2 von dort nicht in die Zellmembran transportiert werden könnte. Dadurch würde PfAQP2 falsch als nichtleitend wahrgenommen werden, weil kein Wasser-Ein- oder Ausstrom zu beobachten wäre. Die Lokalisation innerhalb der Hefe könnte sich gut experimentell durch Fluoreszenzmikroskopie mit einem der A-Loop Antikörper oder durch ein GFP-Fusionsprotein nachweisen lassen. Die Lokalisation konnte im Rahmen der Arbeit nicht untersucht werden. PfAQP2 wurde alternativ zellfrei hergestellt und gereinigt. Danach wurde das Protein in Liposomen rekonstituiert und die Leitfähigkeit für Wasser anhand des gleichen Schwellungsassays, der auch für die Hefen verwendet wurde, untersucht. Dabei wurde kein Unterschied zwischen PfAQP2 enthaltenden Proteoliposomen und leeren Liposomen festgestellt. Die erfolgreiche Rekonstitution des Proteins wurde mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation kontrolliert und bestätigt (4.3). Dies zeigt, dass das Wildtyp PfAQP2 keine Leitfähigkeit für Wasser besitzt. Andere Substrate konnten jedoch durch den hohen Aufwand bei der Herstellung von Proteoliposomen nicht getestet werden. Der letztendliche Nachweis, ob PfAQP2 keines der Substrate leitet und vielleicht eine andere Funktion, wie Protein-Protein-Interaktionen, übernehmen könnte, steht noch aus.

5.3 Struktur von PfAQP2

Aufgrund der geringen Sequenzähnlichkeit zu bekannten Aquaporinen ist es extrem schwierig zuverlässige Prognosen über die Struktur des PfAQP2 zu machen. Die Kernregionen enthalten konservierte Sequenzen, wie das N-terminal gelegene NPA und das leicht modifizierte NPM auf C-terminaler Seite. Die Sequenz LLGAH direkt vor dem ersten NPA weist eine hohe Ähnlichkeit zum ISGGH auf, welches als charakteristisch für klassische Aquaporine, also orthodexe und Aquaglyceroporine, gilt [110]. Eine Aminosäure fällt jedoch sofort auf, die für klassische Aquaporine untypisch ist. Das Arginin 477 der ar/R-Filterregion, direkt C-terminal zum NPM, ist hier ein Phenylalanin. Durch diese Veränderung verschwindet eine permanente

Diskussion

positive Ladung und eine Möglichkeit Wasserstoffbrücken auszubilden, wodurch die Umgebung deutlich lipophiler wird.

Die Kernregion von PfAQP2 ist in einigen Bereichen den restlichen MIP bis zu einem gewissen Grad ähnlich, da sowohl die charakteristischen NPA/NPM Motive der Aquaporine sowie einige weitere hoch konservierte Aminosäuren wie Glutaminsäure 51, Glutamin 331, Glycin 334, Glutaminsäure 391 und Prolin 529 erhalten sind. Allerdings beträgt die Identität insgesamt weniger als 10 %.

Den größten Unterschied zu anderen Aquaporinen macht der große A-Loop von 210 Aminosäuren (ungefähr 35 % des Proteins), sowie der mit etwa 60 Aminosäuren vergleichsweise lange D-Loop aus. Zudem verfügt das PfAQP2 über einen 45 Aminosäuren N-Terminus und einen 63 Aminosäuren C-Terminus. Zusammen befinden sich somit etwa zwei Drittel des Proteins in den Termini und Loops. Die geringe Ähnlichkeit von PfAQP2 zu anderen AQPs und der hohe Freiheitsgrad, mit dem sich die großen Loops und Termini ausrichten können, gestalten das Erstellen eines präzisen Modells schwierig. Trotzdem wurde im folgenden Abschnitt durch Anpassung der Primärstruktur ein möglichst genaues Modell des Proteins auf Grundlage bekannter Proteinstrukturen erstellt.

Durch Reduktion des Proteins auf die Transmembranregionen, durch das Entfernen der beiden Loops A und D, sowie Kürzen der N- und C-Termini, wodurch die Identität der Sequenzen auf etwa 20 % gesteigert werden konnte, war es möglich Modelle der Porenregion des Proteins zu erstellen. Dabei wurde auf bereits bekannte Kristallstrukturen zurückgegriffen und anhand typischer Vertreter der orthodoxen Aquaporine, AQPM (PDB 2f2b), AQP1 (PDB 1j4n), AQP5 (PDB 3d9s) und Aquaglyceroporine EcGlpF (PDB 1fx8) und PfAQP1 (PDB 3c02), Strukturmodelle erstellt. Hierzu wurde mit Hilfe von SwissModel ein Sequenzalignment durchgeführt und die oben genannten Kristallstrukturen zur Modellierung ausgewählt. Die QMEAN-Werte, welche einen Näherungswert für die Qualität der Strukturmodelle darstellen [116], lagen zwischen -8 bis -10. QMEAN-Werte von etwa Null zeigen eine gute Qualität des Modells an, ab -4 ist die Qualität als schlecht einzustufen. Mit Werten die deutlich darunter liegen muss jede Annahme auf Basis der Modelle kritisch betrachtet werden. Vor allem aber war die Wahl der Referenz-Struktur dahingehend schwierig, da die Unterschiede zwischen den einzelnen Modellen im Bereich der Pore nicht besonders groß gewesen sind und diese Kristallstrukturen immer nur eine Momentaufnahme darstellen.

Im Folgenden wird die Filterregion ar/R basierend auf den erstellten Modellen dargestellt und der Einfluss des Phenylalanin an Position 477 beleuchtet (Abbildung 32, **A**, **B**). Es ist zu sehen, dass Phenylalanin im Modell, im Vergleich zu EcGlpF, nicht zu einer Verringerung des

Diskussion

Porendurchmessers führt. Allerdings ist diese Engstelle durch viele lipophile Aminosäuren gekennzeichnet (Abbildung 32, **B**). Somit ist ein Threonin an Position 471 die einzige hydrophile Aminosäure im Filter und die einzige Möglichkeit für Substrate Wasserstoffbrücken auszubilden. Im Vergleich dazu sind beim EcGlpF vier Aminosäure dazu in der Lage. Durch den Umstand ist die hydrophobe Barriere möglicherweise zu groß, als dass Wasser diese passieren kann. Dafür würde sprechen, dass Anhand von Mutationen an EcGlpF gezeigt werden konnte, dass eine hydrophobere Umgebung, selbst mit größerem Porendurchmesser, zu schlechterer Wasserleitfähigkeit führt [117].

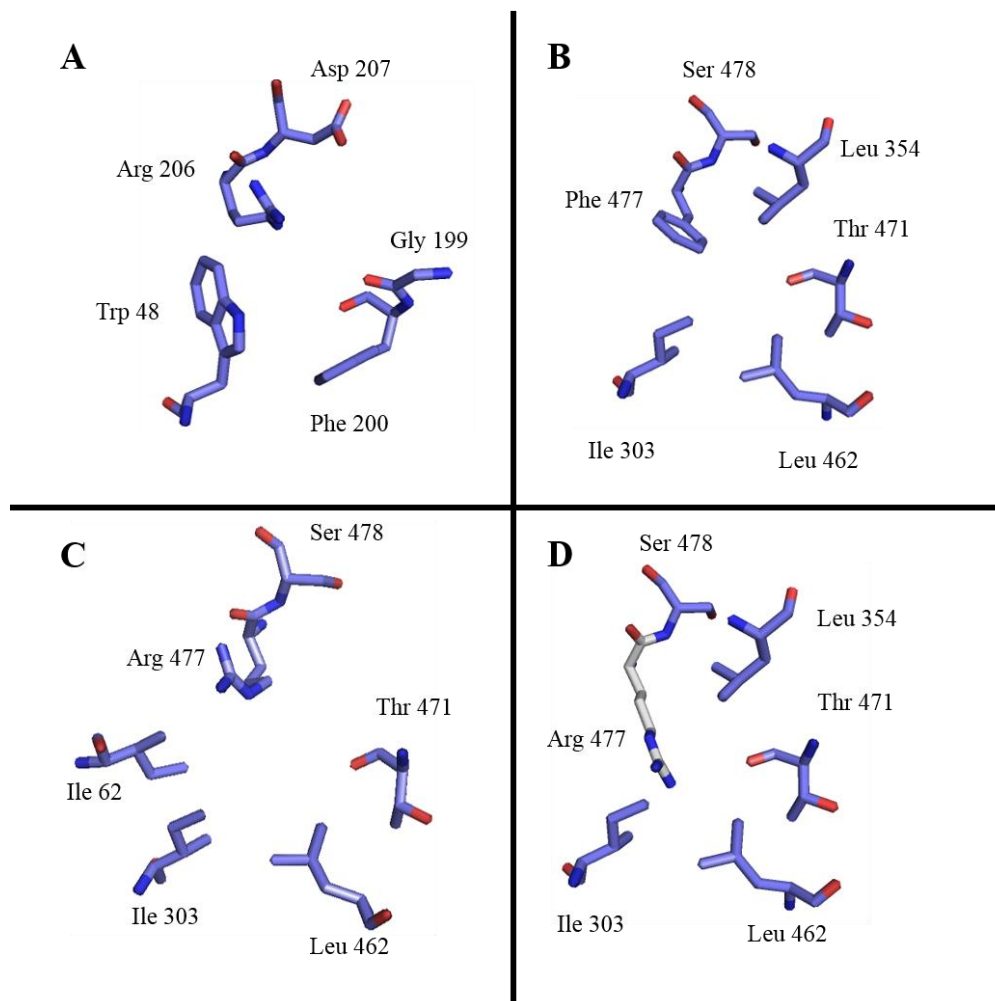


Abbildung 32: Aromatische Arginin Filterregion am Poreneingang von Aquaglyceroporinen **A**) *E. coli* GlpF (PDB 1fx8). **B**) PfaAQP2 (Modell) wurde erstellt nachdem N- und C-Terminus gekürzt, sowie die Loops A und D auf ein Minimum reduziert wurden. Das konservierte **Arginin 477** ist hier ein **Phenylalanin**. **C** und **D** stellen zwei mögliche F477R Mutanten da.

