

Untersuchungen zur Struktur und Funktion
des mitochondrialen Phosphatcarriers
aus *Saccharomyces cerevisiae*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Andrea Christiane Meinhardt

aus Rüsselsheim

Köln, April 2001

Berichterstatter:

Prof. Dr. Reinhard Krämer

Privatdozentin Dr. Sabine Waffenschmidt

Prüfungstermin: 12. Juni 2001

Investigation on structure and function of the mitochondrial phosphate carrier from *Saccharomyces cerevisiae*

The mitochondrial phosphate carrier (PiC) belongs to the mitochondrial carrier family. Members of this protein family comprise six transmembrane segments and have been shown to exist as dimers in the solubilized state. PiC, a 32 kDa protein with 311 amino acids, is responsible for the import of inorganic phosphate into the mitochondrial matrix. The phosphate carrier from *Saccharomyces cerevisiae* was expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies in large amounts. It was reconstituted into liposomes in a functionally active form. The experimentation system for reconstitution was revised and modified to yield higher activity and reproducibility. Using this setup a methodology for studying the accessibility of different amino acids using methanethiosulfonate- (MTS)-reagents was established. With this methodology the existing model of the putative translocation pathway was characterized.

Untersuchungen zur Struktur und Funktion des mitochondrialen Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae*

Der mitochondriale Phosphatcarrier (PiC) wird der mitochondrialen Carrierfamilie zugeordnet. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie bilden sechs transmembrane Bereiche aus und liegen im solubilisierten Zustand in dimerer Form vor. PiC, ein 32 kDa Protein mit 311 Aminosäuren, ist für die Aufnahme von anorganischem Phosphat in die Matrix verantwortlich. Der Carrier aus *Saccharomyces cerevisiae* kann in größeren Mengen in *Escherichia coli* exprimiert werden und aggregiert dabei in *inclusion bodies*. PiC kann funktionell aktiv in Liposomen rekonstituiert werden. Die Rekonstitutionsmethode wurde überarbeitet und im Hinblick auf höhere Transportaktivitäten und Reproduzierbarkeit verbessert. Unter Verwendung dieses Systems wurde eine Methode zur Messung der Zugänglichkeit von verschiedenen Aminosäuren mit Hilfe von Methanthiosulfonat-(MTS)-Reagentien etabliert. Mit diesem System wurde der putative Translokationsweg näher charakterisiert.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Funktion von Mitochondrien - Stofftransport durch mitochondriale Carrier	1
1.2	Die Strukturfamilie der mitochondrialen Carrier	2
1.3	Der mitochondriale Phosphatcarrier	5
1.4	Kinetische Eigenschaften des mitochondrialen Phosphatcarriers	6
1.5	Strukturelle Untersuchungen mit Hilfe von Methanthiosulfonat-(MTS)- Reagentien	9
1.6	Zielsetzung	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.2	Verwendete Stämme und Plasmide	14
2.3	Molekularbiologische Arbeiten	14
2.3.1	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen für <i>E. coli</i>	14
2.3.2	Isolierung von DNA	16
2.3.3	Modifikation von DNA	16
2.3.4	Agarosegelelektrophorese	16
2.3.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	16
2.3.6	Ligierung von Plasmid-DNA	17
2.3.7	Transformation von <i>E. coli</i>	17
2.3.8	Ortsgerichtete Mutagenese	17
2.3.9	DNA-Sequenzierung	18
2.4	Biochemische Methoden	19
2.4.1	Präparation des Phosphatcarriers aus <i>inclusion bodies</i>	19
2.4.2	Rekonstitution	20
2.4.2.1	Vorbereitung der Truthahnlipide	20
2.4.2.2	Vorbereitung der <i>E. coli</i> Lipide	20
2.4.2.3	Rekonstitution nach Rigaud (Rigaud <i>et al.</i> , 1995)	20
2.4.2.3.1	Trübungsmessungen	20

INHALTSVERZEICHNIS

2.4.2.3.2	Rekonstitution	21
2.4.2.4	Rekonstitution nach Krämer und Heberger (1986)	21
2.4.3	Transportmessungen	22
2.4.3.1	Transportmessung mit der Mehrfachfiltrationsanlage	22
2.4.3.2	Transportmessung mit Hilfe von Anionenaustauschern	23
2.4.3.3	Präparation der Anionenaustauschsäulen	23
2.4.3.4	Innenvolumenbestimmung	23
2.4.3.5	Vortausch	24
2.4.3.6	Rücktausch	25
2.4.3.7	Efflux	26
2.4.4	Proteinbestimmungen	27
2.4.5	Polyacrylamidgelelektrophorese	27
2.4.6	Zugänglichkeitsstudien	27
3	Ergebnisse	30
3.1	Optimierung des Meßsystems	30
3.1.1	Vorbehandlung des Proteins	30
3.1.2	Rekonstitution nach Rigaud (Rigaud <i>et al.</i> , 1995)	31
3.1.3	Variation der zur Rekonstitution verwendeten Lipide	32
3.2	Charakterisierung des optimierten Meßsystems	34
3.3	Die funktionale Bedeutung der nativen Cysteine im PiC	38
3.4	Zugänglichkeitsstudien an ausgewählten Positionen im mitochondrialen Phosphatcarrier	41
3.4.1	Charakterisierung der erzeugten rekombinanten Proteine	42
3.4.2	Etablierung des MTS-Zugänglichkeitssystems	45
3.4.3	Untersuchung der Zugänglichkeiten der erzeugten rekombinanten Proteine	50
4	Diskussion	56
4.1	Optimierung der Rekonstitution und Charakterisierung des Meßsystems	56
4.2	Zugänglichkeitsstudien am mitochondrialen Phosphatcarrier	58
4.2.1	Charakterisierung der erzeugten rekombinanten Proteine	59
4.2.2	Etablierung eines Systems zur Messung von Zugänglichkeiten mit MTS-Reagentien	60
4.2.3	Die Orientierung des mitochondrialen Phosphatcarriers in <i>E. coli</i> Proteoliposomen	61
4.2.4	Wo befindet sich der Translokationsweg?	62

INHALTSVERZEICHNIS

4.2.5	Mechanistische Betrachtungen	64
4.2.6	Mögliche Salzbrücken im mitochondrialen Phosphatcarrier	65
5	Zusammenfassung	67

Abkürzungsverzeichnis

AAC	ADP/ATP-Carrier
BSA	Rinderserumalbumin
C ₁₂ E ₈	Octaethylglykolmonododecylether
CCS	PiC _{SC} mit C300S Mutation
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CSS	PiC _{SC} mit C134S und C300S Mutationen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
GABA	γ-Amino-Buttersäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	kilo Dalton
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
KP _i	Kaliumphosphat
MCF	mitochondriale Carrierfamilie
MTS	Methanthiosulfonat
MTSEA	2-Aminoethyl-Methanthiosulfonat
MTSET	2-Trimethylethyl-Methanthiosulfonat
MTSES	2-Sulfonatoethyl-Methanthiosulfonat
NEM	N-Ethylmaleimid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PiC	Phosphatcarrier
PiC _{BHM}	Phosphatcarrier aus Rinderherzmitochondrien
PiC _{SC}	mitochondrialer Phosphatcarrier aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
SCC	PiC _{SC} mit C28S Mutation
SCS	PiC _{SC} mit C28S und C300S Mutationen
SDS	Natriumdodecylsulfat

INHALTSVERZEICHNIS

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SLS	Natrium-N-Lauroylsarcosinat
SSC	PiC _{SC} mit C28S und C134S Mutationen
SSS	cysteinfreier PiC _{SC}
TE	Tris-EDTA
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-Diol
TSR	<i>template suppression reagent</i>
U	unit (enzymatische Aktivität)
V _{max}	maximale Umsatzrate
WT	Wildtyp
ü. N.	über Nacht

1 Einleitung

1.1 Funktion von Mitochondrien - Stofftransport durch mitochondriale Carrier

Mitochondrien sind energiewandelnde Organellen eukaryontischer Zellen. Die wichtigste Funktion dieser Organellen ist die Bereitstellung von Adenosintriphosphat (ATP), welches in der mitochondrialen Matrix synthetisiert wird. Die Synthese von ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat ist der letzte Schritt der oxidativen Phosphorylierung, bei der Elektronen von Reduktionsäquivalenten schrittweise über die Komplexe der Atmungskette auf Sauerstoff übertragen werden. Der Fluß der Elektronen zum Sauerstoff ist an den vektoriellen Transport von Protonen über die innere mitochondriale Membran gekoppelt, wodurch ein elektrochemisches Protonenpotential aufgebaut wird. Der Rückstrom der Protonen durch den F_o -Teil der ATP-Synthase ist mit der ATP-Synthese am F_1 -Teil des Enzyms gekoppelt. Diese Zusammenhänge wurden erstmals von Peter Mitchell als "chemiosmotische Hypothese" publiziert (Mitchell, 1966, 1976). Desweiteren laufen in der mitochondrialen Matrix verschiedene katabole Reaktionen, wie z. B. der Tricarbonsäurezyklus, Teile des Harnstoffzyklus und die β -Oxidation der Fettsäuren, zum Teil aber auch anabole Reaktionen wie Teilschritte der Glukoneogenese ab.

Mitochondrien besitzen zwei Membranen. Der Aufbau des elektrochemischen Protonenpotentials setzt eine Permeabilitätsbarriere voraus. Die äußere mitochondriale Membran ist aufgrund der vorhandenen Porine permeabel für die meisten Metabolite bis zu einer Masse von 10 kDa (Benz, 1985; Manella *et al.*, 1992; Manella 1996; Sorgato und Moran, 1993). Die innere Mitochondrienmembran hingegen dient als erforderliche Permeabilitätsbarriere. Der Stofftransport über diese Membran wird von einer Reihe spezifischer Carrier katalysiert (La Noue und Schoolwerth, 1979, 1984; Krämer und Palmieri, 1989, 1992). Hierdurch wird die Versorgung der mitochondrialen Matrix mit Metaboliten wie z. B. Pyruvat, Malat und Fettsäuren gewährleistet. Die Carrier katalysieren zumeist den Austausch verschiedener Sub-

KAPITEL 1. EINLEITUNG

strate gegeneinander oder koppeln den Transport von Substraten an das über die Membran anliegende elektrochemische Protonenpotential.

Mit einem maximalen Anteil von 13 % am gesamten in der inneren Mitochondrienmembran vorhandenen Protein (Klingenberg, 1981) ist der ADP/ATP-Carrier (AAC) der am häufigsten vorkommende Carrier. Er katalysiert den Austausch von ADP und ATP und ist dadurch direkt an der Energieversorgung der Zelle beteiligt. Der Phosphatcarrier (PiC) katalysiert den Import des für die Phosphorylierungsreaktion benötigten Phosphats. Der Aspartat/Glutamat-Carrier (AGC) ist zusammen mit dem Ketoglutarat-Carrier (OGC) Bestandteil des sogenannten Aspartat/Malat-Shuttles (Harold, 1986), durch den der Import von Reduktionsäquivalenten realisiert wird. Neben diesen vier für die Funktion der Mitochondrien absolut essentiellen Carriern, die in allen Gewebetypen exprimiert werden, gibt es einige Carrier, die nur in bestimmten Geweben exprimiert werden, wie z. B. den Ornithincarrier (ORC), der hauptsächlich in Leber und Niere exprimiert wird (Krämer und Palmieri, 1992). Darüberhinaus gibt es teilweise eine gewebespezifische Expression bestimmter Isoformen von mitochondrialen Carriern als Anpassung an spezielle energetische Bedürfnisse, wie z. B. beim Phosphatcarrier (Dolce *et al.*, 1996).

Man kennt mittlerweile die Sequenzen von über 140 putativen mitochondrialen Carriern aus verschiedenen Organismen, von denen aber nur 15 in intakten Mitochondrien und z. T. in rekonstituierten Systemen untersucht worden sind. Allein durch die Sequenzierung des Hefegenoms konnten 35 Gene als putative mitochondriale Carrier identifiziert werden, sieben davon mit bereits bekannter Funktion, welche alle der mitochondrialen Carrierfamilie (MCF) zugeordnet werden können (Kaplan *et al.*, 1996; El Moualij *et al.*, 1997). Diese sind u. a. in Tabelle 1.1 aufgelistet. Aufgrund theoretischer Betrachtungen muß es außerdem noch weitere Carrier für den Import von Cofaktoren und Substraten des mitochondrialen Stoffwechsels geben, die nicht in den Mitochondrien synthetisiert werden. Diese Forderung wird durch die oben erwähnte hohe Zahl an putativen Carriern im Hefegenom unterstützt. Erste Untersuchungen an Transportsystemen für Thiaminpyrophosphat und Coenzym A (Tahiliani *et al.*, 1992; Prohl *et al.*, 2001) wurden schon vor der Sequenzierung des Hefegenoms durchgeführt.

1.2 Die Strukturfamilie der mitochondrialen Carrier

Eine Zuordnung zur mitochondrialen Carrierfamilie erfolgt sowohl unter strukturellen als auch funktionellen Gesichtspunkten. Die strukturellen Informationen

Tabelle 1.1: Übersicht über die bekannten Carrier der mitochondrialen Carrierfamilie. Die angegebenen Literaturzitate stellen jeweils nur eine Auswahl der verfügbaren Literatur dar.

Carrier	Substrate	Efflux-induktion	Primärstruktur	heterologe Überexpression	Literatur
ADP/ATP (AAC)	ADP, ATP	+	+	+	Aquila <i>et al.</i> , 1982 Klingenberg, 1990; 1992
Phosphat (PiC)	Phosphat ¹⁾	+	+	+	Aquila <i>et al.</i> , 1987 Runswick <i>et al.</i> , 1987 Stappen und Krämer, 1993
Aspartat-Glutamat- (AGC)	Glutamat, Aspartat	+	-	+	Dierks <i>et al.</i> , 1990a/b Stappen <i>et al.</i> , 1992 Herick und Krämer, 1995
Oxoglutarat-Malat- (OGC)	Ketoglutarat, Malat	+	+	+	Runswick <i>et al.</i> , 1990 Fiermonte <i>et al.</i> , 1993
Pyruvat- (PYC)	Pyruvat ¹⁾	-	-	+	Bolli <i>et al.</i> , 1989
Dicarboxylat- (DIC)	Malat, Phosphat	-	+	+	Kaplan und Pedersen, 1985 Palmieri <i>et al.</i> , 1997
Citrat- (CIC)	Citrat, Malat	+	+	+	Kaplan <i>et al.</i> , 1993 Xu <i>et al.</i> , 1995
Carnitin- (CAC)	Acylcarnitin, Carnitin	+	+	-	Indiveri <i>et al.</i> , 1992a/b Indiveri <i>et al.</i> , 1997a
Ornithin- (ORC)	Ornithin, Citrullin	-	-	-	Indiveri <i>et al.</i> , 1992a Indiveri <i>et al.</i> , 1997b
Succinat-Fumarat-	Succinat, Fumarat	-	+	-	Palmieri <i>et al.</i> , 1997
Oxodicarboxylat- (ODC)	2-Oxoglutarat, 2-Oxoadipat	-	+	+	Palmieri <i>et al.</i> , 2001
Oxalacetat- (OXC)	Oxalacetat Sulfat	-	+	+	Palmieri <i>et al.</i> , 1999
Glutamin- ²⁾ (GLC)	Glutamin ¹⁾	-	-	-	Indiveri <i>et al.</i> , 1998
Uncoupling Protein ²⁾ (UCP)	Protonen	+	+	+	Lin <i>et al.</i> , 1980 Klingenberg, 1990
Flx1p (FAD)	FAD	+	+	-	Tzagoloff <i>et al.</i> , 1996

¹⁾ der Transport findet im Antiport mit einem Hydroxylion oder im Symport mit einem Proton statt.

²⁾ es ist unklar, ob dieser Carrier tatsächlich zur MCF gehört.

KAPITEL 1. EINLEITUNG

beschränken sich aufgrund fehlender 3D-Strukturdaten auf aus Hydropathieplots abgeleitete putative Sekundärstrukturen. So weisen mitochondriale Carrier ein gemeinsames Motiv von 6 transmembranen Helices auf, welche alternierend hydrophobe und amphiphatische Eigenschaften besitzen (Aquila *et al.*, 1987; Walker, 1992; Palmieri *et al.*, 1993) und durch hydrophile *Loops* miteinander verbunden sind (Abb. 1.1). Die sechs Helices bilden jeweils paarweise eine tripartite Struktur von drei Abschnitten mit je ca. 100 Aminosäuren. Mit Hilfe von *diagon-plots* konnte gezeigt werden, daß die drei Abschnitte untereinander eine relativ hohe Ähnlichkeit aufweisen (Saraste und Walker, 1982). Eine evolutionäre Erklärung für die Struktur der mitochondrialen Carrier geht von der Existenz eines gemeinsamen Urgens aus, welches für 2 transmembrane Bereiche kodierte (Klingenberg, 1989; 1990). Es wird eine zeitgleiche Trimerisierung des Gens mit dem Auftreten der ersten Eukaryonten vor 1,5 Milliarden Jahren vermutet (Kuan und Saier, 1993).