Abbildung 32 **C** und **D** stellen zwei möglich Veränderungen der ar/R-Region dar, die denkbar sind, wenn Phenylalanin 477 zu Arginin mutiert wird, um das konservierte Layout des Filters nachzubilden. So könnte wie in **D** gezeigt das Arginin an dieselbe Stelle treten und die Engstelle

Diskussion

komplett verstopfen. Der Unterschied zwischen **C** und **D** liegt darin, dass in **C** die Sequenz der Mutante erneut mit SwissModel einem *alignment* unterzogen wurde und ein neues Modell berechnet wurde. Die Veränderung die durch den Austausch einer aromatischen zu einer permanent positiv geladenen Aminosäure auftreten, dürften sich auch auf die umgebenden Aminosäuren auswirken, sodass das Arginin möglicherweise nicht wie in **D** in die Pore ragt, sondern angezogen von Wasserstoffbrückenakzeptoren gegebenfalls wie in **C** angedeutet nach oben orientiert und die Pore somit frei gibt, was der Orientierung in klassischen Aquaporinen entspricht. Experimentell wurde dies in dieser Arbeit untersucht, indem die F477R Mutation am A und D Loop reduzierten PfAQP2 durchgeführt wurde. Bei einer Leitfähigkeitsmessung in Hefeprotoplasten konnte für dieses Protein jedoch ebenfalls kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden.

Eine weitere Engstelle im Kanal von Aquaporinen befindet sich auf der intrazellulären Seite der NPA/NPM Motive. In der Kristallstruktur von EcGlpF (PDB 1fx8) sind die Aminosäuren Valin 52, Leucin 67, Asparagin 68, Leucin 159 und Isoleucin 186 an der Ausbildung der Pore beteiligt. In Abbildung 33 sind diese zusammen mit den Aminosäuren aus dem Modell von PfAQP2 dargestellt. Hierbei fällt direkt Tyrosin 454 auf (Wildtyp PfAQP2 in türkis). Zum einen befindet sich im EcGlpF an dieser Stelle keine Aminosäure, zum anderen ist die Seitenkette tief in die Kanalpore gerichtet. Hierdurch würde zum einen der Durchmesser der Pore verringert werden. Der Abstand der Hydroxyl-Gruppe und dem Asparagin 304 beträgt im Modell etwa 3,5 bis 4,0 Å wodurch eine schwache elektrostatische Anziehung zwischen beiden vorliegen könnte [118], die möglicherweise zu einer Behinderung der Passage von Wasser oder Glycerol führt, da Asparagin 304 als Wasserstoffbrücken-Donator sowohl für den Solut-Transport, als auch den Ausschluss von Kationen, essentiell und ist deswegen in fast allen Aquaporinen konserviert.

Diskussion

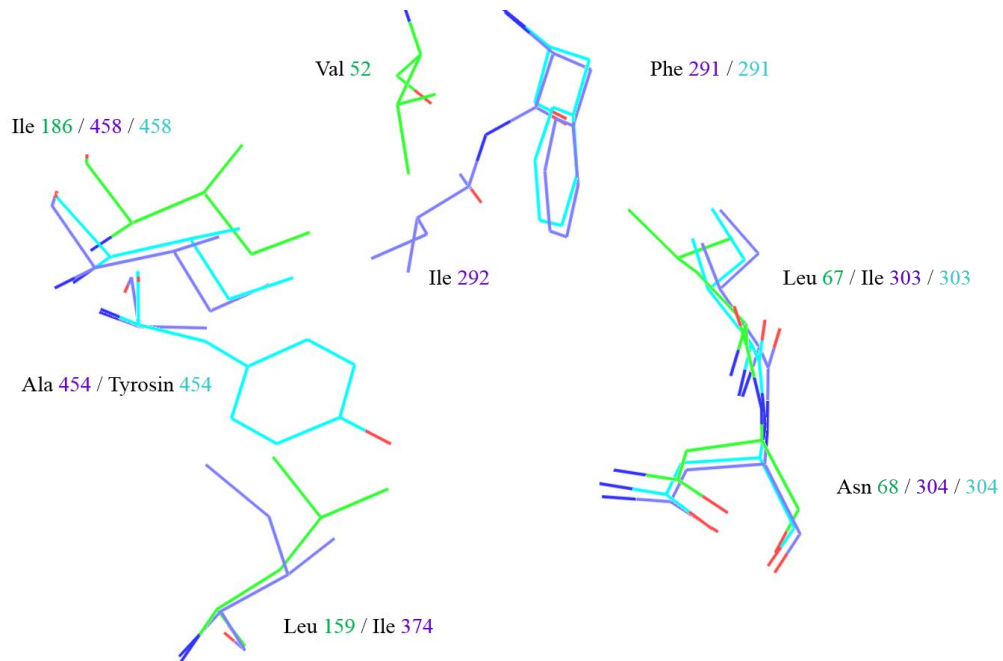


Abbildung 33: Innere Konstriktion direkt unterhalb der beiden NPA/NPM Motive. Zu sehen sind die Aminosäuren aus der Kristallstruktur von EcGlpF (grün; PDB 1fx8) und die Aminosäuren aus den Modellen von PfAQP2ΔAΔD (türkis) und der PfAQP2ΔAΔD-Y454A Mutante (lila).

Experimentell wurde diese Frage durch Punktmutation von Tyrosin 454 zu einem Alanin adressiert (Abbildung 33, lila). Dadurch verändert sich das Aussehen der Pore in diesem Abschnitt dahingehend, dass der Durchmesser deutlich vergrößert wird und die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Tyrosin 454 und Asparagin 304 wegfällt. Durch Expression der mutierten Proteine in *S. cerevisiae* konnte im Schwellungsassay mit der Stopped-flow Apparatur keine Leitfähigkeit beobachtet werden.

Entweder führen beide Punktmutationen ebenfalls zu einer versperrten Pore oder der Austausch zu Phenylalanin und das Auftreten eines Tyrosins sind nicht entscheidend bzw. nur Teile einer komplexeren strukturellen Veränderung.

5.4 Regulierung von PfAQP2

Für viele Aquaporine wie AQP0 von Rindern und Schafen [29, 30, 119], die pflanzlichen PIPs [66, 69] und das bakterielle *E. coli* AQPZ [120] wurden bereits unterschiedliche Mechanismen, wie *gating*, zur Regulierung anhand von Moleküldynamiken und Kristallstrukturen gezeigt. Dabei haben Moleküldynamik-Simulationen von AQPZ ergeben, dass das Arginin 189 der ar/R-Region nicht starr an einer Stelle steht, sondern zwei verschiedene Konformationen einnehmen kann [120]. Dabei wechselt die Seitenkette des Arginins, ähnlich wie in Abbildung 32 C und D gezeigt zwischen beiden Positionen und kann somit den Fluss von Wasser durch

Diskussion

die Pore regulieren. Jiang *et al.* [24] spekulieren, dass beim AQPZ die Tetramere eine Art Stabilisierung der Konformation übernehmen und das durch Protein-Protein Interaktionen die Leitfähigkeit beeinflusst werden könnte. Es gibt allerdings keine experimentellen Beweise für diese Hypothese. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für AQP0 beobachtet. So wurde bei einer röntgenkristallographischen Untersuchung von Detergens solubilisierten AQP0-Tetrameren eine geöffnete Pore [31] und bei einer elektronenkristallographischen Untersuchung von zweischichtigen 2D Kristallen eine geschlossene Pore beobachtet [121]. Beim Vergleich beider Strukturen wurde ein Methionin an Position 176 gefunden, welches durch eine Konformationsänderung in der Lage ist, die Pore zu verschließen.

Als weiterer *gating*-Mechanismus wurde eine vom äußeren pH abhängige Leitfähigkeit für AQP0 [67], AQP3 [122] und AQP6 [123] beschrieben. Hierbei spielen zwei Histidine innerhalb des extrazellulären A- und C-Loops eine zentrale Rolle. Der A-Loop von PfAQP2 enthält drei Histidine, wobei eines direkt an der Membran lokalisiert ist und somit vielleicht einen besonders kleinen Abstand zur Pore aufweist, um diese durch Protonierung oder Deprotonierung zu beeinflussen. Auch wenn für PfAQP2 ein solcher Mechanismus nicht explizit in dieser Arbeit untersucht wurde und keine weiteren Daten dazu vorliegen, wurde bei einer Ansäuerung des pH-Wertes keine Änderung in der Leitfähigkeit beobachtet (4.1.3). Es ist trotzdem denkbar, dass eine Alkalisierung einen Einfluss auf die Wasserleitfähigkeit haben könnte.

Der D-Loop von pflanzlichen PIPs ist 5 bis 7 Aminosäuren länger als bei anderen Aquaporinen und dort am *gating* beteiligt. Für SoPIP2;1, ein Aquaporin aus *Spinacia oleracea*, wird beschrieben, dass sich der D-Loop intrazellulär vor die Pore legt und somit die Passage von Wasser durch die Verengung unterbindet. Ursächlich ist hierfür die Bindung von zweiwertigen Kationen wie zum Beispiel Ca^{2+} - oder Cd^{2+} -Ionen, welche über eine Reihe von Wasserstoffbrücken konservierter Aminosäuren, die zu einer Konformationsänderung im D-Loop führt [28].

Für AQP1 [124], AQP2 [125, 126] und AQP4 [127, 128] sind Studien publiziert, die auf eine Steuerung der Leitfähigkeit durch Phosphorylierung hindeuten. Ebenso bei AQP5, für das ein Protein Kinase A abhängiges *trafficking* beschrieben wurde [129]. Dabei gibt es sowohl Proteine die eine Funktionssteigerung, z.B. SoPIP2;1 [130], als auch eine Verringerung wie bei AQP4 [128] nach Phosphorylierung zeigen.

Innerhalb der Primärstruktur von PfAQP2 finden sich mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen, darunter eine im Bereich des N-Terminus, zehn im A-Loop, sechs im D-Loop und fünf im C-Terminus [131]. Diese Vielzahl von Aminosäuren können durch

Diskussion

verschiedene Kinasen phosphoryliert werden und somit zu einer potenziellen Regulierung, durch *gating* oder *trafficking*, des Proteins beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige der möglichen Phosphorylierungsstellen mit den Loops A und D zusammen entfernt, wodurch allerdings keine Wasserleitfähigkeit erzeugt werden konnte. Zusätzlich konnte kein Unterschied zwischen zellfrei hergestelltem Protein und jenem aus der Hefe festgestellt werden. Da die Hefe als Eukaryot durchaus in der Lage ist, posttranslationale Modifikationen durchzuführen und das zellfreie System ein *E. coli* basiertes System ist, sollten phosphorylierungsbedingte Unterschiede hier im direkten Vergleich sichtbar sein, falls diese vorliegen.

Wenn posttranslationale Modifikationen für die korrekte Funktion des Proteins nötig sind, ist es denkbar, dass zellfrei hergestelltes und in Proteoliposomen rekonstituiertes PfAQP2, nicht die physiologische Funktion zeigen kann. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass mehrere komplexe Prozesse innerhalb des Parasiten zusammenspielen könnten und dass dies vom Messsystem nicht entsprechend abgebildet werden kann.

AQP0 ist dafür bekannt mehrere verschiedene Funktionen zu erfüllen. Neben der Wasserleitfähigkeit [132, 133] erfüllt es auch eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von Zellen innerhalb des Gewebes [30, 134–137]. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass AQP0 mit einem proteolytischen Abbauprodukt von Filensin, einem Filamentprotein, Co-Lokalisiert und somit einen Ankerpunkt für Filamente an der Membran bildet [138]. Hierbei konnte auch gezeigt werden, dass bei dieser Interaktion eine Veränderung der Wasserleitfähigkeit auftritt.

AQP4 bildet Aggregate in der Plasmamembran, die als *orthogonal arrays of particles* (OAPs) bezeichnet werden. Dabei handelt es sich um quadratische Gitter von Molekülen, die 1974 erstmal durch *freeze-fracture electron microscopy* (FFEM) nachgewiesen wurden [139]. Diese sind im Fall von AQP4 aus zwei unterschiedlichen Isoformen, M1 und M23, zusammengesetzt und bilden damit die Grundlage für eine Reihe von unterschiedlichen Funktionen. Es wird vermutet, dass die Bildung der OAPs einen Einfluss auf die Wasserpermeabilität hat [140, 141] und eine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion spielt [34, 37]. Die unterschiedlichen Fragmente, die bei der heterologen Expression von PfAQP2 in verschiedenen Systemen zu beobachten sind, könnten darauf hindeuten, dass PfAQP2 seine Funktion in einer oder mehreren der Teilformen erfüllt.

5.5 Ist PfAQP2 ein Aquaporin?

Die Proteinsequenz von PfAQP2, weist alle charakteristischen Merkmale, die ein Aquaporin auszeichnen auf. Ein guter Wasser- und Glycerolkanal, PfAQP1, wird in allen Stadien des Lebenszyklus exprimiert [91]. Dies legt die Frage nahe, warum *P. falciparum* noch einen

Diskussion

zusätzlichen Kanal benötigt. Membranproteine stellen immer auch die Gefahr einer Erkennung durch das Wirtsimmunsystem für den Parasiten da. Viele Aquaporine dienen als Oberflächenantigen, zum Beispiel AQP1 als Träger des Colton und AQP3 von GIL Blutgruppenantigenen auf humanen Erythrozyten [142, 143]. Sichtbar wird ein solcher Selektionsdruck an einer generellen Reduktion von Membranproteinen in intrazellulär lebenden Parasiten [89], da hier die Plasmamembran die Hauptschnittstelle für Interaktionen zwischen Parasit und Wirt darstellt.

In allgemeinen Studien zum Transkriptom von *Plasmodium falciparum* wurde gezeigt, dass die Gensequenz von PfAQP2 vor allem von Gametozyten [100, 105] und von der Oozyste [144] exprimiert wird. Weibliche Gametozyten reichern in Vorbereitung auf die sexuelle Vermehrung vor allem Proteine die für Proteinherstellung, Stoffwechselproteine, Proteine, die für die Interaktion mit dem Wirt wichtig sein könnten an [105]. Es wird jedoch auch beschrieben, dass weibliche *P. berghei* Gametozyten in der Lage sind die Translation von mRNA durch Verbindung mit *messenger* Ribonukleotidpartikeln (mRNP) zu unterdrücken und erst zu einem späteren Zeitpunkt zu reaktivieren [107, 108]. Es gibt jedoch signifikante Unterschiede in Morphologie und Transkriptom zwischen *P. berghei* und *P. falciparum*, weswegen diese Erkenntnisse nicht einfach übertragbar sind. Eine mögliche Hypothese für die Funktion wäre, dass PfAQP2 bei dem hohen osmotischen Stress während des Wirtswechsels und der im Verdauungstrakt der Moskitos herrschenden harschen Bedingungen [145] zur osmotischen Regulation exprimiert wird. Allerdings müsste dann ein spezieller Aktivierungsmechanismus, wie die hormongesteuerte Aktivierung von AQP2 [125] oder die spezielle Interaktion der Tetramere von AQPZ die ein Öffnen und Schließen der Pore beeinflusst [24, 120], PfAQP2 für Wasser durchlässig machen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Wildtyp PfAQP2 weder in Hefezellen noch in Proteoliposomen eine Wasserleitfähigkeit besitzt. Bei einem *Knock-out* Experiment wurden 2.578 Gene des Erregers der Malaria bei Ratten, *Plasmodium berghei*, einzeln ausgeschaltet. Dabei wurde die Wachstumsrate phänotypisch beobachtet, um Gene zu identifizieren, die für die Entwicklung des Parasiten essenziell sind. Unter den untersuchten Genen befand sich auch PBANKA_1427100, ein homologes Gen zu PfAQP2. Im Rattenmodell konnte dabei kein Unterschied im Wachstum oder der Viabilität der Parasiten im Blutstadium gefunden wurde [146]. Das Problem ist hierbei, das nicht klar ist, ob PfAQP2 überhaupt eine Funktion im Blutstadium besitzt, weswegen die Daten des *Knock-outs* vielleicht gar nicht Aussagekräfte für die Fragestellung sind.

Diskussion

Der Name „Aquaporin“ ist ein Artefakt der Entdeckungsgeschichte dieser ubiquitären und vielfältigen Klasse von Proteinen. In sämtlichen Genom-Datenbanken werden Gensequenzen automatisch, anhand von charakteristischen Merkmalen und Sequenzalignments, eingeordnet und einer hypothetischen Proteinfamilie und vielleicht sogar einer putativen Funktion zugeordnet. In den meisten Fällen stellt sich bei genauerer Charakterisierung des betroffenen Proteins heraus, dass diese Zuordnung gerechtfertigt war, wodurch die automatische Kennzeichnung zu einem wichtigen und wertvollen Werkzeug wird. Seit der Entdeckung und Charakterisierung der ersten Aquaporine ist diese Proteinfamilie stetig gewachsen, nicht nur hinsichtlich der Anzahl verschiedener Sequenzen, sondern auch in Bezug auf die Anzahl verschiedener Funktionen. So konnten neben oder an Stelle der Wasserleitfähigkeit, eine Funktion als Kanal für verschiedenste Stoffwechsel-Edukte und Produkte, wie Glycerol [147], Ammonium, Harnstoff [148–150] und sogar Monocarbonsäuren [79], gezeigt werden. Abgesehen von typischen Kanälen sind Aquaporine mittlerweile als Antigen-Träger und Struktur-assoziierte Proteine bekannt [142, 143] und die Anzahl der beteiligten physiologischen und biologischen Funktionen werden stetig mehr. In dieser Arbeit konnte ein kleiner Teil der riesigen Vielfalt an Funktionen untersucht und ausgeschlossen werden. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse stellen die Zuordnung zur Familie der Aquaporine auf die Probe, da keine Wasserleitfähigkeit nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der Primärstruktur ist PfAQP2 definitiv ein Aquaporin, auch wenn die Einordnung zu einer der drei Klassen schwierig ist. So besitzt es eine den orthodoxen Aquaporinen sehr ähnliche erste NPA-Box. Die zweite NPA-Box hingegen ähnelt eher den unorthodoxen Aquaporinen und ist durch große aromatische Aminosäuren gekennzeichnet (Abbildung 34). Jedoch fehlt das hochkonservierte Cystein der unorthodoxen Aquaporine. Es stellt also eine Art Kombination aus beiden Klassen da. Bei einem Vergleich der Ähnlichkeit der Aminosäuren ist in Abbildung 35 deutlich zu erkennen, dass die orthodoxen Aquaporine, die Aquaglyceroporine und die unorthodoxen Aquaporine in gemeinsame Gruppen von strukturell Verwandten Proteinen fallen. Die plasmodialen Aquaporine 2 lassen sich jedoch keiner dieser Gruppen zuordnen und korrelieren trotz der gemeinsamen Strukturmerkmale nur entfernt mit den übrigen Aquaporinen.