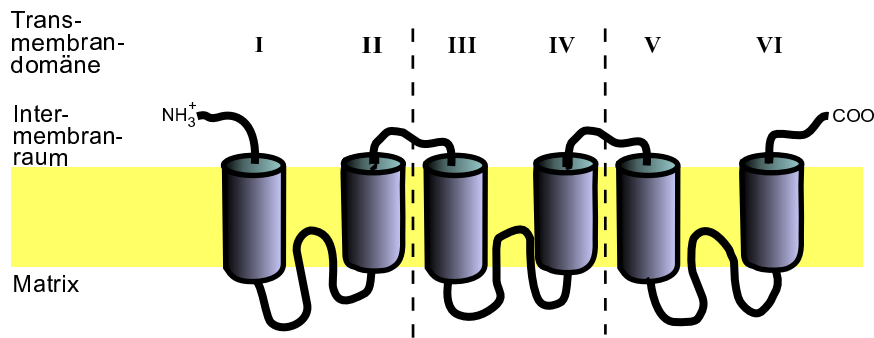


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der aus Hydropathieplots abgeleiteten Sekundärstruktur des mitochondrialen Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae* (PiC_{SC}).

Neben diesen strukturellen Betrachtungen können die mitochondrialen Carrier auch aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften in die MCF eingeordnet werden. Dazu gehören Gemeinsamkeiten bezüglich der Transportmechanismen, aber auch Ähnlichkeiten im Verhalten gegenüber Inhibitoren, Detergentien und den zur Aufreinigung verwendeten Adsorbentien (Krämer und Palmieri, 1992).

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, daß mitochondriale Carrier nicht in ihrer monomeren Form, sondern als Dimer aktiv sind. Einer der ersten überzeugenden Hinweise auf eine Dimerisierung wurde beim ADP/ATP-Carrier gefunden: die beobachtete Bindungsstöchiometrie von einem Molekül Carboxyatractylat, einem hochspezifischen Inhibitor, zu zwei Untereinheiten des Nukleotidcarriers (Riccio *et al.*, 1975). Desweiteren konnte durch Crosslinking und analytische Ultrazentrifugation (Hackenberg und Klingenberg, 1980; Lin *et al.*, 1980) gezeigt werden, daß

die Carrier nach Solubilisierung mit Hilfe von nichtionischen Detergentien in einer dimeren Form vorliegen. Ebenfalls konnte beim Nukleotidcarrier die Möglichkeit der Bildung einer intermolekularen Disulfidbrücke nachgewiesen werden (Majima *et al.*, 1995).

Durch Untersuchungen an intakten Rinderherzmitochondrien zeigte sich, daß weniger als ein Molekül des irreversiblen Inhibitors N-Ethyl-Maleimid (NEM) pro Monomer PiC nötig ist, um den Phosphattransport zu hemmen (Wohlrab, 1986). Analysen des mitochondrialen Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae* (PiC_{SC}) im rekonstituierten System haben gezeigt, daß vermutlich die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen an Position 28 zweier Monomere den Phosphattransport inhibieren kann (Wohlrab *et al.*, 1984).

Neben diesen experimentellen Befunden gibt es einen generellen Konsens bezüglich der Minimalausstattung eines sekundären Carrierproteins (Henderson, 1990; Maloney, 1990; Marger und Saier, 1993). Dieser besagt, daß etwa 12 (± 2) transmembrane Helices nötig sind, um Transport bzw. Kopplung zu bewerkstelligen. Dieser Konsens wird durch theoretische Überlegungen unterstützt, die speziell für mitochondriale Carrier ein Homodimer als funktionelle Einheit fordern (Klingenberg, 1981). Für bakterielle sekundäre Transportsysteme, die in der Regel etwa 12 (10 bis 14) transmembrane Helices aufweisen, konnte hingegen gezeigt werden, daß diese in der monomeren Form aktiv sind (Sahin-Toth *et al.*, 1994). Andere Transporter aus höheren Eukaryonten, z. B. die Zucker-Uniporter (GLUT-Familie) und die Na⁺-gekoppelten Symporter (SGLT-Familie), sind sowohl als Mono- als auch als Oligomere aktiv. Die Interaktionen der Monomere wurden hier als regulatorisches Phänomen gedeutet (Herbert und Carruthers, 1991; Bell *et al.*, 1993; Zotolla *et al.*, 1995).

1.3 Der mitochondriale Phosphatcarrier

Die Primärstruktur des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien wurde sowohl durch Proteinsequenzierung (Aquila *et al.*, 1982) als auch durch DNA-Sequenzierung (Runswick *et al.*, 1987) aufgeklärt. Sie zeigt die typische tripartite Struktur mit sechs Transmembranhelices (s. Abb. 1.1) der mitochondrialen Carrierfamilie (Aquila *et al.*, 1985; Kuan und Saier, 1993). Sowohl N- als auch C-Terminus liegen auf der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran (Capobianco *et al.*, 1991). Ein Vergleich der Primärstruktur vom mitochondrialen Phosphatcarrier mit

KAPITEL 1. EINLEITUNG

7 weiteren Primärstrukturen von Mitgliedern der mitochondrialen Carrierfamilie zeigte, daß in allen Sequenzen 11 Aminosäurereste völlig konserviert sind (Walker, 1992). Herauszustellen sind dabei vor allem die drei Proline am Ende der Helices 1, 3 und 5, die drei Glycine am Anfang der Helices 2, 4 und 6 sowie der saure Aminosäurerest, der sich jeweils zwei Aminosäurereste hinter den angesprochenen Prolinen befindet. Im Gegensatz zu den transmembranen Bereichen sind die Aminosäuresequenzen der *Loops* relativ variabel. Man vermutet hier wichtige Bereiche für das *gating* und die Substraterkennung (Walker 1992; Kuan und Saier 1993). Im Phosphatcarrier wurde außerdem ein sich wiederholendes Strukturmotiv innerhalb der ersten und dritten Helix gefunden (Phelps *et al.*, 1991): X-Pro-X-(Asp/Glu)-X-X-(Lys/Arg)-X-(Arg/Lys)-X. In der fünften Helix fehlt dieses Strukturmotiv. Die interne Ähnlichkeit des dritten Teils der tripartiten Struktur ist insgesamt geringer als die der ersten beiden Bereiche. Darüber hinaus besitzt der mitochondriale Phosphatcarrier einen hohen Anteil polarer Aminosäuren (39 %) und unter physiologischen Bedingungen eine hohe Anzahl (ca. 10) positiver Ladungen.

1.4 Kinetische Eigenschaften des mitochondrialen Phosphatcarriers

Modelle für die Transportkatalyse von mitochondrialen Carriern sind ausschließlich aufgrund energetischer und kinetischer Untersuchungen erstellt worden, da bis heute keine dreidimensionale Struktur für sekundäre Transportproteine bekannt ist. Für die Carrier wird ein sogenannter *single binding center gated pore mechanism* diskutiert (Klingenberg, 1992), bei dem ein Kanal mit einem Bindungszentrum existiert, dessen Zugänglichkeit durch *gates* geregelt wird. Die typischen Eigenschaften eines Carriers werden dadurch vermittelt, daß das Bindungszentrum des Translokators zu einem bestimmten Zeitpunkt immer nur von einer Membranseite her zugänglich ist.

Für eine Reihe mitochondrialer Carrier konnte der Reaktionsmechanismus mit Hilfe von kinetischen Bisubstratanalysen bestimmt werden. Interessanterweise erfolgt bei nahezu allen bisher untersuchten mitochondrialen Carrierproteinen die Translokation der Substrate entsprechend eines simultanen (sequentiellen) Transportmechanismus. Dabei binden 2 Substratmoleküle in zufälliger Reihenfolge an den Carrier (Bildung des ternären Komplexes) und leiten so den eigentlichen Translokationsvorgang ein (Stappen und Krämer, 1993). Charakteristisch für diesen Trans-

portmechanismus ist die Existenz von 2 katalytischen Bindungsstellen im Carrierprotein (vgl. Abb. 1.2). Gesichert ist dieser Mechanismus für die nachfolgenden Carrier: den Aspartat/Glutamat-Carrier (Dierks *et al.*, 1988; Sluse *et al.*, 1991), den Oxoglutarat/Malat-Carrier (Indiveri *et al.*, 1991b; Sluse *et al.*, 1972), den Dicarboxylatcarrier (Indiveri *et al.*, 1993), den Citratcarrier (Bisaccia *et al.*, 1993) und den Phosphatcarrier (Stappen und Krämer, 1994). Eine Ausnahme bildet der Carnitincarrier, für den ein ping-pong-Mechanismus angenommen wird (Indiveri *et al.*, 1991a; Indiveri *et al.*, 1991c). Neuere Analysen am Nukleotidcarrier, die mit Hilfe der *black lipid membrane*-Technik mit einer sehr hohen Zeitauflösung durchgeführt wurden, deuten darauf hin, daß dieser Carrier sein Substrat ebenfalls nach dem ping-pong-Mechanismus über die Membran transportiert (Gropp *et al.*, 1999).

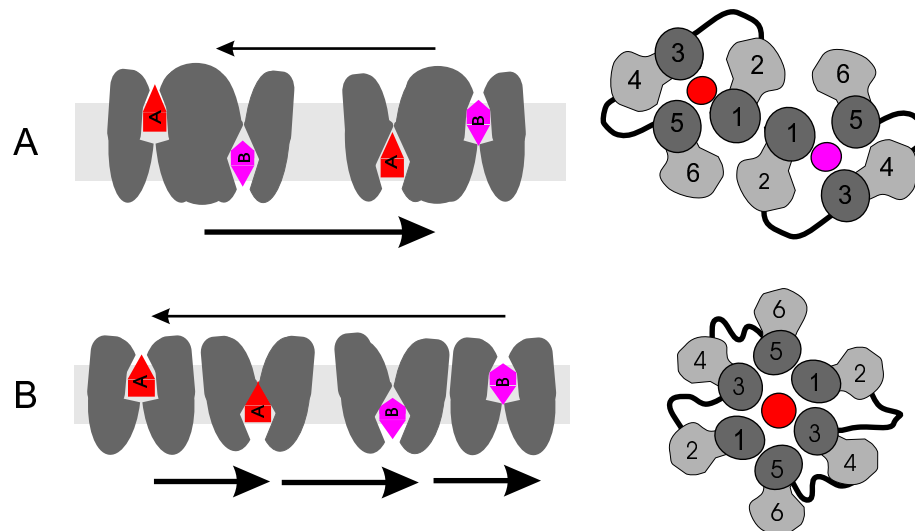


Abbildung 1.2: **A:** Darstellung des simultanen Mechanismus. Die Substrate A und B binden an den Carrier und bilden den ternären Komplex als katalytisch-aktive Komponente aus. Erst nach Bindung beider Substrate kommt es zur Translokation (unterer Pfeil) und die Substrate werden auf der jeweilig gegenüberliegenden Seite wieder freigesetzt. Die Substrate können nun wieder binden und der Zyklus kann wieder von vorne beginnen (oberer Pfeil). Charakteristisch für diesen Transportmechanismus ist die Existenz von 2 getrennten Bindungsstellen. Eine mögliche Anordnung der beiden Monomere im aktiven Dimer ist in dem rechten Teil der Abbildung dargestellt. Die beiden Translokationswege sind farblich hervorgehoben. **B:** Darstellung des ping-pong-Mechanismus: Substrat A bindet an den Carrier und wird auf die gegenüberliegende Seite transportiert (Pfeil 1 unten). Dort wird das Substrat freigesetzt und Substrat B kann an den Carrier binden (Pfeil 2 unten). Nach der Translokation (Pfeil 3 unten) wird das Substrat auf der gegenüberliegenden Seite wieder freigesetzt, und Substrat A kann wieder binden (Pfeil oben). Eine mögliche Anordnung der Monomere mit nur einem Translokationsweg (rot) im aktiven Dimer ist in dem rechten Teil der Abbildung dargestellt.

KAPITEL 1. EINLEITUNG

Der Phosphatcarrier ist für die Aufnahme von Phosphat für die ATP-Bildung in Mitochondrien verantwortlich. Die Triebkraft dieses Transports besteht aus dem elektrochemischen Protonenpotential über die innere Mitochondrienmembran. Der gekoppelte Transport eines Protons und eines Phosphatanions, der meist als P_i^-/H^+ -Symport beschrieben wird, ist elektroneutral. Er ist somit nur von den beiden Substratgradienten, aber nicht vom Membranpotential abhängig. Darüber hinaus katalysiert der mitochondriale Phosphatcarrier auch den homologen Austausch von Phosphat. Diese Eigenschaft, das eigene Substrat homolog auszutauschen, ist nahezu allen sekundären Carriern gemein.

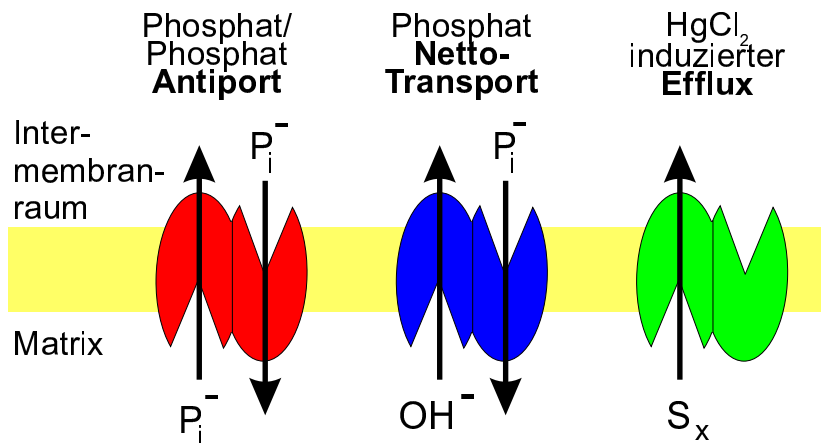


Abbildung 1.3: Transportmodi des mitochondrialen Phosphatcarriers. Dargestellt sind die beiden physiologischen Transportmodi, der P_i^-/P_i^- -Antiport, der P_i^-/OH^- -Nettotransport sowie der durch $HgCl_2$ induzierte Effluxmodus.

Als dritter Transportmodus ist der Efflux bekannt. Dieser wird durch Reaktion des Phosphatcarriers mit Quecksilber(II)chlorid induziert (Stappen und Krämer, 1993; Stappen, 1994). Im Effluxmodus ist der Phosphatcarrier in der Lage, ein breites Spektrum von unphysiologischen Substraten, wie z. B. Sulfat, Chlorid, Ketoglutarat o. ä., zu transportieren. Es gibt Hinweise darauf, daß auch nach der Induktion des Efflux weiterhin einige, für carriervermittelten Transport typische Eigenschaften erhalten bleiben. Zu diesen gehört die spezifische Inhibition des Uniports durch extern zugesetztes Substrat (Transinhibition). Hieraus kann geschlossen werden, daß die Spezifität der externen Bindungsstelle trotz Uniportinduktion erhalten bleibt. Außerdem wurde durch Experimente am AGC festgestellt, daß die Aktivierungsenergie des Antiports und des Uniports identisch ist (Herick und Krämer, 1995). Diese ambivalenten Eigenschaften geben Anlaß zu Spekulationen über einen bei Carrierproteinen vorhandenen intrinsischen Kanal, dessen Zugänglichkeit

durch *gates* reguliert wird. Durch die Modifikation von bestimmten Cysteinresten wird die Funktionsweise der *gates* dahingehend verändert, daß die strikte Kopplung zwischen Bindung der Substrate und dem Öffnen der *gates* nicht mehr gegeben ist. Die Bedeutung dieses Transportmodus *in vivo* ist noch ungeklärt.