Diskussion

	Erstes NPA-Motiv	Zweites NPA-Motiv
hAQP2	-GHISGAHINPAVTVACLVGC-	-GIHYTGCSMNPARS LAPAVVTG-
hAQP5	-GPVSGGHINPAITLALLVGN-	-GIYFTGCSMNPARSFGPAVVMN-
hAQP6	-WKASGAHANPAVTLAFLVGS-	-GIHFTGCSMNPARSFGPAIIIG-
hAQP0	-GHISGAHVNPVTF AFLVGS-	-GMYTGGGMNPARSFAPAILTG-
hAQP1	-GHISGAHLNPAVTLG LLLSC-	-AIDYTGCGINPARSFGSAVITH-
MmAQP1	-GHISGAHLNPAVTLG LLLSC-	-AIDYTGCGINPARSFGSAVLTR-
hAQP4	-GHISGGHINPAVTVAMVCTR-	-AINYTGASMNPARSFGPAVIMG-
hAQP8	-GNISGGHFNPAVSLAAMLIG-	-GGPVSGGCMNPARAFGPAVVAN-
MmAQP8	-GNISGGHFNPAVSLAVTVIG-	-GGSISGACMNPARAFGPAVMAG-
EcAQPZ	-GHISGGHFNPAVTIGLWAGG-	-SIPVTNTSVNPARSTAVAI FQG-
hAQP12	-VTLDGASANPTVSLQEFLMA-	-AGPFTSAFFNPALAASTVFACS-
MmAQP12	-VTFD GASANPTVALQEFLMV-	-AGPYTSAFFNPALAASTVFHCP-
GgAQP12	-ACANGAASNPTVSLQEFLLF-	-AAPATGAFNPALATASTFLCA-
DrAQP2	-AVMQDVSGNPAVTLRLLRQ-	-ANNYTSGYVNPALAYAVTLTCP-
hAQP11	-LTLVGTSSNPCGVMQMMLG-	-GGS LTGAVFNPALALSLHFMCF-
MmAQP11	-LTLVGTASNPCGVMQMILG-	-GGS LTGALFNPALALSLHFPFCF-
GgAQP11	-LTLPGSTCNPCGTLQPLWGG-	-GGNLTGAI FNPALAFSLHHPFCF-
DrAQP1	-FSFRGAI CNPTGALELLSRG-	-GGRLTGAVFNPALAFSIQFFCP-
CeAQP11	-LCNRTAFCSPLAIEQYLVFG-	-VTFVGDQALDPLVASTLFFGCR-
CeAQP10	-IFNRGAMTNCAPIFEQFVFG-	-LYVVGVGGLNPIVATARLYGCR-
hAQP3	-GQVSGAHLNPAVTFAMCFLA-	-MGFN SGYAVNPARDFGPRLFTA-
MmAQP3	-GQVSGAHLNPAVTFAMCFLA-	-MGFN SGYAVNPARDFGPRLFTA-
hAQP10	-GNVSGAHLNPAFSLAMCIVG-	-MGANCGI PLNPARDLGPRLFTY-
hAQP7	-GRISGAHMNAAVTFANCALG-	-LGMNTGYAINPSRDLGPRIFTF-
hAQP9	-GGVSGGHINPAVSLAMCLFG-	-LGLNSGCAMNPARDLGPRLFTA-
PfAQP1	-AKLSGAHLNLA VSI GLSSIN-	-FGGNTGFALNPSRDLGSRFLSL-
EcGlpF	-AGVSGAHLNPAVTIALWLFA-	-MGPLTGFAMNPARDFGPKVFAW-
AQPM	-GNISGCHINPAVTIGLWSVK-	-LGNISGSSLNPARTFGPYLNDM-
PkAQP2	-FVILGAHINPAYTYALWLVE-	-FVFTNTTLNPMFSTSTLYTYL-
PvAQP2	-FVILGAHINPAYTYALWLVE-	-FVFTNTTLNPMFSTSTLYTYL-
PoAQP2	-FVLLGAHINPAYTYALWLVE-	-FVFTNTTLNPMFSTSTLYTYL-
PfAQP2	-FILLGAHINPAYTYALWLTE-	-FVFTNTTLNPMFSTSTLYTYL-
PmAQP2	-FILLGAHINPAYTYALWLVD-	-FVFTNTTLNPMFSTSTLYTYL-

Abbildung 34: Sequenzalignments der Zwei NPA-Boxen aller Aquaporine aus Abbildung 35. Von oben nach unten: 1. Abschnitt: orthodoxe Aquaporine, 2. Abschnitt: unorthodoxe Aquaporine, 3. Abschnitt Aquaglyceroprine; am Ende befinden sich die humanpathogenen Plasmodien, die in keine der oberen Kategorien passen. Unterstrichen sind jeweils die zentralen NPA-Sequenzen oder ihre Analoga; **C** entspricht dem charakteristischen Cystein der unorthodoxen Aquaporine, **D** entspricht dem Asparaginsäure-Rest der Aquaglyceroprine

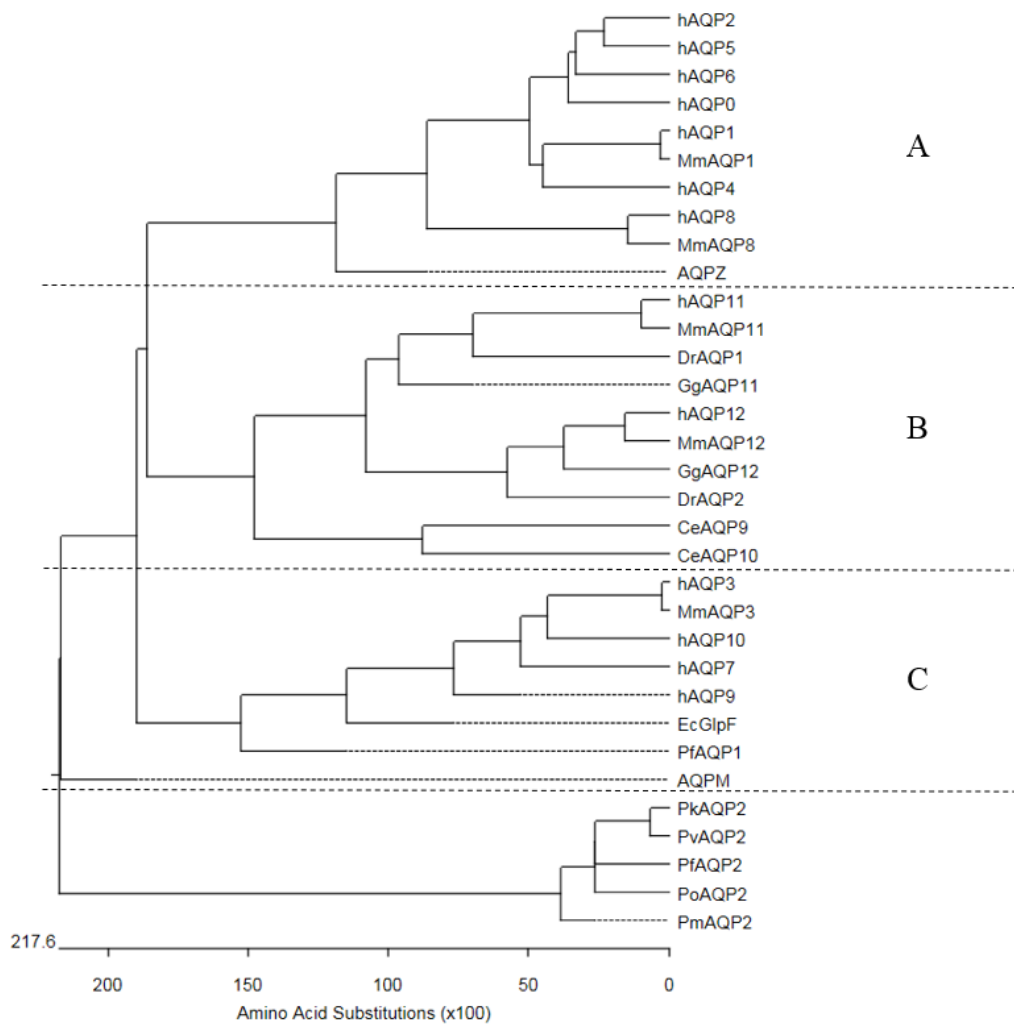


Abbildung 35: Phylogenetischer Baum verschiedener Aquaporine. A) orthodoxe Aquaporine, B) unorthodoxe Aquaporine und C) Aquaglyceroporine. Die plasmidialen AQP2s fallen hier auf, da sie nur entfernt mit den drei Klassen verwandt zu sein scheinen. Abbildung erstellt mit MegAlign des DNA-Star Lasergene Softwarepakets.

In der Vergangenheit wurden auch Proteine, die keine offensichtliche Sequenzähnlichkeit zu einem Aquaporin aufweisen, wie das Aquaporin der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* [151] als Aquaporin identifiziert. Dies bedeutet im Umkehrschluss auch, dass Proteine, die auf den ersten Blick wie ein Aquaporin aussehen, nicht zwangsläufig auch ein Aquaporin sein müssen. Funktionell handelt es sich bei PfAQP2 den Ergebnissen dieser Arbeit nach nicht um ein orthodoxes Aquaporin oder Aquaglyceroporin. Die Funktion dieses ungewöhnlichen Aquaporins bleibt also weiterhin unklar und muss weiter beleuchtet werden.

6. Ausblick

Ein wichtiger Punkt, der durch die Ergebnisse dieser Arbeit noch offenbleibt, ist die Funktionalität von PfAQP2 im zellfreien System. Da bisher nur die Wasserleitfähigkeit im zellfreien System untersucht wurde, muss auch überprüft werden, ob das Protein über eine Leitfähigkeit für andere Substrate wie Glycerol, Urea oder Ammoniak verfügt. Für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Struktur hat sich das zellfreie hergestellte Protein als dem aus der Hefe überlegen herausgestellt. Die zellfreie Synthese von PfAQP2 sollte mit LDAO anstelle Brij[®] 78 getestet werden, da ein Detergens-Wechsel zu LDAO während der Reinigung in der Lage war das Protein besser zu stabilisieren. Bei ausreichend großer Menge, Stabilität und Reinheit wäre sogar eine Kristallisation mit und ohne Loops möglich, was ein stark verbessertes Verständnis für dieses besondere Protein zur Folge hätte. Eine klassische Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie ist allgemein für Membranproteine schwierig und wird durch die Größe und Komplexität der flexiblen Bereiche des Proteins erheblich erschwert. Eine alternative könnte hier die Kryo-Elektronenmikroskopie sein. Da diese nicht auf eine Kristallisation des Proteins angewiesen ist, sondern das Protein mit der Matrix zusammen eingefroren wird, umgeht man den fehleranfälligen Prozess des Kristallisierens.

Durch sukzessive Veränderung des Proteins kann Rückschluss auf die strukturellen Ursachen für die fehlende Wasserleitfähigkeit des Proteins gemacht werden. Ein möglicher Angriffspunkt, der bisher nicht experimentell adressiert wurde, sind die Termini. Diese sind bekannt dafür an verschiedenen *gating*-Mechanismen beteiligt zu sein. Für Proteine der Familie der FNTs aus *Toxoplasma gondii* konnte gezeigt werden, dass eine Verkürzung der Termini sowohl zu einer Stabilisierung der Proteine als auch zu einer messbaren Funktion im Hefesystem führte [152].

Zusätzlich können auch noch weitere Bedingungen wie ein alkalisches Umgebungsmedium getestet werden, da in dieser Arbeit nur unter sauren Messbedingungen keine Veränderung der Leitfähigkeit beobachtet wurde. Dazu wäre es außerdem hilfreich die Lokalisation in den Hefen durch ein GFP-Fusionsprotein oder Markierung mit den spezifischen Antikörpern zu untersuchen. Hierfür würden sich Fluoreszenzmikroskopie und *fluorescence assisted cell sorting* (FACS) gut eignen.

Hierbei sind vor allem die Phosphorylierungsstellen im D-Loop und in den Termini interessant. Sollte jedoch eine intrazelluläre Lokalisation festgestellt werden, so wäre es denkbar, dass auch der A-Loop zum Zellinneren zeigt und als Interaktionspartner für eine Vielzahl von Proteinen innerhalb der Zelle zur Verfügung steht.

Ausblick

Eine generelle Untersuchung des Proteins am oder im Parasiten hätte mehrere Vorteile. Zum einen könnte die physiologische Relevanz geklärt werden. Dazu wäre es hilfreich, neben der Lokalisation auch das Stadium, in dem das Protein tatsächlich translatiert wird, zu bestimmen. Dabei könnte im Parasiten auch eine mögliche Co-Lokalisation von PfAQP1 und PfAQP2 überprüft werden. Eine weitere spannende Fragestellung ist, welche Funktion PfAQP2 innerhalb der geschlechtsreifen Gametozyten erfüllt. Ebenso wäre es interessant einen Blick in Richtung Protein-Protein-Interaktionen (PPI) zu werfen.

Ein Doppel-*Knock-out* von PfAQP1 und PfAQP2 würde die Frage adressieren, in wie weit PfAQP2 einen Ersatz für PfAQP1 darstellen kann. Die Frage dabei ist, ob die Parasiten ohne beide Proteine überlebensfähig sind.

7. Zusammenfassung

Alle Lebewesen, die wir kennen, sind auf den Austausch von Wasser und Nährstoffen, sowie Stoffwechselprodukten mit ihrer Umgebung angewiesen. Eine Familie von Membranproteinen, die für einen großen Teil dieses Austausches verantwortlich sind, umfasst die Aquaporine (AQPs) oder auch *Major Intrinsic Proteins* (MIPs), die in fast allen Lebewesen zu finden sind. Mit immer weiter voranschreitenden Genomsequenzierungen werden auch in immer mehr Arten unterschiedlichste Vertreter dieser Familie identifiziert. Die meisten sind bis heute jedoch kaum untersucht. Dennoch konnten bis heute neben den ursprünglichen Aufgaben als Kanalproteine weitere physiologisch wichtige Funktionen identifiziert werden, welche die Bedeutung dieser Proteine weiter unterstreicht. Das *Plasmodium falciparum* Aquaporin 2 (PfAQP2) vereint dabei in seiner Primärstruktur viele Charakteristika von orthodoxen und unorthodoxen Aquaporinen und bringt darüber hinaus eine ungewöhnliche und interessante Topologie mit. Darüber hinaus verfügt *P. falciparum* über ein gut untersuchtes Aquaglyceroporin, welches über ein breites, physiologisch sehr relevantes Solutspektrum verfügt. Auch wenn nachgewiesen wurde, dass PfAQP1 nicht essentiell ist, kommt die Frage auf, warum der Parasit ein ähnliches Protein exprimieren sollte. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in einem Hefebasierten Schwellungsassay, der durch Messung der Lichtstreuung durchgeführt wurde, keine Leitfähigkeit für Wasser oder Glycerol, die beiden Hauptsolute der MIP, von dem PfAQP2 ausgeht. Weiter wurden, aufgrund einer fehlenden dauerhaft positiv geladenen Aminosäure im Selektivitätsfilter (ar/R), bekannte aber als ungewöhnlich einzustufende Substrate, mit den Monocarboxylaten Laktat und Formiat getestet. Hierbei konnte auch bei einer Veränderung des pH-Wertes keine Leitfähigkeit für Monocarboxylate oder Wasser festgestellt werden. An Proteoliposomen aus polaren *E. coli* Phospholipiden, in deren Membran zellfrei hergestelltes PfAQP2 rekonstituiert wurde, konnte ebenfalls keine Permeabilität für Wasser beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass PfAQP2 mit der fehlenden Wasserleitfähigkeit eine der Kerneigenschaften aller Aquaporine, trotz ähnlicher Strukturmerkmale, nicht besitzt. Dies wäre im Einklang mit dem breiten Solutspektrum von PfAQP1. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Leitfähigkeit im zellfreien System und der Strukturaufklärung sind notwendig, um die Funktion dieses Proteins zu entschlüsseln.

8. Summary

All known life forms depend on the exchange of water and nutrients, as well as metabolic end products with their environment. A family of membrane proteins responsible for this exchange includes the aquaporins (AQPs) or major intrinsic proteins (MIPs) found in almost all life forms. As genome sequencing progresses, more and more members of this family are identified in more and more species. However, most of them have barely been studied to this day. Nevertheless, in addition to the core tasks as channel proteins, further physiologically important functions have been identified, which further emphasizes the importance of these proteins. The *Plasmodium falciparum* aquaporin 2 (PfAQP2) combines in its primary structure many characteristics of orthodox and unorthodox aquaporins and brings with it an unusual and interesting topology. In addition, *P. falciparum* has a well-studied aquaglyceroporin, which has a broad, physiologically relevant spectrum of solutes. Although it has been shown that PfAQP1 is not essential, the question arises as to why the parasite should express a possibly redundant protein. In this work it is shown that in a yeast-based swelling assay, no conductivity for water or glycerol, the two main solutes of the MIP, emanates from PfAQP2. Removal of two distinct features, the A and D loops did not remedy this lack of conductivity for water. Further, due to a lack of permanently positively charged amino acid in the selectivity filter (ar/R), uncommon but known substrates were tested with the monocarboxylates lactate and formate. In this case, even with a change in the pH no conductivity for monocarboxylates or water could be found. Also, no permeability to water could be observed with protein reconstituted to liposomes of polar *E. coli* phospholipids. This suggests that PfAQP2, with no water conductivity, does lack the core property of all aquaporins, despite similar structural features. Further investigations are necessary to decipher the function of this protein.