1.5 Strukturelle Untersuchungen mit Hilfe von Methanthiosulfonat-(MTS)- Reagentien

Da bis heute noch keine dreidimensionalen Strukturen von sekundären Transportern bekannt sind, müssen die Untersuchungen zur Struktur solcher Proteine auf indirektem Weg erfolgen. Seit den 60er Jahren wird die Untersuchung der Topologie von Membranproteinen mit Hilfe von chemischen Modifizierungen der Proteine durchgeführt. Am besten lassen sich die Sulfhydrylgruppen von Cysteinresten modifizieren, da sie die höchste Reaktivität der Aminosäureseitenketten unter physiologischen Bedingungen aufweisen. Sie können leicht alkyliert, acryliert, aryliert und oxidiert werden und bilden mit vielen Schwermetallionen stabile Komplexe (Kenyon und Bruice, 1977; Bruice und Kenyon, 1982; Holmgren *et al.*, 1996). Diese traditionellen Reagentien umfassen Maleimide, Iodoacetate und organische Quecksilberverbindungen. Diese sind in der Regel sehr reaktionsträge, benötigen daher lange Inkubationszeiten und müssen in einem großen Überschuß eingesetzt werden (Kenyon und Bruice, 1977). Reagentien, die zur Zeit vor allem für Zugänglichkeitsstudien benutzt werden, sind die Methanthiosulfonat-(MTS)-Reagentien. Diese sind selbst unter milden Bedingungen reaktiv und müssen daher nicht in einem großen Überschuß eingesetzt werden. Weiterhin zeigen sie eine hohe Spezifität bezüglich Sulfhydrylgruppen. Karlin und seine Kollegen benutzten für Struktur-/Funktionskorrelationen an Kanalproteinen 3 MTS-Reagentien (MTSEA: 2-Aminoethyl-Methanthiosulfonat; MTSES: Natrium (2-Sulfonatethyl)-Methanthiosulfonat; MTSET: [2-(Trimethylammonium)-Ethyl]-Methanthiosulfonat) (Akabas *et al.*, 1992; Stauffer und Karlin, 1994). Diese Reagentien sind in Abb. 1.4 dargestellt. Die drei MTS-Reagentien unterscheiden sich in der Größe und der Ladung der zusätzlichen Kopfgruppe. Die Membranpermeabilität dieser MTS-Reagentien hängt von ihrer Ladung und ihrem Verteilungskoeffizienten in Wasser und unpolaren Lösungsmitteln ab. Für MTSEA konnte gezeigt werden, daß es membranpermeabel ist (Holmgren *et al.*, 1996). Die Protonierung von MTSEA wird sowohl durch den pH-Wert des Mediums als auch den pK_a -Wert des Amins bestimmt. Dieser scheint größer oder gleich 8,5 zu sein

KAPITEL 1. EINLEITUNG

(Karlin, unveröffentlicht). Somit liegt MTSEA unter physiologischen Bedingungen in der deprotonierten Form vor, die für die rasche Diffusion durch die Lipiddoppelschicht verantwortlich ist. Die protonierte, positiv geladene Form von MTSEA ist wie das permanent positiv geladene, hydrophile MTSET membranimpermeabel. MTSES ist bei neutralem pH vollständig deprotoniert, damit negativ geladen und stark hydrophil (Karlin und Akabas, 1998). MTSET und MTSES können daher nur Aminosäurereste erreichen, die von der Zugabeseite aus zugänglich sind und an der wasserzugänglichen Oberfläche des Proteins liegen. Mit Hilfe der MTS-Reagentien können so aufgrund ihrer unterschiedlichen Membrangängigkeit Reste identifiziert werden, die den Translokationsweg auskleiden.

Durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden, wie die Klonierung und ortsgerichtete Mutagenese, ergeben sich weitere Möglichkeiten zur chemischen Modifizierung. Zur Untersuchung der Topologie von Membranproteinen mit Hilfe von chemischen Modifizierungen wird von einem cysteinfreien Protein ausgegangen. An verschiedenen Positionen im Protein werden dann Cysteine durch ortsgerichtete Mutagenese eingebracht und die Aktivität des Proteins unter Zugabe verschiedener Reagentien untersucht. Bisher wurden mit den MTS-Reagentien viele Kanäle strukturell näher charakterisiert. Dazu gehören u. a. der muskuläre und neuronale Acetylcholinrezeptor (Akabas *et al.*, 1992, 1994a, 1995; Ramirez-Latorre *et al.*, 1996), der GABA-Rezeptor (Xu und Akabas, 1993, 1996) und der NMDA-Glutamat-Rezeptor (Kuner *et al.*, 1996). Diese Technik wurde ebenfalls bei dem CFTR (Akabas *et al.*, 1994b) und bei spannungsabhängigen Kalium- (Pascual *et al.*, 1995; Kürz *et al.*, 1995) und Natriumkanälen (Yang *et al.*, 1996) angewandt.

Neben den Untersuchungen an Kanälen wurden jetzt auch erste Zugänglichkeitsstudien am mitochondrialen Citratcarrier, einem Mitglied der mitochondrialen Carrierfamilie, durchgeführt. Die Gruppe um R. S. Kaplan führte ortsgerichtete Mutagenesen auf der Basis des cysteinfreien Proteins durch und mutierte jede Aminosäure in der vierten Transmembrandomäne zu Cystein (Kaplan *et al.*, 2000). Bei anschließenden Zugänglichkeitsstudien wurde angenommen, daß die MTS-Reagentien nur mit den Aminosäureresten schnell reagieren, die an der wasserzugänglichen Oberfläche des Proteins lokalisiert sind. Es konnte eine Beeinträchtigung der Transportaktivität durch die kovalente Bindung der Reagentien an einen exponierten Cysteinrest nachgewiesen werden. Über die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten der Inhibition der Proteine durch die Bindung eines MTS-Derivates an den Cysteinrest wurde bestimmt, ob dieser Rest zum Translokationsweg oder zur Lipiddoppelschicht weist. Ungefähr die Hälfte der untersuchten Reste war zur wasserzugänglichen Seite

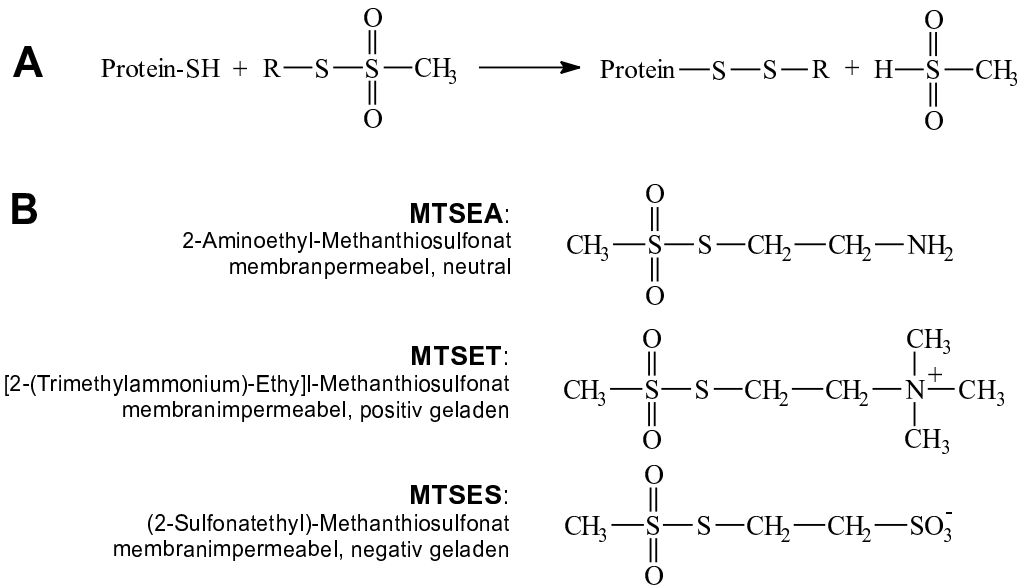


Abbildung 1.4: **A:** Allgemeines Reaktionsschema der MTS-Reagentien mit der Thiolgruppe eines Cysteinrestes; R=Kopfgruppe. **B:** Eigenschaften und Strukturformel der drei MTS-Reagentien MTSEA, MTSET und MTSES.

des Proteins orientiert, während der übrige Teil der Reste zur wasserunzugänglichen Seite orientiert war. Dieses Ergebnis legte nahe, daß die wasserzugänglichen Reste zu dem Substrattranslokationsweg hin orientiert sind, während die übrigen Reste zur Lipidschicht zeigen. Gestützt wird diese Vermutung dadurch, daß das Substrat Citrat und die MTS-Reagentien ungefähr die gleiche Größe aufweisen.

1.6 Zielsetzung

Der mitochondriale Phosphatcarrier ist ein typisches Mitglied der mitochondrialen Carrierfamilie (MCF) und ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Das 32 kDa Protein ist als Dimer aktiv und für die Phosphataufnahme in Mitochondrien verantwortlich. Daten über seine dreidimensionale Struktur existieren bislang nicht. Zur näheren Untersuchung der Struktur muß daher auf molekularbiologische, biochemische und biophysikalische Methoden zurückgegriffen werden. Mit Hilfe von Mutagenesestudien, bei denen sämtliche geladenen Aminosäuren untersucht wurden, konnte gezeigt werden, daß nur 5 essentiell für den Phosphattransport sind (Phelps *et al.*, 1996). Diese 5 Aminosäurereste liegen in der ersten und dritten Transmembranhelix. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die beiden Cysteine an den Positionen 28 im aktiven Dimer über eine Crosslink-Reaktion miteinander

KAPITEL 1. EINLEITUNG

verbunden werden können (Phelps und Wohlrab, 1993). Diese Experimente ließen den Schluß zu, daß ein putativer Translokationsweg von den Helices 1 und 3 beider Monomere im aktiven Dimer ausgebildet wird. Zur näheren Charakterisierung dieses Transportweges soll die Zugänglichkeit von verschiedenen Aminosäureresten mit MTS-Reagentien untersucht werden. Dazu sollen auf Basis eines rekombinanten cysteinfreien Proteins, bei dem alle Cysteine gegen Serin ausgetauscht sind, einzelne Cysteinreste an bestimmten Positionen im Protein (A25C, S28C, H23C, S34C, M35C, D39C, T43C, E126C, D130C, S134C und S300C) wieder eingeführt werden. Ein Teil dieser Positionen zeigt zum putativen Translokationsweg, während der Rest vom Translokationsweg weg zeigen. Zur Charakterisierung der Transportaktivität sollten die konstruierten rekombinanten Proteine in Liposomen funktionell rekonstituiert und anschließend vermessen werden. Dazu mußte jedoch zunächst das Rekonstitutionssystem optimiert werden, da zu Beginn der Arbeit die beobachtete Transportaktivität um etwa drei Größenordnungen unter der Aktivität des Phosphatcarriers aus Rinderherzen (Stappen und Krämer, 1993) als auch unter der beobachteten Aktivität des Proteins aus *S. cerevisiae* (Wohlrab und Briggs, 1994) lag. Desweiteren mußte ein System etabliert werden, mit dem die Zugänglichkeit dieser Cysteinreste nachgewiesen werden kann. Der Nachweis der Bindung der MTS-Reagentien an die Cysteine sollte mit Hilfe des ebenfalls thioispezifischen Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein-5-Maleimid erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

1. **Radioaktive Substanzen:** [^{33}P] Phosphat (Amersham Pharmacia, Freiburg oder Hartmann Analytic, Braunschweig)
2. **Modifizierungsreagentien und Inhibitoren:** N-Ethyl-Maleimid (Sigma, Deisenhofen); Mersalylsäure (Roth, Karlsruhe); Pyridoxal-5'-phosphat (Fluka, Neu-Ulm); MTSEA (TRC, Toronto, Canada); MTSES (TRC, Toronto, Canada); MTSET (TRC, Toronto, Canada); Fluorescein-5-Maleimid (Molecular Probes, Niederlande)
3. **Detergentien:** N-Lauroylsarcosinat, Na-Salz (Sigma, Deisenhofen); Triton X-114 (Sigma, Deisenhofen); SDS (Roth, Karlsruhe), EDTA (Merck, Darmstadt); Octylglucopyranosid (Fluka, Neu-Ulm)
4. **Lipide:** Phosphatidylcholin aus Truthahneigelb XII-E (Sigma, Deisenhofen); Cardiolipin, Na-Salz (Sigma, Deisenhofen); Na-Phosphatidat (Sigma, Deisenhofen); Phosphatidylethanolamin aus der Sojabohne (AVANTI Polar Lipids, USA); Phosphatidylcholin aus der Sojabohne (Sigma, Deisenhofen); *E. coli* Lipide Gesamtextrakt (AVANTI Polar Lipids, USA)
5. **Ionenaustauscher und Chromatographiematerialien:** DOWEX 2x8 (Sigma, Deisenhofen); Sephadex G75 (Amersham Pharmacia, Freiburg), Bio-Beads SM-2 (BioRad, München)
6. **Verwendete Medien:** 2xYT-Medium: 16 g/l Trypton; 10 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; LB-Medium: 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; TB-Puffer: 10 mM PIPES (pH 6,7); 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl; 55 mM MnCl₂; TSS-Puffer: 10 % PEG (M=8000), 10 % DMSO; 20 mM MgSO₄ in 2-fach LB-Medium; SOB-Medium: 2,5 mM KCl; 10 mM NaCl; 10 mM MgSO₄; 10 mM MgCl₂; 2 % Bacto Trypton; 0,5 % Hefeextrakt.

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

7. **Puffer:** HEPES (Roth, Karlsruhe); Imidazol (Merck, Darmstadt); Tris (AppliChem, Darmstadt);
8. **Sonstige Chemikalien:** Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Roth, Karlsruhe); DTT (Biomol, Hamburg); β -Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen); Rinderserumalbumin Fraktion V (Roche, Mannheim); Carbenicillin (Hybaid-AGS, USA); Proteinstandard (low range; BioRad, München). Nicht aufgeführte Chemikalien waren von p. a. Qualität und wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.2 Verwendete Stämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli*-Stämme sowie deren Eigenschaften sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Verwendete *E. coli*-Stämme und ihre Eigenschaften

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Verwendung, Referenz
DH5 α (mcr)	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 mcr⁻</i></i>	Klonierungen, Grant <i>et al.</i> , 1990
BL21(DE3)	<i>hsdS gal (λcIts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene 1</i>)</i>	Expression, Studier und Moffatt, 1986

2.3 Molekularbiologische Arbeiten

2.3.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen für *E. coli*

Für die Kultivierung und Plasmidisolierung wurde LB-Vollmedium (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet, für die Expression von *PiC* wurden die Zellen in 2xYT-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) kultiviert. Für die Herstellung von Agarplatten wurde LB-Medium mit 16 g/l Agar autoklaviert. Die Bestimmung des Zellwachstums erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀). Dabei enthält eine Bakterienkultur mit einer OD₆₀₀ von 1 etwa 10⁹ Zellen pro ml (Miller, 1992). Für alle Klonierungsschritte wurde ausschließlich der Stamm DH5 α (mcr) eingesetzt. Für die Mutagenese wurde das für den Phosphatcarrier kodierende Gen in pUC18 kloniert. Die Expression der Konstrukte (pNYHM131-Derivate) erfolgte ausschließlich in dem Stamm BL21(DE3).

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide mit ihren Markern und Eigenschaften

Plasmide	Eigenschaften	Verwendung, Referenz
pUC18	bla	Klonierung, Norrander <i>et al.</i> , 1983
pUC18-SSS	pUC 18 mit 933 bp <i>NdeI/BamHI</i> <i>PiC</i> Insert	diese Arbeit
<p>pUC18-SSS-A25C</p> <p>pUC18-SSS-S28C</p> <p>pUC18-SSS-S30C</p> <p>pUC18-SSS-H32C</p> <p>pUC18-SSS-S34C</p> <p>pUC18-SSS-M35C</p> <p>pUC18-SSS-D39C</p> <p>pUC18-SSS-T43C</p> <p>pUC18-SSS-E126C</p> <p>pUC18-SSS-D130C</p> <p>pUC18-SSS-S134C</p> <p>pUC18-SSS-S300C</p>	<p>durch ortsgerichtete Mutagenese in pUC18-SSS hergestellte Vektoren mit einer Aminosäuresubstitution an angegebener Position</p>	diese Arbeit
pET-3a	Amp ^R , <i>pT7</i> , ColE1, 4,64kb	Expression, Rosenberg <i>et al.</i> , 1987
pNHYM131	pET-3a- mit <i>mir1</i>	Murakami <i>et al.</i> , 1993
<p>pNHYM131-SSS-A25C</p> <p>pNHYM131-SSS-S28C</p> <p>pNHYM131-SSS-S30C</p> <p>pNHYM131-SSS-H32C</p> <p>pNHYM131-SSS-S34C</p> <p>pNHYM131-SSS-M35C</p> <p>pNHYM131-SSS-D39C</p> <p>pNHYM131-SSS-T43C</p> <p>pNHYM131-SSS-E126C</p> <p>pNHYM131-SSS-D130C</p> <p>pNHYM131-SSS-S134C</p> <p>pNHYM131-SSS-S300C</p>	<p>durch Umklonierung eines <i>NdeI-BamHI</i>-Fragmentes aus dem entsprechenden pUC18-SSS-Vektor in den ebenfalls <i>NdeI-BamHI</i> geschnittenen Vektor pET-3a</p>	diese Arbeit

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

Bakterienstämme bzw. die mit den entsprechenden Plasmiden transformierten Stämme wurden als Glycerindauerkulturen gelagert. Dazu wurden frische Kulturen, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden, mit Glycerin (50 % Endkonzentration) versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte dann bei -80 °C oder kurzzeitig bei -20 °C.