9. Literaturverzeichnis

1. Tan S, Tan HT & Chung MCM (2008). Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics* **8**, 3924–3932.
2. Ishibashi K, Kondo S, Hara S & Morishita Y (2011). The evolutionary aspects of aquaporin family. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **300**, R566–576.
3. Fadiel A, Isokpehi RD, Stambouli N, Hamza A, Benammar-Elgaaied A & Scalise TJ (2009). Protozoan parasite aquaporins. *Expert Rev Proteomics* **6**, 199–211.
4. Beitz E (2005). Aquaporins from pathogenic protozoan parasites: structure, function and potential for chemotherapy. *Biol. Cell* **97**, 373–383.
5. WHO (19.11.2018) World Malaria Report 2018, <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/en/>.
6. Bietz S, Montilla I, Külzer S, Przyborski JM & Lingelbach K (2009). Recruitment of human aquaporin 3 to internal membranes in the Plasmodium falciparum infected erythrocyte. *Mol. Biochem. Parasitol.* **167**, 48–53.
7. Simpson JA, Aarons L, Collins WE, Jeffery GM & White NJ (2002). Population dynamics of untreated Plasmodium falciparum malaria within the adult human host during the expansion phase of the infection. *Parasitology* **124**, 247–263.
8. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA & Dondorp AM (2014). Malaria. *Lancet* **383**, 723–735.
9. Baruch DI, Ma XC, Singh HB, Bi X, Pasloske BL & Howard RJ (1997). Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of Plasmodium falciparum infected erythrocytes to CD36. *Blood* **90**, 3766–3775.
10. Zardoya R (2005). Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol. Cell* **97**, 397–414.
11. Preston GM, Carroll TP, Guggino WB & Agre P (1992). Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* **256**, 385–387.
12. Gupta AB, Verma RK, Agarwal V, Vajpai M, Bansal V & Sankararamakrishnan R (2012). MIPModDB: a central resource for the superfamily of major intrinsic proteins. *Nucleic Acids Res.* **40**, D362–D369.

13. Benga G (2012). On the definition, nomenclature and classification of water channel proteins (aquaporins and relatives). *Mol. Aspects Med.* **33**, 514–517.
14. Bassarak B, Uzcategui NL, Schonfeld C & Duszenko M (2011). Functional characterization of three aquaglyceroporins from *Trypanosoma brucei* in osmoregulation and glycerol transport. *Cell. Physiol. Biochem.* **27**, 411–420.
15. Quigley F, Rosenberg JM, Shachar-Hill Y & Bohnert HJ (2002). From genome to function. *Genome Biol.* **3**(1)
16. Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, B., Engel, B., Fujiyoshi, Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* **407**, 599–605.
17. Kruse E, Uehlein N & Kaldenhoff R (2006). The aquaporins. *Genome Biol.* **7**, 206.
18. Li H, Chen H, Steinbronn C, Wu B, Beitz E, Zeuthen T & Voth GA (2011). Enhancement of proton conductance by mutations of the selectivity filter of aquaporin-1. *J. Mol. Biol.* **407**, 607–620.
19. Wu B, Steinbronn C, Alsterfjord M, Zeuthen T & Beitz E (2009). Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel. *EMBO J.* **28**, 2188–2194.
20. Wree D, Wu B, Zeuthen T & Beitz E (2011). Requirement for asparagine in the aquaporin NPA sequence signature motifs for cation exclusion. *FEBS J.* **278**, 740–748.
21. Sui H, Han BG, Lee JK, Walian P & Jap BK (2001). Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* **414**, 872–878.
22. Fu D, Libson A, Miercke LJ, Weitzman C, Nollert P, Krucinski J & Stroud RM (2000). Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* **290**, 481–486.
23. Savage DF, Egea PF, Robles-Colmenares Y, O'Connell JD3 & Stroud RM (2003). Architecture and selectivity in aquaporins: 2.5 Å X-ray structure of aquaporin Z. *PLoS Biol.* **1**, E72.
24. Jiang J, Daniels BV & Fu D (2006). Crystal structure of AqpZ tetramer reveals two distinct Arg-189 conformations associated with water permeation through the narrowest constriction of the water-conducting channel. *J. Biol. Chem.* **281**, 454–460.

Literaturverzeichnis

25. Tajkhorshid E, Nollert P, Jensen MØ, Miercke LJW, O'Connell J, Stroud RM & Schulten K (2002). Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science* **296**, 525–530.
26. Lee JK, Kozono D, Remis J, Kitagawa Y, Agre P & Stroud RM (2005). Structural basis for conductance by the archaeal aquaporin AqpM at 1.68 Å. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 18932–18937.
27. Fischer G, Kosinska-Eriksson U, Aponte-Santamaría C, Palmgren M, Geijer C, Hedfalk K, Hohmann S, Groot BL de, Neutze R & Lindkvist-Petersson K (2009). Crystal structure of a yeast aquaporin at 1.15 angstrom reveals a novel gating mechanism. *PLoS Biol.* **7**, e1000130.
28. Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R & Kjellbom P (2006). Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* **439**, 688–694.
29. Gonen T, Sliz P, Kistler J, Cheng Y & Walz T (2004). Aquaporin-0 membrane junctions reveal the structure of a closed water pore. *Nature* **429**, 193–197.
30. Gonen T, Cheng Y, Sliz P, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y, Harrison SC & Walz T (2005). Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. *Nature* **438**, 633–638.
31. Harries WEC, Akhavan D, Miercke LJW, Khademi S & Stroud RM (2004). The channel architecture of aquaporin 0 at a 2.2-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 14045–14050.
32. Vahedi-Faridi A, Lodowski D & Engel A (2014) The structure of aquaporin.
33. Frick A, Eriksson U, Mattia FD, Oberg F, Hedfalk K, Neutze R, Grip WD, Deen PMT & Tornroth-horsefield S (2014) X-ray structure of human aquaporin 2 and its implications for nephrogenic diabetes insipidus and trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 6305-6310.
34. Ho JD, Yeh R, Sandstrom A, Chorny I, Harries WEC, Robbins RA, Miercke LJW & Stroud RM (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.

35. Horsefield R, Nordén K, Fellert M, Backmark A, Törnroth-Horsefield S, van Terwisscha Scheltinga AC, Kvassman J, Kjellbom P, Johanson U & Neutze R (2008). High-resolution x-ray structure of human aquaporin 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 13327–13332.
36. Gotfryd K, Wang K, Missel JW, Pedersen PA & Gourdon P (2018) Human adipose glycerol flux is regulated by a pH gate in AQP10. *Nat Commun* **9**: 4749-4749
37. Hiroaki Y, Tani K, Kamegawa A, Gyobu N, Nishikawa K, Suzuki H, Walz T, Sasaki S, Mitsuoka K, Kimura K, Mizoguchi A & Fujiyoshi Y (2006). Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion. *J. Mol. Biol.* **355**, 628–639.
38. Tani K, Mitsuma T, Hiroaki Y, Kamegawa A, Nishikawa K, Tanimura Y & Fujiyoshi Y (2009). Mechanism of aquaporin-4's fast and highly selective water conduction and proton exclusion. *J. Mol. Biol.* **389**, 694–706.
39. Newby ZER, O'Connell J3, Robles-Colmenares Y, Khademi S, Miercke LJ & Stroud RM (2008). Crystal structure of the aquaglyceroporin PfAQP from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 619–625.
40. Hedfalk K, Pettersson N, Oberg F, Hohmann S & Gordon E (2008). Production, characterization and crystallization of the *Plasmodium falciparum* aquaporin. *Protein Expr. Purif.* **59**, 69–78.
41. Pao GM, Wu L-F, Johnson KD, Höfte H, Chrispeels MJ, Sweet G, Sandal NN & Saier MH (1991). Evolution of the MIP family of integral membrane transport proteins. *Mol. Microbiol.* **5**, 33–37.
42. Viadiu H, Gonen T & Walz T (2007). Projection map of aquaporin-9 at 7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **367**, 80–88.
43. Geyer RR, Musa-Aziz R, Qin X & Boron WF (2013). Relative CO₂/NH₃ selectivities of mammalian aquaporins 0-9. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **304**, C985–C994.
44. Uehlein N, Lovisollo C, Siefritz F & Kaldenhoff R (2003). The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* **425**, 734–737.
45. Hub JS & Groot BL de (2008). Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 1198–1203.

46. Tchekneva EE, Khuchua Z, Davis LS, Kadkina V, Dunn SR, Bachman S, Ishibashi K, Rinchik EM, Harris RC, Dikov MM & Breyer MD (2008). Single amino acid substitution in aquaporin 11 causes renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 1955–1964.
47. van der Goot FG, Podevin RA & Corman BJ (1989). Water permeabilities and salt reflection coefficients of luminal, basolateral and intracellular membrane vesicles isolated from rabbit kidney proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta* **986**, 332–340.
48. Ishikawa F, Suga S, Uemura T, Sato MH & Maeshima M (2005). Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **579**, 5814–5820.
49. Danielson JAH & Johanson U (2008). Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol.* **8**, 45.
50. Ishibashi K, Hara S & Kondo S (2009). Aquaporin water channels in mammals. *Clin. Exp. Nephrol.* **13**, 107–117.
51. Itoh T, Rai T, Kuwahara M, Ko SBH, Uchida S, Sasaki S & Ishibashi K (2005). Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 832–838.
52. Verkman AS (2009). Knock-out models reveal new aquaporin functions. *Handb Exp Pharmacol*, 359–381.
53. Ruiz-Ederra J & Verkman AS (2007). Aquaporin-1 independent microvessel proliferation in a neonatal mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 4802–4810.
54. Verkman AS, Hara-Chikuma M & Papadopoulos MC (2008). Aquaporins—new players in cancer biology. *J. Mol. Med.* **86**, 523–529.
55. Liang H-T, Feng X-C & Ma T-H (2008). Water channel activity of plasma membrane affects chondrocyte migration and adhesion. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **35**, 7–10.
56. Ikeda M, Beitz E, Kozono D, Guggino WB, Agre P & 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.
57. Bienert GP, Moller ALB, Kristiansen KA, Schulz A, Moller IM, Schjoerring JK & Jahn TP (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* **282**, 1183–1192.