Die Anzucht zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte in SOB-Medium (Hanahan, 1985). Nach der Transformation wurden die Zellen in das Regenerationsmedium SOC (SOB + 20 mM Glucose) (Hanahan, 1985) überführt.

2.3.2 Isolierung von DNA

Plasmid-DNA wurde aus Flüssigkulturen unter Verwendung des GFXTM Micro Plasmid Prep Kits (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Herstellerangaben isoliert. Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, wurde das QIAfilter Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet.

2.3.3 Modifikation von DNA

Die verschiedenen Techniken zur *in vitro* DNA-Rekombination wie Spaltung mit Restriktionsenzymen oder die Behandlung mit alkalischer Phosphatase wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Auftrennung von Plasmid-DNA-Fragmenten in 1 %igen Agarosegelen in TAE-Puffer (40 mM Tris·HAc, pH 8,0; 1 mM EDTA) durchgeführt. Die Elektrophorese wurde für ca. 90 Minuten bei 95 V durchgeführt. Die einzelnen DNA-Fragmente wurden dann auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht, ausgeschnitten und zur Ligation weiter gereinigt oder dokumentiert (Video-Geldokumentationsanlage ImageMaster, Amersham Pharmacia, Freiburg).

2.3.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus einem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des Supelco Kits, Sigma, nach Herstellerangabe.

2.3.6 Ligierung von Plasmid-DNA

Die Ligierung von Plasmid-DNA wurde mit einem Ready-To-Go Kits unter Verwendung von T4 DNA Ligase nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 100 ng Vektor und ein dreifacher Stoffmengenüberschuß an Insert eingesetzt.

2.3.7 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von DNA wurden in der Regel kompetente DH5 α (mcr) Zellen, die nach einer Vorschrift von Inoue *et al.* (1990) hergestellt worden waren, verwendet. Dabei wurden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 5-10 ng DNA wurden mit 100 μ l kompetenter Zellen auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 45 Sekunden auf 42 °C erhitzt, wieder auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 900 μ l LB-Medium 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln (120 rpm) inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf entsprechenden Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Transformation des Expressionsstammes BL21(DE3) wurde die Methode von Chung *et al.* (1989) angewendet. Die Zellen wurden hierbei bei einer OD₆₀₀ von 0,4 geerntet und in 1/10 des Ausgangsvolumens TSS-Puffer (LB-Medium, mit 10 % PEG 8000; 5 % DMSO, 50 mM MgSO₄) resuspendiert. Nach Zugabe der Plasmid-DNA wurden die Zellen 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 μ l LB-Medium wurden die Zellen 1 Stunde bei 37 °C bei 120 rpm geschüttelt und anschließend auf entsprechende Agarplatten ausplattiert.

2.3.8 Ortsgerichtete Mutagenese

Für alle Klonierungsschritte wurde das Plasmid pUC18 verwendet. Hierzu wurde das für den Phosphatcarrier kodierende Gen aus dem Expressionsvektor pNYHM131 in pUC18 umklont.

Durch ortsggerichtete Mutagenese wurden rekombinante Phosphatcarrier mit je einem Aminosäureaustausch konstruiert. Dies erfolgte in Anlehnung an das Quick-ChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg). Dazu wurde in einer PCR-ähnlichen Reaktion mit zwei komplementären Oligodesoxynukleotiden, die den gewünschten Basenaustausch trugen, die Mutation in die neusynthetisierten Stränge eingebaut. Bei der Reaktion wurde das gesamte Plasmid amplifiziert. Anschließend wurde die „template“-DNA durch einen Verdau des Ansatzes mit dem

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

Restriktionsenzym *DpnI*, das nur methylierte und hemimethylierte DNA als Substrat akzeptiert (Nelson und McClelland, 1992), abgebaut. Transformationskompetente *E. coli* DH5 α (mcr)-Zellen wurden nach dem Verdau mit der verbleibenden, mutierten DNA transformiert. In den Zellen wurden die unterbrochenen Stränge durch Ligase verknüpft.

Die in Tabelle 2.3 aufgeführten Oligodesoxynukleotide wurden zur ortsgerichteten Mutagenese eingesetzt.

Tabelle 2.3: Primer für die ortsgerichtete Mutagenese. Die Codons, die ausgetauscht wurden, sind fett dargestellt. (s: sense; as: antisense).

Mutation	sense	Sequenz (5'→3')	Verwendung
C28S	s	GGC GCC ATA GGG TCT GGG TCG ACT C	Konstruktion von SSS
	as	GAG TCG ACC CAG ACC CTA TGG CGC C	
C134S	s	GAC ATT GCC TTG TCT CCC CTA GAA GCC	Konstruktion von SSS
	as	GGC TTC TAG GGG AGA CAA GGC AAT GTC	
C300S	s	GCA CTT TGG GTT CTC CAC CAA CC	Konstruktion von SSS
	as	GGT TGG TGG AGA ACC CAA AGT GC	
A25C	s	CCT AGC CGG CTG TAT AGG GTC TGG G	Einführung der Mutation A25C
	as	CCC AGA CCC TAT ACA GCC GGC TAG G	
S30C	s	GGG TCT GGG TGT ACT CAC TCC	Einführung der Mutation S30C
	as	GGA GTG AGT ACA CCC AGA CCC	
H32C	s	GGG TCG ACT TGT TCC AGT ATG G	Einführung der Mutation H32C
	as	CCA TAC TGG AAC AAG TCG ACC C	
S34C	s	CGA CTC ACT CCT GTA TGG TCC CG	Einführung der Mutation S34C
	as	CGG GAC CAT ACA GGA GTG AGT CG	
M35C	s	CAC TCC AGT TGT GTC CCG ATC	Einführung der Mutation M35C
	as	CGA TCG GGA CAC AAC TGG AGT G	
D39C	s	GGT CCC GAT CGT TGT CGT TAA GAC G	Einführung der Mutation D39C
	as	CGT CTT AAC GAC ACA GAT CGG GAC C	
T43C	s	GAT GTC GTT AAG TGT AGA ATC CAA C	Einführung der Mutation T43C
	as	GTT GGA TTC TAC ACT TAA CGA CAT	
E126C	s	GCC ATG GCC TGT TTC TTG GC	Einführung der Mutation E126C
	as	GCC AAG AAA CAG GCC ATG GC	
D130C	s	CCG AAT TCT TGG CAT GTA TTG CCT TGG	Einführung der Mutation D130C
	as	CCA AGG CAA TAC ATG CCA AGA ATT CGG	

2.3.9 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung von Klonierungen und Mutationen wurden die jeweils konstruierten Plasmide sequenziert. Die Sequenzreaktion basiert auf der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) und wurde nach Zimmermann *et al.* (1990) modifiziert. Bei dieser Methode wird der Kettenabbruch von Didesoxynukleotiden

ausgelöst, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Reaktion entspricht einer abgewandelten PCR, in der eine modifizierte AmpliTaq DNA Polymerase eingesetzt wird. Die Sequenzierreaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (ABI PRISMTM Big Dye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit, PE Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Sequenzierprodukte wurden mit einer automatischen Sequenzierapparatur ABI PRISM 310 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) kapillarelektrophoretisch getrennt und detektiert.

Tabelle 2.4: Primer für die Sequenzierung (s: sense; as: antisense).

Oligonukleotid	sense	Sequenz (5'-3')	Verwendung
T7-Primer	s	ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG	Sequenzierung in pET-3a
T7-Terminator	as	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	Sequenzierung in pET-3a
PIC I	s	GGT GTC GGG GCT GGC	Sequenzierung in pUC18-SSS
PIC II	s	GCC TTC AAG TTC GGT GG	Sequenzierung in pUC18-SSS
PIC III	s	CGG ATT CGC CGG TCC	Sequenzierung in pUC18-SSS
-48rev	as	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA	Sequenzierung in pUC18-SSS

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Präparation des Phosphatcarriers aus *inclusion bodies*

Die Anzucht der *E. coli*-Zellen erfolgte nach einer Vorschrift von Wohlrab und Briggs (1994). Für die Expression von *PiC* wurde 2xYT-Medium (50 mg/l Carbenicillin) mit einer Vorkultur des Expressionsstamms angeimpft und unter starkem Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 herangezogen. Durch Zugabe von 1 mM IPTG und weiteren 25 mg/l Carbenicillin wurde die Expression induziert. Nach weiteren 3 h wurden die Zellen abzentrifugiert (15 Minuten, 4.000 x g, 4 °C), einmal mit TE-Puffer (10 mM Tris; 0,1 mM EDTA; pH 7) gewaschen und dann bei -20 °C gelagert. Die folgenden Schritte der Aufarbeitung wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen aus 250 ml Medium wurden in 10 ml TE-Puffer (10 mM Tris; 0,1 mM EDTA; pH 7) suspendiert, mit Hilfe einer *French press* (SLM Aminco, Rochester, USA; große Zelle, 16.000 psi) aufgeschlossen und 10 Minuten zentrifugiert (12.000 x g; 4 °C). Das Präzipitat wurde in 10 ml TE-Puffer homogenisiert und 2 Minuten zentrifugiert (1.100 x g; 4 °C). Der Überstand mit den *inclusion bodies* wurde aliquotiert und die *inclusion bodies* sedimentiert (12.000 x g; 5 Minuten; 4 °C). Das Protein wurde bei -20 °C gelagert.

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

2.4.2 Rekonstitution

2.4.2.1 Vorbereitung der Truthahnlipide

Die käuflich erworbenen Truthahnlipide von Sigma, Deisenhofen, wurden langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt. Die Lipide wurden dann in Puffer (50 mM HEPES) resuspendiert und auf eine Konzentration von 100 mg/ml eingestellt. Nachdem die Lipide fast vollständig resuspendiert waren, wurden die Lipide für 10 Minuten in einem Rosettengefäß bei einem *duty cycle* von 30 % und einer Beschallintensität von 3 beschallt. Anschließend wurden die Lipide aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.4.2.2 Vorbereitung der *E. coli* Lipide

Der *E. coli total lipid extract* (Avanti Polar Lipids Inc. USA) wurde bei -20 °C in Chloroform gelagert. Vor der Verwendung der Lipide wurde an einem Rotationsverdampfer das Chloroform entfernt. Anschließend wurden die Lipide für mindestens 10 Minuten an einem Lyophyllisator vollständig getrocknet. Die trockenen Lipide wurden dann in Puffer (50 mM HEPES, pH 6,8; 1,5 % Octylglucopyranosid) resuspendiert und auf eine Konzentration von 100 mg/ml eingestellt. Die Lipidsuspension wurde in Dialyseschläuche gefüllt und gegen 50 mM HEPES mit 1 mM β -Mercaptoethanol dialysiert. Der Dialysepuffer wurde viermal nach ca. 4-5 h gewechselt. Die erhaltenen, resuspendierten Lipide wurden dann aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.4.2.3 Rekonstitution nach Rigaud (Rigaud *et al.*, 1995)

2.4.2.3.1 Trübungsmessungen

Bei der Rekonstitution nach Rigaud wird das Protein in bereits zu 25 % solubilisierete Liposomen eingebaut. Zur Bestimmung der Detergenzmenge, die zur 25 %igen Solubilisierung der Liposomen benötigt wird, wurde eine Trübungsmessung durchgeführt. Hierzu wurden unterschiedliche Mengen einer zuvor für 4 Minuten beschallten Truthahnlipidsuspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und langsam wieder aufgetaut. Um Liposomen einheitlicher Größe zu erhalten, wurde die Lösung 15 mal durch einen 400 nm Polycarbonatfilter (Milsch Equipment, Laudenbach) extrudiert. Bei dem hierzu verwendeten Extruder handelte es sich um einen LiposoFastTM-Basic der Firma Avestin Inc., Ottawa, Kanada. Die optische Dichte dieser Liposomensuspension wurde im Photometer bei 600 nm bestimmt. Durch

sukzessiven Zusatz der Detergentien konnte die zunehmende Solubilisierung der Liposomen bis hin zur vollständigen *mixed micelles*-Bildung über die Abnahme der optischen Dichte bestimmt werden.

2.4.2.3.2 Rekonstitution

Eine 10 %ige Phosphatidylcholinsuspension aus Truthahneigelb (SIGMA, Deisenhofen) wurde für 5 Minuten in einem Eisbad bei einem *duty cycle* von 30 % und einer Beschallintensität von 3 beschallt (Branson Sonifier W-250, Branson Sonic Power Co., Danbury, USA). Zur Rekonstitution wurden bei einem Gesamtvolumen von 700 μ l 112 μ l beschallte Liposomen mit Puffer (30 mM KP_i , pH 6,8; 50 mM HEPES, pH 6,8; Endkonzentrationen) verdünnt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und langsam aufgetaut. Nach 15 maligem Extrudieren durch einen 400 nm Polycarbonatfilter wurde eine homogene Liposomensuspension hergestellt. Dieser Lösung wurden 70 μ l 10 % Triton X-114 (v/v) zugesetzt und der Ansatz für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Das solubilisierte Protein wurde 10 Minuten später zugegeben. Um das Detergenz wieder aus der Lösung zu entfernen, wurden BioBeads zugegeben. An diese Kügelchen adsorbieren die Detergentien und Proteoliposomen bilden sich aus. Durch zweimalige Zugabe der 5fachen Menge (w/w) an BioBeads (bezogen auf die eingesetzte Detergenzmenge) und jeweilige Inkubation für 1h bei Raumtemperatur und eine weitere Zugabe der 10fachen Menge an BioBeads und anschließender Inkubation ü.N. bei 4 °C konnte das Detergenz entfernt werden.

2.4.2.4 Rekonstitution nach Krämer und Heberger (1986)

Das hier beschriebene Verfahren beruht auf der Inkorporation der Carrierproteine in Liposomen durch kontinuierliche Abreicherung des Detergenz mittels Chromatographie auf kleinen Polystyrolkugeln. Dazu wurde zunächst der Phosphatcarrier aus den *inclusion bodies* in Solubilisierungspuffer (10 mM Tris; 0,1 mM EDTA; pH 7,0; 1,5 % SLS) gelöst. Die Lipide wurden aufgetaut und mit Hilfe eines Ultraschallgerätes 10 Minuten auf Eis beschallt (BransonTM Sonifier 250, Branson Power Co., Danbury, USA; 30-40 % *duty cycle*, *output*-Stufe 4). Für einen Rekonstitutionsansatz wurden zunächst nacheinander die Proteinlösung, die beschallten Lipide (Endkonzentration 16 mg/ml) und das nichtionische Detergenz Triton X-114 (Endkonzentration 1 %) gemischt und gründlich gevortext. Anschließend wurden Puffer (30 mM KP_i , pH 6,8; 50 mM HEPES, pH 6,8; Endkonzentrationen) hinzugefügt,

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

mit Wasser auf das Endvolumen ($700 \mu\text{l}$) aufgefüllt und erneut gevortext. Der Rekonstitutionsansatz sollte trüb und opaleszierend sein.

Nach ca. 30 minütiger Inkubation bei RT wurde der Reaktionsansatz fünfzehnmal über eine BioBeads-Säule ($600 \text{ mg BioBeads pro Säule}$) gegeben. Dabei formen sich die Proteoliposomen.

2.4.3 Transportmessungen

Die Optimierung der Methode zur Messung der Transportaktivität war Teil dieser Arbeit.

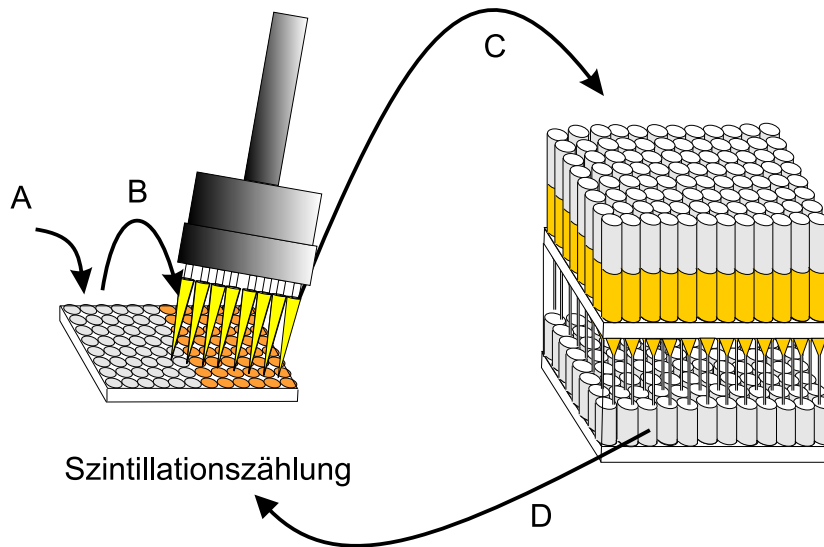


Abbildung 2.1: Schema der aktuellen Meßtechnik. Durch Zugabe der Startlösung (A) wird die Messung gestartet. Zu einem gewünschten Zeitpunkt wird die Reaktion durch Transfer mit Hilfe einer Achtkanal-Pipette in die Stopplösung (B) gestoppt und im direkten Anschluß auf die schon vorbereiteten DOWEX 2x8-Anionenaustauschsäulen gegeben (C). Nach Waschen mit $150 \text{ mM Saccharose}$ können die Auffanggefäße in die Szintillationsgefäße überführt und die Radioaktivität gezählt werden (D).

2.4.3.1 Transportmessung mit der Mehrfachfiltrationsanlage

Diese Meßmethodik wurde sowohl während der Optimierung der Meßmethode als auch bei der Messung der Proteoliposomen, die nach Rigaud rekonstituiert wurden, verwendet. Dabei wurden die Transportmessungen durch Gabe von radioaktiv markiertem Phosphat (ca. 500000 cpm) zu $350 \mu\text{l}$ Proteoliposomensuspension gestartet. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden $50 \mu\text{l}$ der Lösung entnommen, über einen

0,2 μm Cellulosemischesterfilter (Millipore, Eschborn) mit einer Mehrfachfiltrationsanlage (Hoefer, Pharmacia Biotech) abfiltriert und dreimal mit 2,5 ml HEPES (150 mM) gewaschen. Die Filter wurden entnommen, mit 3,8 ml Szintillationscocktail (Rotiszint ecoplus, Roth, Karlsruhe) versetzt und die auf dem Filter verbliebene Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Multi Purpose-Scintillations Counter LS 6500, Beckman Coulter, München) bestimmt.

2.4.3.2 Transportmessung mit Hilfe von Anionenaustauschern

Bei der Transportmessung mit Hilfe von Anionenaustauschern wurde die Reaktion durch Zugabe von radioaktiv markiertem ^{33}P -Phosphat gestartet. Durch Pyridoxal-5'-Phosphat wurde nach Ablauf der Meßzeit das Protein inhibiert. Das nicht aufgenommene Substrat wurde über Anionenaustauschsäulen abgetrennt und die in die Liposomen aufgenommene Menge an radioaktiv markiertem Phosphat mit Hilfe eines Szintillationszählers (Multi Purpose-Scintillations Counter LS 6500, Beckman Coulter, München) bestimmt. Im folgenden soll hier auf nur die Messungen mit dem optimierten System unter Verwendung von Mehrkanalpipetten eingegangen werden (Deuber, 2000). In Abbildung 2.1 ist der Ablauf der Messung dargestellt.

2.4.3.3 Präparation der Anionenaustauschsäulen

Vor den eigentlichen radioaktiven Messungen mußten die Anionenaustauschsäulen vorbereitet werden. Diese bestehen aus ca. 1 ml DOWEX 2x8 in mit Glaswolle abgedichteten Pasteurpipetten. Vor Benutzung der Anionenaustauschsäulen werden diese von der Chloridform in die Acetatform überführt. Dazu wurden die Säulen nacheinander mit 3 Volumenäquivalenten 1 M Natronlauge, 1 Volumenäquivalent Wasser, 3 Volumenäquivalenten 1 M Essigsäure, 2 Volumenäquivalenten 3 M Natriumacetatlösung und 3 Volumenäquivalenten 100 mM Natriumacetatlösung gespült. Um Wechselwirkungen der Proteoliposomen mit dem Anionenaustauscher zu verhindern, wurde jede Säule anschließend einmal mit 400 μl Konditionierlösung (2 g/l BSA, 2 g/l Phosphatidylcholin in 100 mM Natriumacetat; pH zwischen 8 und 9) gespült.

2.4.3.4 Innenvolumenbestimmung

Das Innenvolumen wurde über eine ^{33}P -Phosphatverteilung bestimmt. Dazu wurden die Liposomen in Gegenwart von ^{33}P -Phosphat hergestellt und das äußere Medium über eine Gelfiltrations-Chromatographie (Sephadex G75 Säule, 6 ml Säulen-

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

volumen, Pharmacia Biotech, Freiburg) abgetrennt. Die Liposomen wurden aufgefangen und das Gesamtvolumen bestimmt. Verglichen wurden die cpm der Probe (bezogen auf das Gesamtvolumen) vor der Gelfiltration und die Gesamtcounts nach der Gelfiltration. Dies ergab das prozentuale Innenvolumen, welches in $\mu\text{l}/\text{mg}$ Phospholipid umgerechnet wurde.

2.4.3.5 Vortausch

Die über Rekonstitution hergestellten Proteoliposomen und die Stopplösung (20 mM Pyridoxal-5'-Phosphat in 1M Imidazol) wurden nun in je einer Mikrotiterplatte aliquotiert. Die Startlösung (50 mM HEPES, pH 6,8; 30 mM KP_i , pH 6,8; radioaktiv markiertes $\text{H}_3^{33}\text{PO}_4$ (ca. 50.000 cpm/ μl)) wurde in einer Spalte einer dritten Mikrotiterplatte vorgelegt. Jeglicher Flüssigkeitstransfer erfolgte mit Hilfe von Achtkanal-Pipetten.

Die Reaktion wird für jeden Meßzeitpunkt (d. h. spaltenweise) durch Zugabe von Startlösung (10 μl) zu den Liposomen (100 μl) gestartet. Die Reaktion wurde durch Überführen des Transportansatzes (95 μl) zu einem bestimmten Zeitpunkt in die Stopplösung (10 μl) gestoppt. Für die Nullpunktmessung wurden erst Liposomen (95 μl) und anschließend Startlösung (10 μl) zur Stopplösung (10 μl) gegeben. Ein definierter Teil dieses Reaktionsansatzes (95 μl) wurde auf die zuvor präparierten Anionenaustauschersäulen gegeben und die Liposomen mit 1 ml 150 mM Sucrose in kleine Gefäße isoliert. Nach Überführen dieser Gefäße in die Szintillationsgefäße konnte die aufgenommene Menge an radioaktivem Phosphat in die Liposomen im Szintillationszähler gemessen werden.

Die Transportaktivität wurde mit Hilfe eines Computerprogrammes (MicrocalTM OriginTM Version 4.1, Microcal Software, Inc., Northhampton, MA, USA) berechnet, das den zeitlichen Verlauf der Isotopenäquilibrierung (Exponentialfunktion) einem Prozeß erster Ordnung angleicht. Die Aufnahme y von radioaktivem Phosphat (in cpm) im Austauschmodus kann durch eine exponentielle Funktion der Form

$$y = y_0 + A \cdot e^{-\frac{x}{t_{1/2}}} \quad (2.1)$$

beschrieben werden. Dabei ist y_0 die radioaktive Menge zum Startzeitpunkt, A die Amplitude der Aufnahme, x die Zeit und $t_{1/2}$ die Halbwertszeit der Aufnahmerate. Die Anfangsaufnahmerate AR_0 [cpm/min] wurde durch Division von A und $t_{1/2}$ bestimmt. Die spezifische Radioaktivität r_{spez} [cpm/mol] des Phosphats ergibt sich zu:

$$r_{spez} = \frac{G}{c_{P_i} \cdot V} \quad (2.2)$$

wobei G die Gesamtcounts pro Meßpunkt darstellt, c_{P_i} die Phosphatkonzentration im Meßansatz und V das Volumen des Meßansatzes ($110 \mu\text{l}$) ist. Die spezifische Transportaktivität des Phosphatcarriers TA [$\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$] wird aus der Anfangsaufnahmerate AR_0 , der spezifischen Radioaktivität r_{spez} und der Proteinmenge $m_{Protein}$ [g] berechnet:

$$TA = \frac{AR_0}{r_{spez} \cdot m_{Protein} \cdot x} \quad (2.3)$$

Da die Aktivität der tatsächlich vermessenen Probe bestimmt wird, muß noch ein Korrekturfaktor x einbezogen werden, der die Verdünnungen der ursprünglichen Proteinmenge berücksichtigt, die während der Messung durchgeführt wurden.

2.4.3.6 Rücktausch

Mit der Rücktauschtechnik wurde der Export von radioaktiv markiertem Substrat aus den Proteoliposomen gemessen. Dazu war es erforderlich, die Proteoliposomen zunächst mit markiertem Substrat zu beladen. Hierzu wurden die Proteoliposomen ($1400 \mu\text{l}$) mit ^{33}P -Phosphat (ca. $1.000.000 \text{ cpm}$) für 30 Minuten bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde das radioaktiv markierte Phosphat über den Antiportmodus des Proteins in die Proteoliposomen aufgenommen, bis ein Gleichgewichtszustand erreicht war. Anschließend wurde das Protein durch Zugabe von Mersalylsäure ($0,3 \text{ mM}$ Endkonzentration) reversibel inhibiert, um einen Export des internen Substrats zu verhindern. Das externe Substrat konnte dann durch Größenausschlußchromatographie entfernt werden. Dazu wurden die verwendeten Sephadex G75 Säulen mit 130 mM HEPES (pH 6,8) äquilibriert. Die so erhaltenen, vorbeladenen Proteoliposomen konnten einer Rücktauschmessung unterzogen werden. Dazu wurden sie in Mikrotiterplatten aliquotiert (je $100 \mu\text{l}$). Der Start der Kinetik erfolgte durch Gabe von 50 mM DTT. Die Reaktion wurde durch Überführen des Transportansatzes ($95 \mu\text{l}$) zu einem bestimmten Zeitpunkt in die Stopplösung ($10 \mu\text{l}$; 40 mM Pyridoxal-5-Phosphat) gestoppt. Ein definierter Teil des Reaktionsansatzes ($95 \mu\text{l}$) wurde auf die zuvor präparierten Anionenaustauschsäulen gegeben und die Liposomen mit 1 ml 150 mM Saccharose in kleine Gefäße isoliert. Nach Überführen dieser Gefäße in die Szintillationsgefäße konnte die aufgenommene Menge an radioaktivem Phosphat in die Liposomen im Szintillationszähler gemessen werden.

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

Die Transportaktivität der Rücktausch-Experimente wurde ebenfalls mit Hilfe von MicrocalTM OriginTM Version 4.1, Microcal Software, Inc., Northhampton, MA, USA, berechnet. Die Meßpunkte werden dabei den folgenden Gleichungen angepaßt (Dierks *et al.*, 1988). Zur Berechnung von Rücktauschkinetiken muß der Startwert (cpm_0) und der Endwert (cpm_∞) der Isotopenäquilibration bekannt sein. Der prozentuale Äquilierungsgrad α einer Kinetik zum Zeitpunkt t ergibt sich aus:

$$\alpha = 100 \cdot \frac{(cpm_0 - cpm_t)}{(cpm_0 - cpm_\infty)} \quad (2.4)$$

Wenn die Menge des externen Substrats die des internen um ein Vielfaches übersteigt, kann die Zeitabhängigkeit der prozentualen Isotopenäquilibration wie folgt beschrieben werden:

$$\alpha = 100 \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (2.5)$$

Aus den so erhaltenen Werten für die apparente Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung k [min^{-1}] ergibt sich der zeitliche Verlauf der Isotopenäquilibration, da innerhalb eines einzelnen Experiments mit identischen Proteoliposomen die apparenten Geschwindigkeitskonstanten direkt miteinander vergleichbar sind (Dierks *et al.*, 1988). Durch Multiplikation der apparenten Geschwindigkeitskonstanten k mit dem aktiven Innenvolumen V_{in} und der internen Substratkonzentration S_{in} wird die Austauschaktivität v' [$\mu\text{M}/\text{min}$] berechnet:

$$v' = k \cdot V_{in} \cdot S_{in} \quad (2.6)$$

2.4.3.7 Efflux

Zur Messung des Effluxmodus wurden die Liposomen zunächst wie für den Rücktausch vorbehandelt: Beladung im Antiportmodus, reversible Inhibition des Phosphatcarriers mit 0,3 mM Mersalylsäure, Abtrennung des externen radioaktiv markierten Mediums über Gelfiltration. Zum Starten des Efflux wurde jetzt HgCl_2 in verschiedenen Konzentrationen zu den vorbeladenen Proteoliposomen gegeben. Als Stopreagenz wurde 40 mM PLP mit 10 mM DTT eingesetzt. Externe anionische Substrate wurden mit dem Anionenaustauscher Dowex 2x8 (Acetatform) abgetrennt.

2.4.4 Proteinbestimmungen

Je nach Bedarf wurden verschiedene Proteinbestimmungen angewendet. Der Proteingehalt von solubilisierten *inclusion bodies* des Phosphatcarriers wurde durch eine modifizierte Methode nach Lowry *et al.* (1951) bestimmt. Die Quantifizierung von Protein in Proteoliposomen zur Bestimmung der Einbaurrate erfolgte entweder nach Kaplan und Pedersen (1985) oder über eine Analyse mittels SDS-PAGE. Hierzu wurden Proteoliposomen, die theoretisch 2 μg Protein enthielten, mit Puffer (30 mM KPi , pH 6,8; 50 mM HEPES, pH 6,8) verdünnt und sedimentiert (350.000 x g; 20 Minuten; 15°C). Die sedimentierten Liposomen wurden in 15 μl Solubilisierungspuffer (10 mM Tris; 0,1 mM EDTA; pH 7,0; 1,5 % SLS) bei RT für 30 Minuten solubilisiert, mit 4x Probenpuffer versetzt und neben einer Standardreihe aus solubilisiertem Phosphatcarrier aufgetragen. Die Visualisierung der Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE (vgl. 3.4.6) erfolgte mittels Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987).

2.4.5 Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgele wurden nach einer Vorschrift von Lämmlí (1970) hergestellt. Zur Bestimmung der Einbauraten in Proteoliposomen und zum Nachweis der Bindung der MTS-Reagentien wurden 10 %ige Trenngele verwendet. Die Elektrophorese wurde zur Bestimmung der Einbauraten und zum Nachweis der Bindung der MTS-Reagentien über Nacht mit 65 V für 21 h durchgeführt. Zur Visualisierung der exprimierten Proteine wurden 12 %ige Trenngele verwendet. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele je nach Verwendung mit Coomassie Brilliant Blau (Sambrook *et al.*, 1989) gefärbt oder eine Silberfärbung nach Blum (Blum *et al.*, 1987) durchgeführt.

2.4.6 Zugänglichkeitsstudien

Zur Untersuchung von Zugänglichkeiten von einzelnen Cysteinresten des mitochondrialen Phosphatcarriers wurden diese Proteine wie unter 2.4.2.4 beschrieben rekonstituiert.

Zur Etablierung des Meßsystems wurden die Proteoliposomen mit verschiedenen Konzentrationen von MTSEA, MTSET und MTSES für 15 Minuten bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Proben, die anschließend ra-

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

radioaktiv vermessen werden, aliquotiert. Die kinetische Transportmessung erfolgte dann wie unter 2.4.3.5 beschrieben.

Um die Reaktion der MTS-Reagentien mit dem im Protein vorhandenen Cystein nachzuweisen, wurde die Reaktion eines weiteren Proteoliposomen-Aliquots gestoppt. Dies geschah durch Verdünnung der Proteoliposomen in Rekonstitutionspuffer (30 mM KP_i , 50 mM HEPES, pH 6,8) und anschließender Zentrifugation (90.000 rpm, 15°C, 20 Minuten). Die Verdünnungsrate ist abhängig von dem eingesetzten Protein-zu-Lipid Verhältnis, das je nach Experiment zwischen 1,5 μ g Protein/mg Lipid und 15 μ g Protein/mg Lipid schwankte. Das erhaltene Pellet wurde in 15 μ l Solubilisierungspuffer (10 mM Tris; 0,1 mM EDTA; pH 7,0; 1,5 % SLS) gelöst und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Der Nachweis der Bindung der MTS-Reagentien erfolgte über Fluoreszenzlabeling nach Meuller und Rydstrom (1999). Zu den solubilisierten Proteoliposomen wurde 15 mM NaP_i , pH 8 und anschließend 160 μ M Fluorescein-5-Maleimid gegeben. Es wurde für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dabei reagieren alle Cysteine mit dem Fluoreszenzfarbstoff, die bisher noch nicht mit MTS-Reagentien reagiert haben. Parallel hierzu wurde eine Eichreihe mit der jeweilig entsprechenden Menge an solubilisiertem Protein vorbereitet. Anschließend wurde die Reaktion durch Gabe von 5 mM L-Cystein gestoppt. Die Proben wurden jetzt wie unter 2.4.5 beschrieben für die Gelelektrophorese vorbereitet und über Nacht der Elektrophorese unterzogen. Nach dem Ende der Elektrophorese wurde das Gel zunächst kurz gewässert. Es erfolgte erst die Auswertung zur Fluoreszenzmarkierung am Fluoreszenzimager; anschließend wurde das Gel einer Silberfärbung unterzogen (Blum *et al.*, 1987), um die Einbauraten nachzuweisen.