58. Dynowski M, Schaaf G, Loque D, Moran O & Ludewig U (2008). Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂. *Biochem. J.* **414**, 53–61.
59. Holz GG (1977). Lipids and the malarial parasite. *Bull. World Health Organ.* **55**, 237–248.
60. Tamás MJ, Karlgren S, Bill RM, Hedfalk K, Allegri L, Ferreira M, Thevelein JM, Rydström J, Mullins JGL & Hohmann S (2003). A Short Regulatory Domain Restricts Glycerol Transport through Yeast Fps1p. *J. Biol. Chem.* **278**, 6337–6345.
61. Geijer C, Ahmadpour D, Palmgren M, Filipsson C, Klein DM, Tamás MJ, Hohmann S & Lindkvist-Petersson K (2012). Yeast aquaglyceroporins use the transmembrane core to restrict glycerol transport. *J. Biol. Chem.* **287**, 23562–23570.
62. Törnroth-Horsefield S, Hedfalk K, Fischer G, Lindkvist-Petersson K & Neutze R (2010). Structural insights into eukaryotic aquaporin regulation. *FEBS Lett.* **584**, 2580–2588.
63. van Balkom BWM, Savelkoul PJM, Markovich D, Hofman E, Nielsen S, van der Sluijs P & Deen PMT (2002). The role of putative phosphorylation sites in the targeting and shuttling of the aquaporin-2 water channel. *J. Biol. Chem.* **277**, 41473–41479.
64. Deen PMT & Knoers NVAM (1998). Physiology and pathophysiology of the aquaporin-2 water channel. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **7**, 37–42.
65. Nielsen S, Frør J & Knepper MA (1998). Renal aquaporins. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **7**, 509–516.
66. Johansson I (1998). Water Transport Activity of the Plasma Membrane Aquaporin PM28A Is Regulated by Phosphorylation. *Plant Cell* **10**, 451–460.
67. Németh-Cahalan KL, Kalman K & Hall JE (2004). Molecular basis of pH and Ca²⁺ regulation of aquaporin water permeability. *J. Gen. Physiol.* **123**, 573–580.
68. Zelenina M, Bondar AA, Zelenin S & Aperia A (2003). Nickel and extracellular acidification inhibit the water permeability of human aquaporin-3 in lung epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 30037–30043.
69. Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu D-T, Bligny R & Maurel C (2003). Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* **425**, 393–397.

Literaturverzeichnis

70. Zelenina M, Tritto S, Bondar AA, Zelenin S & Aperia A (2004). Copper inhibits the water and glycerol permeability of aquaporin-3. *J. Biol. Chem.* **279**, 51939–51943.
71. Gunnarson E, Axehult G, Baturina G, Zelenin S, Zelenina M & Aperia A (2005). Lead induces increased water permeability in astrocytes expressing aquaporin 4. *Neuroscience* **136**, 105–114.
72. Lam AKM, Ko BCB, Tam S, Morris R, Yang JY, Chung SK & Chung SSM (2004). Osmotic response element-binding protein (OREBP) is an essential regulator of the urine concentrating mechanism. *J. Biol. Chem.* **279**, 48048–48054.
73. Johansson I, Larsson C, Ek B & Kjellbom P (1996). The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca^{2+} and apoplastic water potential. *Plant Cell* **8**, 1181–1191.
74. Takano J, Wada M, Ludewig U, Schaaf G, Wirén N von & Fujiwara T (2006). The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* **18**, 1498–1509.
75. Mitani N, Yamaji N & Ma JF (2008). Characterization of substrate specificity of a rice silicon transporter, Lsi1. *Pflugers Arch.* **456**, 679–686.
76. Pastor-Soler N, Bagnis C, Sabolic I, Tyszkowski R, McKee M, van Hoek A, Breton S & Brown D (2001). Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. *Biol. Reprod.* **65**, 384–393.
77. Bienert GP, Schüssler MD & Jahn TP (2008). Metalloids. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 20–26.
78. Tsukaguchi H, Shayakul C, Berger UV, Mackenzie B, Devidas S, Guggino WB, van Hoek AN & Hediger MA (1998). Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J. Biol. Chem.* **273**, 24737–24743.
79. Rothert M, Rönfeldt D & Beitz E (2017). Electrostatic attraction of weak monoacid anions increases probability for protonation and passage through aquaporins. *J. Biol. Chem.* **292**, 9358–9364.
80. Gorelick DA, Praetorius J, Tsunenari T, Nielsen S & Agre P (2006). Aquaporin-11. *BMC Biochem.* **7**, 14.

81. Tingaud-Sequeira A, Calusinska M, Finn RN, Chauvigné F, Lozano J & Cerdà J (2010). The zebrafish genome encodes the largest vertebrate repertoire of functional aquaporins with dual paralogy and substrate specificities similar to mammals. *BMC Evol. Biol.* **10**, 38.
82. Yakata K, Hiroaki Y, Ishibashi K, Sohara E, Sasaki S, Mitsuoka K & Fujiyoshi Y (2007). Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 688–693.
83. Jarius S, Paul F, Franciotta D, Waters P, Zipp F, Hohlfeld R, Vincent A & Wildemann B (2008). Mechanisms of disease. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **4**, 202–214.
84. Tewari N, Kalkunte S, Murray DW & Sharma S (2009). The water channel aquaporin 1 is a novel molecular target of polychlorinated biphenyls for in utero anomalies. *J. Biol. Chem.* **284**, 15224–15232.
85. Lutz F, Mohr M, Grimmig M, Leidolf R & Linder D (1993). Pseudomonas aeruginosa cytotoxin-binding protein in rabbit erythrocyte membranes. An oligomer of 28 kDa with similarity to transmembrane channel proteins. *Eur. J. Biochem.* **217**, 1123–1128.
86. Kumari S, Gao J, Mathias RT, Sun X, Eswaramoorthy A, Browne N, Zhang N & Varadaraj K (2017). Aquaporin 0 Modulates Lens Gap Junctions in the Presence of Lens-Specific Beaded Filament Proteins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **58**, 6006–6019.
87. Sindhu Kumari S, Gupta N, Shiels A, FitzGerald PG, Menon AG, Mathias RT & Varadaraj K (2015). Role of Aquaporin 0 in lens biomechanics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **462**, 339–345.
88. Kumari SS, Gandhi J, Mustehsan MH, Eren S & Varadaraj K (2013). Functional characterization of an AQP0 missense mutation, R33C, that causes dominant congenital lens cataract, reveals impaired cell-to-cell adhesion. *Exp. Eye Res.* **116**, 371–385.
89. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan M-S, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DMA, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM & Barrell B (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**, 498–511.

90. Beitz E (2000). TEXtopo. *Bioinformatics* **16**, 1050–1051.
91. Hansen M, Kun JFJ, Schultz JE & Beitz E (2002). A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J. Biol. Chem.* **277**, 4874–4882.
92. Song J, Almasalmeh A, Krenc D & Beitz E (2012). Molar concentrations of sorbitol and polyethylene glycol inhibit the *Plasmodium aquaglyceroporin* but not that of *E. coli*: involvement of the channel vestibules. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 1218–1224.
93. Vial HJ & Ancelin ML. Malarial Lipids. In *Intracellular Parasites*. (Avila JL & Harris JR, eds), pp. 259–306. Boston, MA. Springer US; Imprint; Springer.
94. Zeuthen T, Wu B, Pavlovic-Djuranovic S, Holm LM, Uzcategui NL, Duszenko M, Kun JFJ, Schultz JE & Beitz E (2006). Ammonia permeability of the aquaglyceroporins from *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* **61**, 1598–1608.
95. Promeneur D, Liu Y, Maciel J, Agre P, King LS & Kumar N (2007). Aquaglyceroporin PbAQP during intraerythrocytic development of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 2211–2216.
96. Promeneur D, Mlambo G, Agre P & Coppens I (2018). Aquaglyceroporin PbAQP is required for efficient progression through the liver stage of *Plasmodium* infection. *Sci Rep* **8**, 655.
97. Gene PF3D7_0810400. http://plasmodb.org/plasmo/app/record/gene/PF3D7_0810400.
98. Cuthbertson JM, Doyle DA & Sansom MSP (2005). Transmembrane helix prediction. *Protein Eng. Des. Sel.* **18**, 295–308.
99. Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, Moon C, Guggino WB & Nielsen S (1993). Aquaporin CHIP. *Am. J. Physiol.* **265**, F463-76.
100. López-Barragán MJ, Lemieux J, Quiñones M, Williamson KC, Molina-Cruz A, Cui K, Barillas-Mury C, Zhao K & Su X-z (2011). Directional gene expression and antisense transcripts in sexual and asexual stages of *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics* **12**, 587.
101. Schwarz D, Junge F, Durst F, Frölich N, Schneider B, Reckel S, Sobhanifar S, Dötsch V & Bernhard F (2007). Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nat. Protoc.* **2**, 2945–2957.