Für die zeitlich aufgelösten Zugänglichkeitsstudien wurden die Proteine wie unter 2.4.2.4 beschrieben rekonstituiert. Das Protein-zu-Lipid Verhältnis schwankte dabei je nach Einbaueffizienz der verschiedenen rekombinanten Proteine zwischen 5 μ g Protein/mg Lipid und 25 μ g Protein/mg Lipid. Zur Untersuchung der Zugänglichkeit wurde in Mikrotiterplatten die zweifache Menge Cystein verglichen mit dem verwendeten MTS-Reagenz als Stoppreagenz der Labelreaktion vorgelegt. Die MTS-Reaktion wurde durch Gabe von 2,5 mM MTSEA, 1 mM MTSET bzw. 10 mM MTSES gestartet und nach 30 Sekunden, 1 Minute, 2 Minuten und 5 Minuten durch Pipettieren eines Aliquots (100 μ l) in die Stopplösung gestoppt. 50 μ l wurden anschließend in Puffer (50 mM HEPES, pH 6,8; 30 mM KP_i , pH 6,8) 1:60 verdünnt und zentrifugiert (90.000 rpm, 15 °C, 20 Minuten). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet für ca. 1-2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und an-

KAPITEL 2. MATERIAL UND METHODEN

schließend in 15 μ l Solubilisierungspuffer gelöst. Die weitere Aufarbeitung und das Markieren mit Fluorescein-5-Maleimid erfolgte wie oben beschrieben.

Zur Aktivitätsmessung wurde die Zugänglichkeitsreaktion an Proteoliposomen nach 5 Minuten mit 10 mM DTT gestoppt. Die Proben wurden aliquotiert und wie unter 2.4.3.2 beschrieben vermessen.

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung des Meßsystems

Viele mitochondriale Carrier wurden bislang sowohl im nativen System, den Mitochondrien, als auch im artifiziellen System (Proteoliposomen) charakterisiert. Beim mitochondrialen Phosphatcarrier konnte für den homologen Phosphataustausch in Rinderherzmitochondrien eine Aktivität von 70 U/mg Protein gemessen werden (Krämer und Palmieri, 1992). Für aus Rinderherzen isolierten Phosphatcarrier wurde für den Phosphataustausch im rekonstituierten System eine Aktivität von 120 U/mg Protein gemessen (Stappen und Krämer, 1994). Ähnliche Werte ergaben sich für PiC aus *S. cerevisiae* - sowohl für aus Hefe isoliertes (Guerin *et al.*, 1990) als auch für heterolog exprimiertes Protein (Wohlrab und Briggs, 1994). Rekonstitutionsversuche und anschließende Transportmessungen von heterolog exprimiertem Protein mit Hilfe des bisher in unserer Arbeitsgruppe verwendeten Meßsystems zeigten jedoch nur eine maximale Aufnahmerate von 0,1 U/mg Protein. Eine glaubwürdige Interpretation der Ergebnisse war in diesem Meßsystem so nicht möglich. Daher mußten sowohl das Meßsystem als auch die Methode zur Rekonstitution optimiert werden. Dabei wurde das Meßsystem durch ein zuverlässigeres, fehlerreduzierteres und durchsatzstärkeres Meßsystem mit Mehrkanalpipetten ersetzt (vgl. Abb. 2.1; Deuber, 2000). Zur Optimierung der Rekonstitution wurde die Wirkung verschiedener Lipidmischungen, Rekonstitutionsmethoden und Detergentien untersucht.

3.1.1 Vorbehandlung des Proteins

Zur Optimierung der Rekonstitution können beispielsweise die verwendeten Detergentien variiert werden. Im SLS-solubilisierten Zustand liegt PiC in monomerer und denaturierter Form vor. Aktiv ist das Protein jedoch nur als Dimer. Es konnte gezeigt werden, daß der mitochondriale Phosphatcarrier nach einer Dialyse gegen das nichtionische Detergenz C₁₂E₈ von seiner monomeren Form in die dimere Form übergeht (Schroers, 1998). Das Protein wird durch den Detergenzaustausch rena-

turiert. In dieser Arbeit wurde der Einfluß von renaturiertem PiC bei der Rekonstitution in Liposomen aus Truthahneigelblipiden untersucht. Zum einen wurde der Zusatz von 0,5 % $C_{12}E_8$ zum solubilisierten Protein, aber auch der Einfluß des Detergenzaustauschs von SLS gegen $C_{12}E_8$ untersucht. In beiden Fällen konnte jedoch keine Verbesserung der Transportaktivität nachgewiesen werden. Auch ein Ersatz von dem zur Rekonstitution verwendeten Detergenz Triton X-114 durch $C_{12}E_8$ zur vollständigen Solubilisierung der Liposomen war nicht erfolgreich.

3.1.2 Rekonstitution nach Rigaud (Rigaud *et al.*, 1995)

Zur funktionellen Rekonstitution von Membranproteinen werden verschiedene Methoden verwendet. Der mitochondriale Phosphatcarrier wurde bisher nach der Methode von Krämer und Heberger (1986) in Liposomen aus Truthahneigelblipiden rekonstituiert. Dabei wurden vorgeformte Liposomen durch Detergenzzugabe vollständig solubilisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Rekonstitution des mitochondrialen Phosphatcarriers nach der Methode von Rigaud durchgeführt. Dabei wird das solubilierte Protein in vorgeformte und zu 25 % solubilierte Liposomen eingelagert. Die zur Solubilisierung notwendige Detergenzkonzentration wurde mittels Extinktion bei 600 nm bestimmt. Für $C_{12}E_8$ beträgt diese Konzentration 0,5 % und für Triton X-100 1 %. Da wässrige Lösungen von Triton X-114 bei Konzentrationen um 1 % trüb sind, wurde die benötigte Detergenzkonzentration auf 1 % geschätzt. Mit diesen Konzentrationen wurde der Ansatz nach Rigaud auch für den Phosphatcarrier durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden käuflich erworbene Lipide aus Truthahneigelb verwendet. Die zur Solubilisierung verwendeten Detergentien wurden durch portionsweise Zugabe von BioBeads aus dem Reaktionsansatz entfernt und die Proteine dabei in die Lipiddoppelschicht integriert. Die erhaltenen Proteoliposomen besaßen bei einem Protein-zu-Lipid Verhältnis von 0,2 μg Protein/mg Lipid ein Innenvolumen von 5,4 μl /mg Phospholipid. Liposomen ohne Protein wiesen ein Innenvolumen von 5,1 μl /mg Phospholipid auf.

Das Abtrennen des externen radioaktiven Phosphats von den Proteoliposomen nach einer Messung erfolgte sowohl mit Hilfe der Filtermethode als auch mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie (Dowex-Säulen). Bei der Filtration wird das äußere Medium abgetrennt, und die Proteoliposomen adsorbieren an Nitrocellulose-Mischesterfilter. Über die Messung der auf dem Filter verbliebenen Radioaktivität konnte die Aufnahmerate bestimmt werden. Bei der Verwendung der Dowex-Säulen wurde wie unter 2.4.3.5 beschrieben vorgegangen. Es konnte weder bei der Filtration noch bei der Verwendung der Dowex-Säulen eine signifikante Transportaktivität

KAPITEL 3. ERGEBNISSE

festgestellt werden. Auch nach Extrudieren der Proteoliposomen konnte keine signifikante Aktivität nachgewiesen werden.

3.1.3 Variation der zur Rekonstitution verwendeten Lipide

Nachdem die Rekonstitution nach Rigaud nicht erfolgreich war, wurde jetzt der Einfluß unterschiedlicher Lipidmischungen zur Rekonstitution nach der herkömmlichen Methode von Krämer und Heberger (1986) untersucht.

Die Gruppe um Wohlrab verwendet zur funktionellen Rekonstitution des mitochondrialen Phosphatcarriers Ca-Phosphatidat, Phosphatidylcholin (Sojabohne) und Phosphatidylethanolamin (Sojabohne) in einem Verhältnis von 1:25:31,5 (Wohlrab und Briggs, 1994). Diese Lipidmischung wurde ebenfalls getestet, jedoch wurde Na-Phosphatidat anstelle von Ca-Phosphatidat eingesetzt. Das zur Rekonstitution verwendete Protein-zu-Lipid Verhältnis betrug $1,5 \mu\text{g}$ Protein/mg Lipid. Unter den getesteten Bedingungen konnte mit dieser Lipidmischung nur eine Transportaktivität von $0,8 \text{ U/mg}$ Protein erzielt werden (Ergebnisse nicht gezeigt), so daß auf eine weitere Optimierung dieses Systems verzichtet wurde.

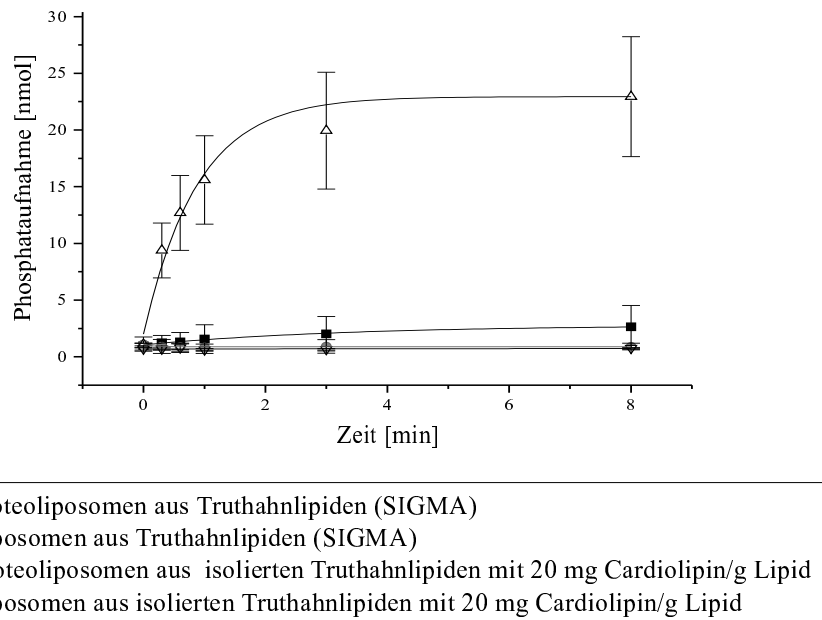


Abbildung 3.1: Phosphataufnahme in Proteoliposomen ($100 \mu\text{l}$). Verwendete Lipide (16 mg/ml): käufliches Phosphatidylcholin aus Truthahneigelb (SIGMA) bzw. selbst isolierte Lipide aus Truthahneigelb ohne und mit 20 mg Cardiolipin/g Lipid; Phosphatcarrier ($1,5 \mu\text{g}$ Protein/mg Lipid) und Puffer (30 mM KP_i und 50 mM HEPES). Als jeweilige Kontrollen sind Liposomen ohne Protein gezeigt.

In dem in unserer Arbeitsgruppe bisher verwendeten Rekonstitutionssystem wurden käuflich erworbene Lipide aus Truthahneigelb eingesetzt. Durch Ersatz dieser käuflich erworbenen Truthahnlipide gegen selbst isolierte Truthahnlipide konnte in der Arbeitsgruppe um Klingenberg die Transportaktivität des Nukleotidcarriers reproduzierbar erhöht werden (Klingenberg, 1999). Daher wurde nun unter Verwendung von selbst isolierten Truthahnlipiden rekonstituiert. Die Isolation der Truthahnlipide wurde von Francois Deuber durchgeführt (Deuber, 2000). Die Rekonstitution erfolgte mit einem Protein-zu-Lipid Verhältnis von $1,5 \mu\text{g}$ Protein/mg Lipid. Jedoch führte auch die Verwendung der selbstisolierten Truthahnlipide beim mitochondrialen Phosphatcarrier nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Transportaktivität (vgl. Abb. 3.1).

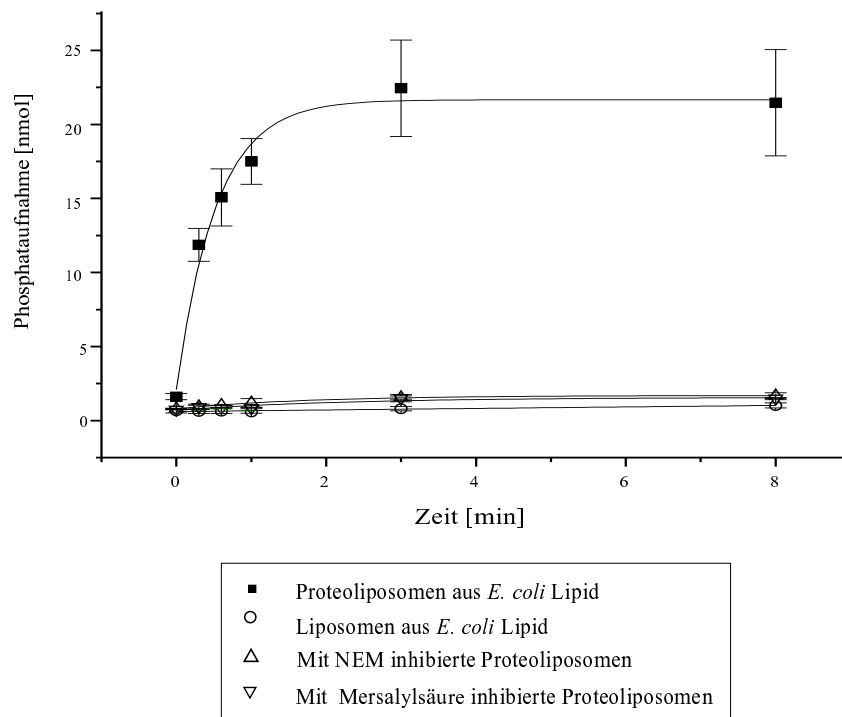


Abbildung 3.2: Phosphataufnahme in Proteoliposomen ($100 \mu\text{l}$); verwendete Lipide (16 mg/ml): *E. coli total lipid extract*, (AVANTI, USA); Phosphatcarrier ($1,5 \mu\text{g}$ Protein/mg Lipid) und Puffer (30 mM KPi und 50 mM HEPES). Als Kontrollen sind Liposomen ohne Protein sowie mit NEM bzw. Mersalylsäure inhibierte Proteoliposomen gezeigt.

Seit langem wird diskutiert, ob Cardiolipin für die Funktion der mitochondrialen Carrier essentiell ist. Daher wurde der Zusatz von Cardiolipin zu den selbst isolierten Truthahnlipiden untersucht. Die frisch angesetzten Cardiolipin/Truthahneigelb-Lipidmischungen hatten eine Konzentration von $20 \text{ mg Cardiolipin/g Lipid}$. Das zur Rekonstitution verwendete Protein-zu-Lipid Verhältnis betrug $1,5 \mu\text{g}$ Prote-

KAPITEL 3. ERGEBNISSE

in/mg Lipid. Durch den Zusatz von Cardiolipin konnte eine signifikante Erhöhung der Aktivität des mitochondrialen Phosphatcarriers von ca. 1 U/mg Protein auf ca. 10 U/mg Protein erreicht werden. Das Ergebnis ist in Abb. 3.1 dargestellt. Liposomen ohne Protein nehmen nur sehr wenig radioaktiv markiertes Phosphat während der Meßzeit auf, so daß die gemessene Aufnahme in die Proteoliposomen proteinvermittelt ist. Versuche mit spezifischen Inhibitoren für PiC wie NEM und Mersalylsäure konnten dies unterstützen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Weiterhin wurde die Verwendung von *E. coli* Lipiden (*total lipid extract*, AVANTI, Alabaster USA) zur Rekonstitution untersucht. Die *E. coli* Lipide besitzen folgende Zusammensetzung: 57,5 % Phosphatidylethanolamin, 15,1 % Phosphatidylglycerol, 9,8 % Cardiolipin und 17,6 % andere Lipide. Unter Verwendung dieser Lipide zur Rekonstitution konnte eine signifikante Erhöhung der Aktivität auf ca. 10 U/mg Protein gemessen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 3.2 dargestellt. Die Schwankungen der einzelnen Meßwerte untereinander sind gering. Auch Liposomen ohne Protein nehmen nahezu kein radioaktiv markiertes Phosphat auf.

3.2 Charakterisierung des optimierten Meßsystems

Für alle weiteren Messungen wurden im folgenden Liposomen aus *E. coli* Lipiden verwendet. Zur näheren Charakterisierung des optimierten Meßsystems wurde das Innenvolumen der Liposomen bei unterschiedlichen Protein-zu-Lipid Verhältnissen, das Optimum für die Aktivität in Abhängigkeit vom Protein-zu-Lipid Verhältnis, die Einbaueffizienz für WT-PiC und die K_M - und V_{max} -Werte für das System bestimmt. Weiterhin wurden Inhibitionsstudien mit NEM und Mersalylsäure durchgeführt und die drei Transportmodi Antiport, Uniport und Efflux gemessen. Zur Bestimmung der Innenvolumina wurden Proteoliposomen unterschiedlicher Protein-zu-Lipid Verhältnisse mit ^{33}P beladen und die Verteilung der radioaktiv markierten Substanz bestimmt. In Tab. 3.1 sind die Ergebnisse der Innenvolumenbestimmung der Proteoliposomen zusammengefaßt. Das Innenvolumen nimmt mit zunehmender Proteinkonzentration ab.

Weiterhin wurde der Einfluß der Variation des Protein-zu-Lipid Verhältnisses auf die Transportaktivität untersucht. Die Abb. 3.3 belegt, daß die gemessenen spezifischen Transportraten lediglich in einem relativ kleinen Bereich zwischen 0,25-1 μg Protein/mg Phospholipid optimale Werte erreichen. Für den mitochondrialen Phosphatcarrier aus Rinderherzmitochondrien konnte ein Optimum für die Transportak-

Tabelle 3.1: Innenvolumina von *E. coli* Proteoliposomen mit rekonstituiertem PiC in Abhängigkeit von dem Protein-zu-Lipid Verhältnis.

Protein-zu-Lipid Verhältnis [$\mu\text{g}/\text{mg}$]	Innenvolumen [$\mu\text{l}/\text{mg}$]
0	$4,29 \pm 0,78$
0,5	$3,2 \pm 0,5$
2	$2,7 \pm 0,14$
3	$2,1 \pm 0,11$
15	$1,25 \pm 0,03$

tivität im Bereich von 0,5 bis 1,5 μg Protein/mg Lipid ermittelt werden (Stappen, 1994).

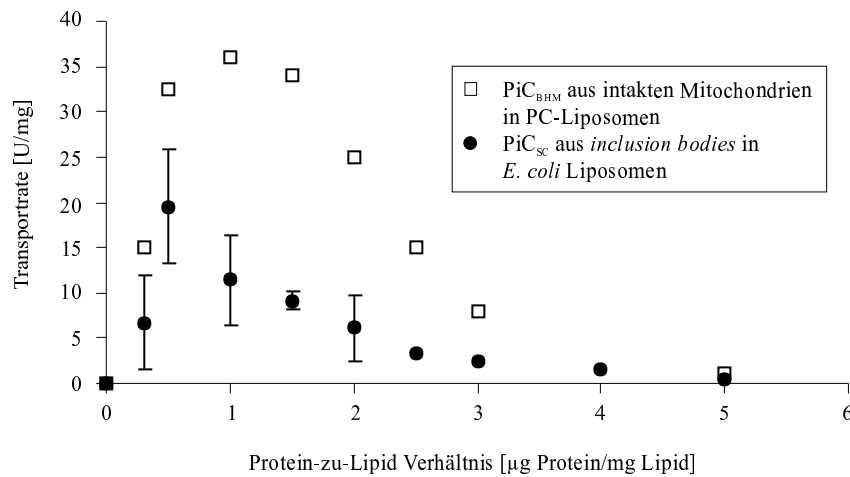


Abbildung 3.3: Aktivität des PiC_{SC} in Abhängigkeit von dem zur Rekonstitution eingesetzten Protein-zu-Lipid Verhältnis. Heterolog exprimierter PiC_{SC} aus *inclusion bodies* wurde in *E. coli* Liposomen rekonstituiert. PiC_{BHM} wurde aus intakten Mitochondrien in PC-Liposomen rekonstituiert (Daten aus Stappen 1994).

Die tatsächlich in die Liposomen eingebaute Menge an Protein wurde auf einem silbergefärbten Polyacrylamidgel anhand einer Eichreihe mit bekannten Proteinmengen optisch bestimmt. Bei mehrmaliger Durchführung der Experimente ergaben sich starke Schwankungen bezüglich der Einbaueffizienz. Für den WT konnte mit dieser Methode eine Einbaueffizienz von 20-30 % in die Liposomen ermittelt werden (vgl. Abb. 3.9).

Weiterhin wurden Versuche zur Inhibition des mitochondrialen Phosphatcarriers mit Mersalylsäure und NEM durchgeführt. Nach Inkubation des rekonstituierten Phosphatcarriers mit Mersalylsäure konnte eine Restaktivität von unter 5 % gemessen

KAPITEL 3. ERGEBNISSE

sen werden (vgl. Abb. 3.2). Weiterhin wurden Inhibitionsexperimente mit NEM durchgeführt. Dazu wurde das solubilisierte Protein mit 5 mM NEM für 30 Minuten behandelt und anschließend, wie unter 2.4.2.4 beschrieben, rekonstituiert (Protein-zu-Lipid Verhältnis: 1,5 μg Protein/mg Lipid). Bei der Aktivitätsmessung konnte auch hier festgestellt werden, daß die Restaktivität unter 5 % lag (vgl. Abb. 3.2).

Es wurden sowohl der K_M - wie auch der V_{max} Wert im neuen Meßsystem bestimmt. Dazu wurde PiC wie unter 2.4.2.4 rekonstituiert (Protein-zu-Lipid Verhältnis: 3 μg /mg) und die Phosphatkonzentration des äußeren Mediums nach Inhibition der Proteoliposomen mit 0,3 mM Mersalylsäure über Gelfiltration variiert. Die Reaktion wurde durch Gabe von radioaktivem Phosphat mit 50 mM DTT gestartet und nach verschiedenen Zeitpunkten gestoppt. Mit Hilfe eines Lineweaver-Burk-Plots konnte der externe K_M -Wert zu 6 mM und der V_{max} -Wert zu 1,5 U/mg Protein ermittelt werden (Engstova *et al.*, 2000).

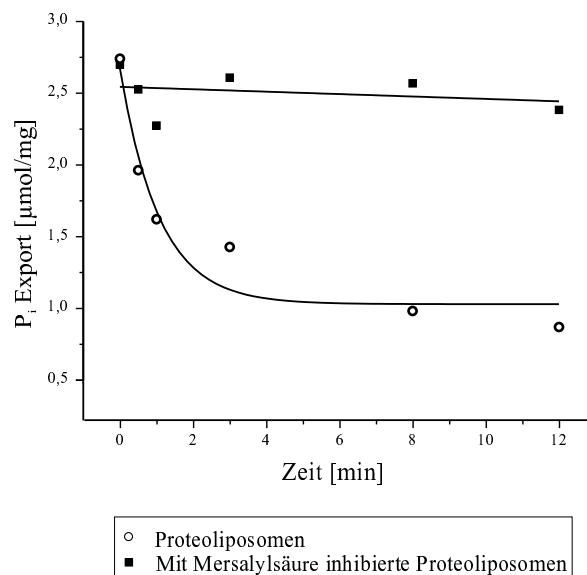


Abbildung 3.4: Rücktauschmessung in *E. coli* Proteoliposomen. Die Exportreaktion der mit ^{33}P -Phosphat beladenen Proteoliposomen wurde mit 50 mM DTT gestartet und nach Ablauf der Meßzeit mit PLP und DTT gestoppt. Als Kontrolle sind mit Mersalylsäure inhibierte, mit ^{33}P -Phosphat beladene Proteoliposomen über den gesamten Meßzeitraum abgebildet.

Neben Antiportmessungen wurden auch Messungen des Uniports im Rücktauschmodus durchgeführt. Dazu müssen die Proteoliposomen zunächst mit radioaktivem Substrat vorbeladen und anschließend der Carrier mit einem reversiblen Inhibitor (Mersalylsäure) gehemmt werden. Das äußere radioaktive Substrat wird über eine Gelfiltration abgetrennt und die Transportreaktion durch Zugabe von DTT gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wird der Transport durch PLP wieder

gestoppt, das äußere Substrat über Dowex-Säulen abgetrennt und die in den Liposomen verbliebene Radioaktivität gezählt. Zur Durchführung dieser Messungen mußte die optimale Konzentration von Mersalylsäure zur Inhibition des Phosphatcarriers in den Proteoliposomen als auch die notwendige Menge an DTT bestimmt werden, um die Inhibition wieder aufzuheben. Es konnte gezeigt werden, daß 0,3 mM Mersalylsäure, 50 mM DTT und 130 mM HEPES als Puffer für die Gelfiltration optimale Bedingungen für die Messung des Uniports im Rücktauschmodus sind. Wichtig für die Messungen war, daß die Liposomen vor ihrer Verwendung extrudiert wurden. Diese Behandlung führte für den WT zu einer Aktivität von 0,9 U/mg Protein. Diese Aktivität entspricht jedoch nur 1/10 der gemessenen Aktivität im Antiportmodus. Es konnte gezeigt werden, daß die Aktivität des Proteins auch im Antiportmodus nach einer Gelfiltration auf 1,5 U/mg Protein sinkt, so daß der Verlust der Aktivität auf die Gelfiltration zurückgeführt werden kann. Die Ursache für den Aktivitätsverlust ist unklar.

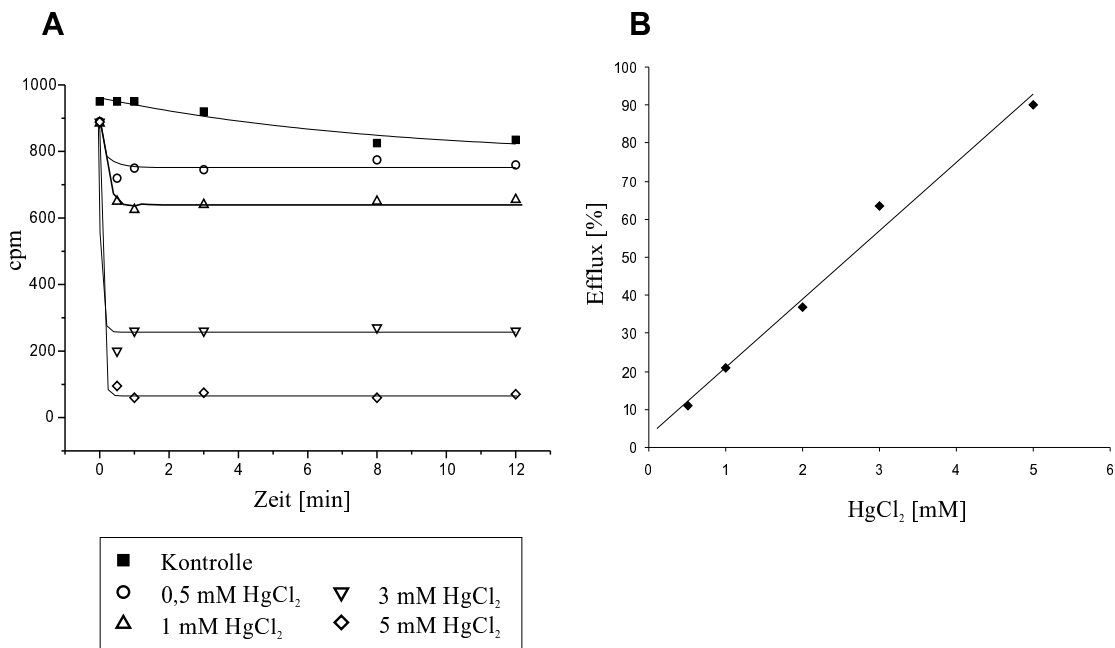


Abbildung 3.5: Effluxmessung in *E. coli* Proteoliposomen. Der Efflux der mit ³³P-Phosphat beladenen Proteoliposomen wurde mit verschiedenen Konzentrationen an HgCl₂ gestartet und nach Ablauf der Meßzeit mit PLP und DTT gestoppt. Als Kontrolle sind mit Mersalylsäure inhibierte, mit ³³P-Phosphat beladene Proteoliposomen über den gesamten Meßzeitraum abgebildet. **A:** Exemplarische Messungen des HgCl₂ induzierten Effluxmodus. **B:** Korrelation der Quecksilberchlorid-Konzentration mit dem gemessenen Efflux.

KAPITEL 3. ERGEBNISSE

Zur Messung des Quecksilber-induzierten Effluxmodus wurden mit Mersalylsäure inhibierte und radioaktiv beladene Proteoliposomen, deren äußeres Medium über eine Gelfiltration ausgetauscht worden war, mit unterschiedlichen Konzentrationen an HgCl_2 behandelt. Dabei reagiert das HgCl_2 mit der Thiolgruppe des Cystein 28 der ersten Transmembranhelix zu einem positiv geladenen Mercaptid. Die positive Ladung an dieser Position ist verantwortlich für die Induktion des Effluxmodus. Die Reaktion wird nach verschiedenen Zeitpunkten durch Gabe von Stopplösung gestoppt, das äußere, radioaktiv markierte Medium der Proteoliposomen über Dowex-Säulen ausgetauscht und die in den Proteoliposomen verbliebene Radioaktivität gezählt. Dabei konnte gezeigt werden, daß mit steigender Konzentration an HgCl_2 der Ausstrom an radioaktiv markiertem Substrat proportional zunimmt (vgl. Abb. 3.5). Auch Liposomen ohne Protein wiesen die gleichen Eigenschaften wie die Proteoliposomen auf. Die erzeugten Liposomen sind stark quecksilbersensitiv, weshalb in diesem System kein mit Quecksilber induzierter Efflux gemessen werden kann.

3.3 Die funktionale Bedeutung der nativen Cysteine im PiC

Der PiC_{SC} besitzt 3 native Cysteinreste (Abb. 3.6), welche einzeln bzw. in verschiedenen Kombinationen gegen Serin ausgetauscht wurden. Es wurden folgende Mutanten generiert: Cys28Ser (SCC); Cys134Ser (CSC); Cys300Ser (CCS); Cys134/300Ser (CSS), Cys28/300Ser (SCS), Cys28/134/300Ser (SSS). Alle isolierten rekombinanten Proteine konnten in Form von *inclusion bodies* im Milligramm-Maßstab isoliert werden (Abb. 3.7). Die gewonnene Proteinmenge schwankte von 10 mg/l Bakterienkultur bei SCS bis zu 20 mg/l Bakterienkultur bei SSC; das Wildtypprotein wurde im Vergleich hierzu in einer Menge von 17 mg/l Bakterienkultur gewonnen. Wie auch beim WT-Protein konnten sämtliche rekombinanten Proteine mit einer Reinheit von ca. 80 % erhalten werden.

Diese rekombinanten Proteine wurden im rekonstituierten System auf ihre Transportaktivität im Antiportmodus untersucht (vgl. Abb. 3.8). Die Aktivität von SCC war mit der des WT-Proteins vergleichbar. Bis auf CCS und CSS zeigten alle übrigen Proteine signifikante Aktivitäten, die jedoch, verglichen mit der WT-Aktivität, wesentlich geringer waren. So wies CSC eine Aktivität von ca. 30 %, SCS und SSC von ca. 30-40 % und SSS von 10-15 % auf. Nur CCS und CSS zeigten eine kaum meßbare Aktivität im Verleich zum Wildtyp auf. Ihre Transportaktivitäten schwankten um 0,1 U/mg Protein.