102. Schneider B, Junge F, Shirokov VA, Durst F, Schwarz D, Dötsch V & Bernhard F (2010). Membrane protein expression in cell-free systems. *Methods Mol. Biol.* **601**, 165–186.
103. Zelazny E, Borst JW, Muylaert M, Batoko H, Hemminga MA & Chaumont F (2007). FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 12359-12364.
104. Bellati J, Champeyroux C, Hem S, Rofidal V, Krouk G, Maurel C & Santoni V (2016). Novel Aquaporin Regulatory Mechanisms Revealed by Interactomics. *Mol. Cell Proteomics* **15**, 3473–3487.
105. Lasonder E, Rijpma SR, van Schaijk BCL, Hoeijmakers WAM, Kensche PR, Gresnigt MS, Italiaander A, Vos MW, Woestenenk R, Bousema T, Mair GR, Khan SM, Janse CJ, Bártfai R & Sauerwein RW (2016). Integrated transcriptomic and proteomic analyses of *P. falciparum* gametocytes. *Nucleic Acids Res.* **44**, 6087–6101.
106. Le Roch KG, Zhou Y, Blair PL, Grainger M, Moch JK, Haynes JD, La Vega P de, Holder AA, Batalov S, Carucci DJ & Winzeler EA (2003). Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science* **301**, 1503–1508.
107. Mair GR, Braks JAM, Garver LS, Wiegant JCAG, Hall N, Dirks RW, Khan SM, Dimopoulos G, Janse CJ & Waters AP (2006). Regulation of sexual development of *Plasmodium* by translational repression. *Science* **313**, 667–669.
108. Guerreiro A, Deligianni E, Santos JM, Silva PAGC, Louis C, Pain A, Janse CJ, Franke-Fayard B, Carret CK, Siden-Kiamos I & Mair GR (2014). Genome-wide RIP-Chip analysis of translational repressor-bound mRNAs in the *Plasmodium* gametocyte. *Genome Biol.* **15**, 493.
109. Gonen T & Walz T (2006). The structure of aquaporins. *Q. Rev. Biophys.* **39**, 361–396.
110. Ishibashi K, Morishita Y & Tanaka Y (2017). The Evolutionary Aspects of Aquaporin Family. *Adv. Exp. Med. Biol.* **969**, 35–50.
111. Tsukaguchi H, Weremowicz S, Morton CC & Hediger MA (1999). Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *Am. J. Physiol.* **277**, F685-96.

112. Ishibashi K (2009). New members of mammalian aquaporins. *Handb. Exp. Pharmacol.* 190, 251–262.
113. Nozaki K, Ishii D & Ishibashi K (2008). Intracellular aquaporins. *Pflügers Arch.: European journal of physiology.* **456**, 701–707.
114. 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 & Ishibashi K (2005). Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7770–7779.
115. Ishibashi K, Tanaka Y & Morishita Y (2014). The role of mammalian superaquaporins inside the cell. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 1507–1512.
116. Benkert P, Biasini M & Schwede T (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* **27**, 343–350.
117. Borgnia MJ & 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.
118. Dannenberg JJ (1998). An Introduction to Hydrogen Bonding By George A. Jeffrey. *J. Am. Chem. Soc.* **120**(22), 5604–5604
119. Hedfalk K, Törnroth-Horsefield S, Nyblom M, Johanson U, Kjellbom P & Neutze R (2006). Aquaporin gating. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 447–456.
120. Wang Y, Schulten K & Tajkhorshid E (2005). What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF. *Structure* **13**, 1107–1118.
121. Gonen, T., Sliz, P., Kistler, J., Cheng, Y., Walz, T. (2004). Aquaporin-0 membrane junctions reveal the structure of a closed water pore. *Nature* **429**, 193–197.
122. Zeuthen T & Klaerke DA (1999). Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H⁺. *J. Biol. Chem.* **274**, 21631–21636.
123. Yasui M, Hazama A, Kwon TH, Nielsen S, Guggino WB & Agre P (1999). Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* **402**, 184–187.
124. Han Z & Patil RV (2000). Protein kinase A-dependent phosphorylation of aquaporin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 328–332.

125. Mattia F de, Savelkoul PJM, Kamsteeg E-J, Konings IBM, van der Sluijs P, Mallmann R, Oksche A & Deen PMT (2005). Lack of arginine vasopressin-induced phosphorylation of aquaporin-2 mutant AQP2-R254L explains dominant nephrogenic diabetes insipidus. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2872–2880.
126. McDill BW, Li S-Z, Kovach PA, Ding L & Chen F (2006). Congenital progressive hydronephrosis (cph) is caused by an S256L mutation in aquaporin-2 that affects its phosphorylation and apical membrane accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 6952–6957.
127. Zelenina M, Zelenin S, Bondar AA, Brismar H & Aperia A (2002). Water permeability of aquaporin-4 is decreased by protein kinase C and dopamine. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **283**, F309–F318.
128. Han Z, Wax MB & Patil RV (1998). Regulation of Aquaporin-4 Water Channels by Phorbol Ester-dependent Protein Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **273**, 6001–6004.
129. Kosugi-Tanaka C, Li X, Yao C, Akamatsu T, Kanamori N & Hosoi K (2006). Protein kinase A-regulated membrane trafficking of a green fluorescent protein-aquaporin 5 chimera in MDCK cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 337–344.
130. Johansson I, Karlsson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larsson C & Kjellbom P (1998). Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* **10**, 451–459.
131. Blom N, Gammeltoft S & Brunak S (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294**, 1351–1362.
132. Chandy G, Zampighi GA, Kreman M & Hall JE (1997). Comparison of the Water Transporting Properties of MIP and AQP1. *J. Membr. Biol.* **159**, 29–39.
133. Kushmerick C, Rice SJ, Baldo GJ, Haspel HC & Mathias RT (1995). Ion, water and neutral solute transport in *Xenopus* oocytes expressing frog lens MIP. *Exp. Eye Res.* **61**, 351–362.
134. Dunia I (1987). Electron microscopic observations of reconstituted proteoliposomes with the purified major intrinsic membrane protein of eye lens fibers. *J. Cell Biol.* **105**, 1679–1689.
135. Kumari SS & Varadaraj K (2009). Intact AQP0 performs cell-to-cell adhesion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 1034–1039.

136. Michea LF, La Fuente M de & Lagos N (2002). Lens major intrinsic protein (MIP) promotes adhesion when reconstituted into large unilamellar liposomes. *Biochemistry* **33**, 7663–7669.
137. Zampighi GA (1989). The structural organization and protein composition of lens fiber junctions. *J. Cell Biol.* **108**, 2255–2275.
138. Wang Z & Schey KL (2017). Identification of a direct Aquaporin-0 binding site in the lens-specific cytoskeletal protein filensin. *Exp. Eye Res.* **159**, 23–29.
139. Landis DM & Reese TS (1974). Arrays of particles in freeze-fractured astrocytic membranes. *J. Cell Biol.* **60**, 316–320.
140. Silberstein C, Bouley R, Huang Y, Fang P, Pastor-Soler N, Brown D & van Hoek AN (2004). Membrane organization and function of M1 and M23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **287**, F501-11.
141. Fenton RA, Moeller HB, Zelenina M, Snaebjornsson MT, Holen T & MacAulay N (2010). Differential water permeability and regulation of three aquaporin 4 isoforms. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 829–840.
142. Smith BL, Preston GM, Spring FA, Anstee DJ & Agre P (1994). Human red cell aquaporin CHIP. I. Molecular characterization of ABH and Colton blood group antigens. *J. Clin. Invest.* **94**, 1043–1049.
143. Roudier N, Ripoche P, Gane P, Le Pennec PY, Daniels G, Cartron J-P & Bailly P (2002). AQP3 deficiency in humans and the molecular basis of a novel blood group system, GIL. *J. Biol. Chem.* **277**, 45854–45859.
144. Zanghì G, Vembar SS, Baumgarten S, Ding S, Guizetti J, Bryant JM, Mattei D, Jensen ATR, Rénia L, Goh YS, Sauerwein R, Hermsen CC, Franetich J-F, Bordessoulles M, Silvie O, Soulard V, Scatton O, Chen P, Mecheri S, Mazier D & Scherf A (2018). A Specific PfEMP1 Is Expressed in *P. falciparum* Sporozoites and Plays a Role in Hepatocyte Infection. *Cell Rep.* **22**, 2951–2963.
145. Alano P (2007). *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Mol. Microbiol.* **66**, 291–302.

146. Bushell E, Gomes AR, Sanderson T, Anar B, Girling G, Herd C, Metcalf T, Modrzynska K, Schwach F, Martin RE, Mather MW, McFadden GI, Parts L, Rutledge GG, Vaidya AB, Wengelnik K, Rayner JC & Billker O (2017). Functional profiling of a plasmodium genome reveals an abundance of essential genes. *Cell* **170**, 260–272.
147. Stroud RM, Miercke LJW, O’Connell J, Khademi S, Lee JK, Remis J, Harries W, Robles Y & Akhavan D (2003). Glycerol facilitator GlpF and the associated aquaporin family of channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 424–431.
148. Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Kageyama Y, Tohsaka A, Suzuki F, Marumo F & Sasaki S (1997). Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *J. Biol. Chem.* **272**, 20782–20786.
149. Pavlovic-Djuranovic S, Schultz JE & Beitz E (2003). A single aquaporin gene encodes a water/glycerol/urea facilitator in *Toxoplasma gondii* with similarity to plant tonoplast intrinsic proteins 1. *FEBS Lett.* **555**, 500–504.
150. Shayakul C, Tsukaguchi H, Berger UV & Hediger MA (2001). Molecular characterization of a novel urea transporter from kidney inner medullary collecting ducts. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **280**, F487–F494.
151. Kaufmann N, Mathai JC, Hill WG, Dow JAT, Zeidel ML & Brodsky JL (2005). Developmental expression and biophysical characterization of a *Drosophila melanogaster* aquaporin. *Am. J. Physiol.* **289**, C397–C407.
152. Erler H, Ren B, Gupta N & Beitz E (2018). The intracellular parasite *Toxoplasma gondii* harbors three druggable FNT-type formate and l-lactate transporters in the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **293**, 17622–17630.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, selbstständig verfasst habe und keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet habe. Die Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Außerdem versichere ich, dass mir noch nie ein akademischer Grad aberkannt wurde.

Malte Mäder

Kiel, 2019