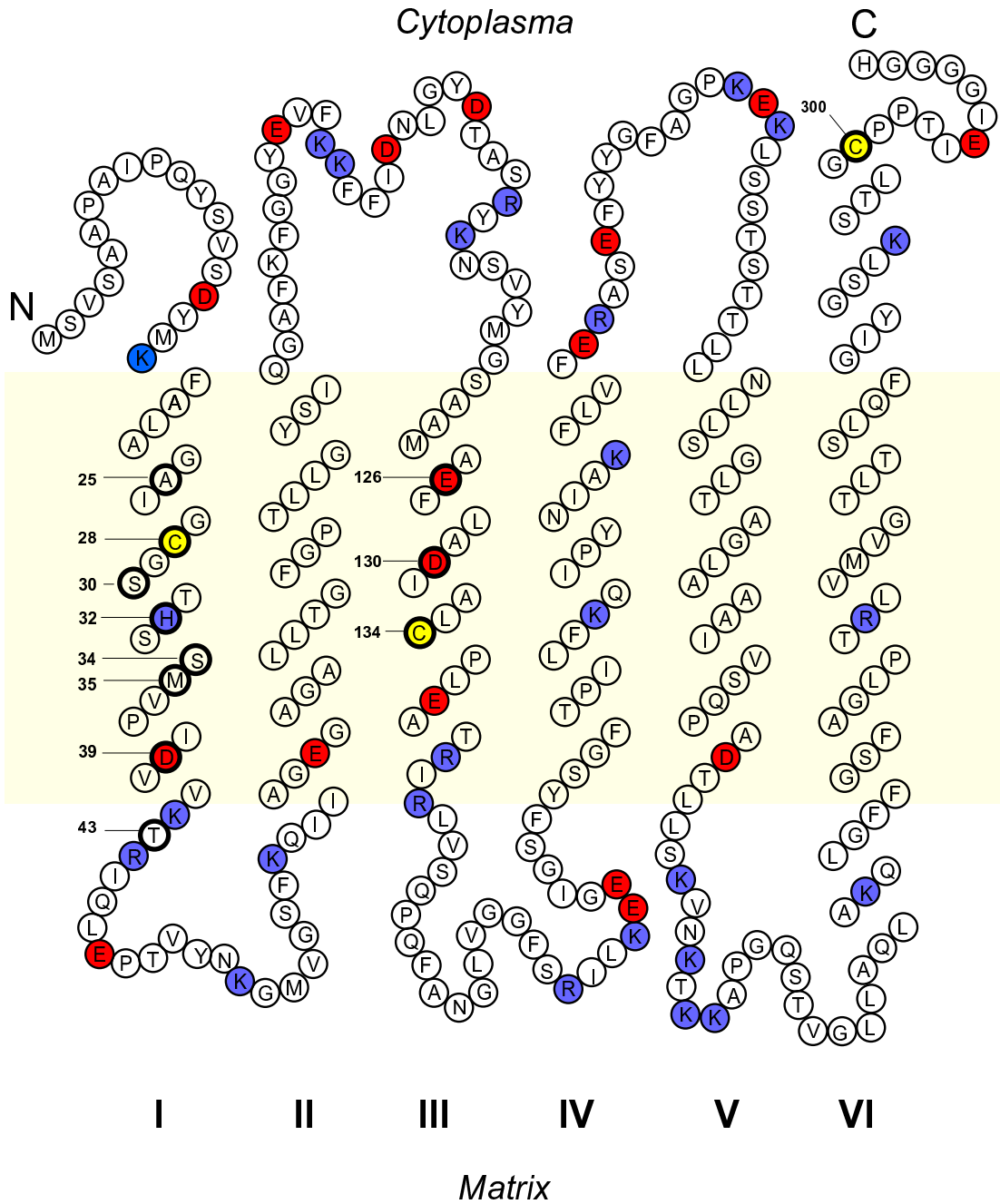


Abbildung 3.6: Putative Transmembrantopologie des PiC_{SC} abgeleitet aus Hydropathieplots. Die drei nativen Cysteinreste sind gelb unterlegt und fett umrahmt. Negativ geladene Aminosäuren sind rot unterlegt, positiv geladene Aminosäuren sind blau unterlegt. Der Bereich der Phospholipidmembran ist hellgelb unterlegt. Die in dieser Arbeit untersuchten Aminosäurepositionen sind durch fette Umrandung gekennzeichnet.

KAPITEL 3. ERGEBNISSE

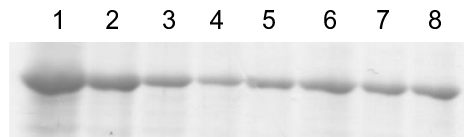


Abbildung 3.7: Auftragung der solubilisierten *inclusion bodies* auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt. Aufgetragen wurde: 1: WT, 2: SCC, 3: CSC, 4: CCS, 5: SSC, 6: SCS, 7: SSC und 8: SSS.

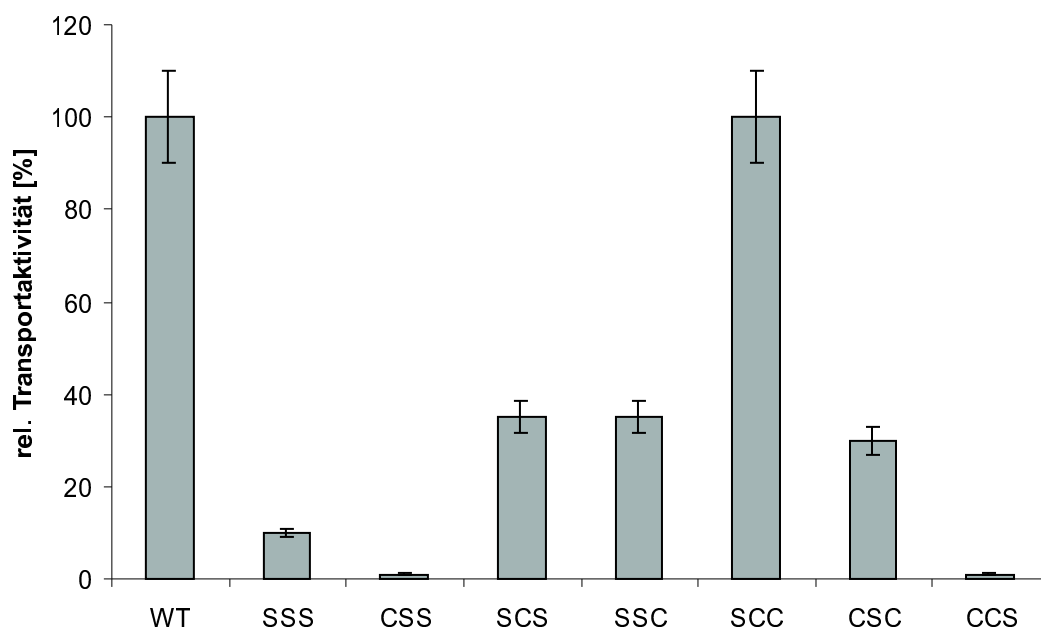


Abbildung 3.8: Relative Transportaktivitäten der erzeugten rekombinanten Proteine des PiC_{SC} zur funktionalen Untersuchung der nativen Cysteine. Die Aktivität wurde in An-
tipportmessungen mit 30 mM KP_i , pH 6,8 und 50 mM HEPES, pH 6,8 intern und extern ermittelt. Das verwendete Protein-zu-Lipid Verhältnis betrug 3 μg Protein/mg Lipid. Die Aktivität des WT wurde auf 100 % gesetzt.

Die drastisch verminderte Transportaktivität für CCS und CSS könnte auf eine verminderte Insertion der Proteine in die Proteoliposomen zurückzuführen sein. Es wird schon seit langem vermutet, daß das Cystein an der Position 300 für den Einbau des Proteins wichtig sei. Jedoch konnte für CCS gezeigt werden, daß dieses Protein eine Einbaueffizienz von ca. 25 % aufweist, was der Einbaueffizienz des Wildtyp-Proteins entspricht. Nur bei CSS korrelierte die schlechte Transportaktivität mit einer schlechten Einbaueffizienz von unter 5 %. Die Einbaueffizienz von SSC war mit ca. 40 % sehr hoch. CSC, SCS, SSC, SSS wurden alle mit einer Effizienz von ca. 10 % in die Proteoliposomen eingebaut (vgl. Abb. 3.9).

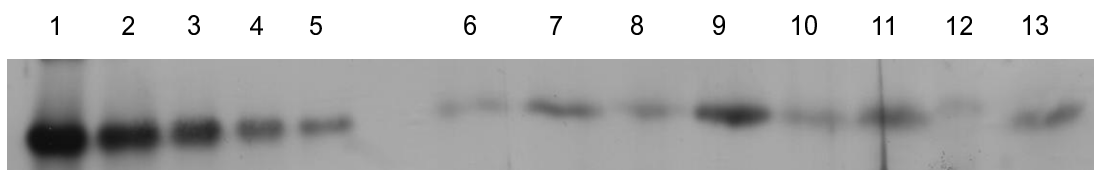


Abbildung 3.9: Bestimmung der Einbaueffizienz von verschiedenen rekombinanten Proteinen und dem WT mit Hilfe von SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987). Aufgetragen wurden solubilisierte Proteoliposomen, die theoretisch 2 µg Protein enthalten und eine Eichreihe aus solubilisiertem Protein. 1-5: Eichreihe (2 µg; 1 µg; 0,5 µg; 0,3 µg; 0,1 µg); 6: CSS; 7: SCS; 8: SSC; 9: SCC; 10: CSC; 11: CCS; 12: SSS und 13: WT.

3.4 Zugänglichkeitsstudien an ausgewählten Positionen im mitochondrialen Phosphatcarrier

Da bis heute keine hochaufgelösten 3D-Strukturen von sekundären Transportern existieren, müssen strukturelle und funktionelle Informationen dieser Carrier noch immer mit Hilfe molekularbiologischer, biochemischer und biophysikalischer Methoden gewonnen werden. Beim mitochondrialen Phosphatcarrier konnten erste Hinweise auf essentielle Aminosäuren für den Phosphattransport durch Erzeugung von Proteinen, bei denen gezielt die geladenen Aminosäuren durch Einzelaminosäureaustausch verändert wurden, erhalten werden. Die Gruppe um Wohlrab konnte so zeigen, daß nur die Positionen H32, D39, E126, D130 und E137 für den Transport essentiell sind (Wohlrab und Briggs, 1994). Weiterhin konnten sie mit Hilfe von Crosslink-Experimenten zeigen, daß im aktiven Dimer die beiden Cysteine an den Positionen 28 direkt miteinander verbunden werden können. Diese Aminosäuren müssen sich daher im aktiven Protein gegenüberliegen. Aus diesen Daten wurde ein Modell für den putativen Translokationsweg postuliert (Abb. 3.10). Danach wird

KAPITEL 3. ERGEBNISSE

der Translokationsweg von den Transmembrandomänen 1 und 3 der beiden Untereinheiten eines Homodimers gebildet. Dieser postulierte Translokationsweg wurde bisher jedoch nicht näher charakterisiert. Mit Hilfe der MTS-Reagentien bestand jetzt die Möglichkeit, dieses Modell zu überprüfen.

3.4.1 Charakterisierung der erzeugten rekombinanten Proteine

Zur Untersuchung des putativen Translokationsweges mit Hilfe von MTS-Reagentien wurden, ausgehend von dem Plasmid pUC18-SSS, durch ortsgerichtete Mutagenese gezielte Aminosäuresubstitutionen zu Cystein durchgeführt. Dabei wurden anhand des aufgestellten Modells verschiedene Aminosäurepositionen ausgewählt, die diesen Translokationsweg auskleiden bzw. nicht auskleiden (vgl. Abb. 3.10).

Alle isolierten Proteine konnten in Form von *inclusion bodies* im Milligramm-Maßstab erhalten werden (Abb. 3.11). Die isolierte Proteinmenge schwankte von 7 mg/l Bakterienkultur bei T43C bis zu 28 mg/l Bakterienkultur bei A25C; das Wildtypprotein wurde im Vergleich hierzu in einer Menge von 17 mg/l Bakterienkultur isoliert. Wie auch beim WT konnten sämtliche rekombinanten Proteine mit einer Reinheit von 80 % isoliert werden.

Die isolierten rekombinanten Proteine wurden in Liposomen rekonstituiert und ihre Transportaktivität im Antiportmodus untersucht (Abb. 3.12). Die verschiedenen Proteine wiesen stark unterschiedliche Transportaktivitäten auf. So zeigten S34C, SCS und SSC (vgl. auch 3.8) eine gegenüber dem cysteinfreien Protein um den Faktor 4-8 verbesserte Transportaktivität. Die Aktivität von S30C war vergleichbar mit der von SSS. Die übrigen Proteine zeigten im Vergleich zu SSS deutlich reduzierte Transportaktivitäten. Auffällig ist, daß die Aminosäurereste dieser Proteine alle zum putativen Translokationsweg zeigen. Diese geringen Transportaktivitäten könnten auf einem schlechten Einbau der Proteine in die Proteoliposomenmembran basieren. Daher wurde die Insertion der Proteine in die Proteoliposomenmembran untersucht. Es konnte festgestellt werden, daß viele dieser Proteine schlecht in die Membran eingebaut wurden. Dies gilt für S28C, H32C, M35C, D39C, T43C, E126C und D130C. Bei einem Protein-zu-Lipid Verhältnis von 3 µg Protein/mg Lipid konnte bei diesen kein signifikanter Einbau nachgewiesen werden. Erst bei einer Erhöhung des Protein-zu-Lipid Verhältnisses auf bis zu 25 µg Protein/mg Lipid konnte ein signifikanter Einbau dieser Proteine gezeigt werden. Eine Verbesserung der Transportaktivität wurde dennoch nicht gemessen. Nur S30C, S34C, SSC, SCS und A25C wurden schon bei geringeren Protein-zu-Lipid Verhältnissen

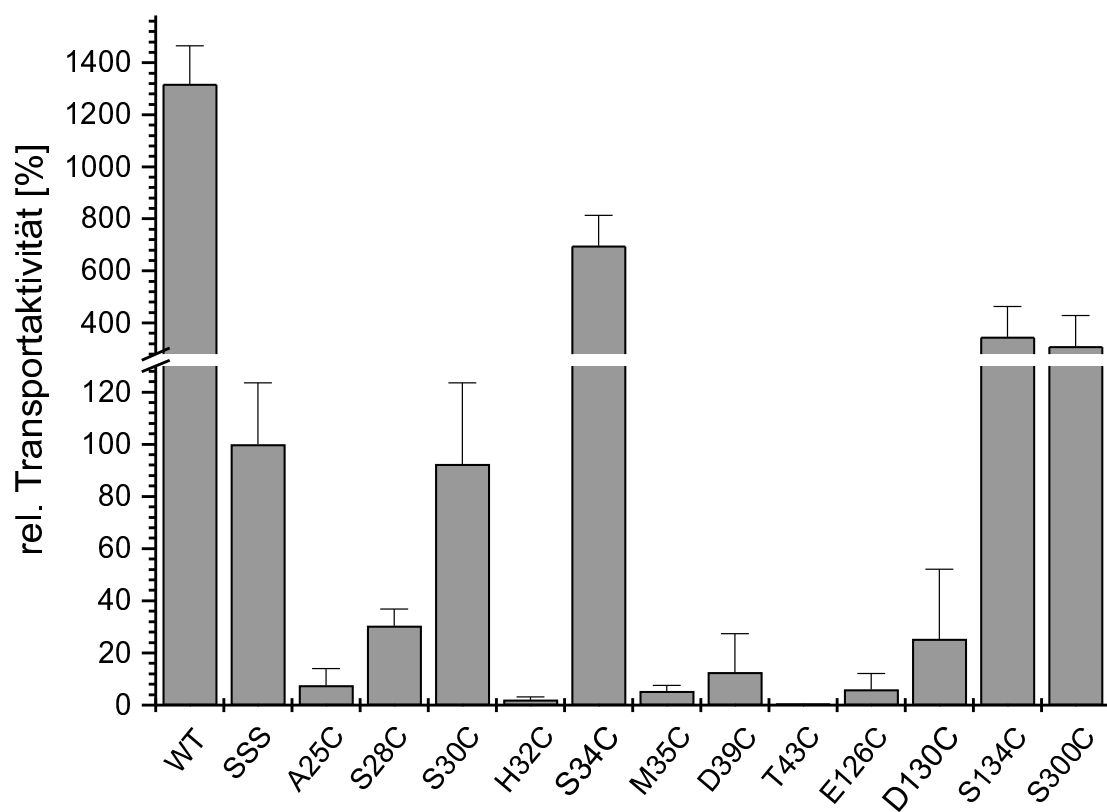


Abbildung 3.12: Relative Transportaktivitäten der erzeugten Proteine mit nur einem Cysteinrest im Vergleich zum WT und zu SSS. Die Aktivitäten wurden in Antiportmessungen mit 30 mM KP_i , pH 6,8 und 50 mM HEPES, pH 6,8 intern und extern ermittelt. Die Aktivität des cysteinfreien Proteins SSS wurde gleich 100 % gesetzt. Das verwendete Protein-zu-Lipid Verhältnis betrug 3 μ g Protein/mg Lipid.

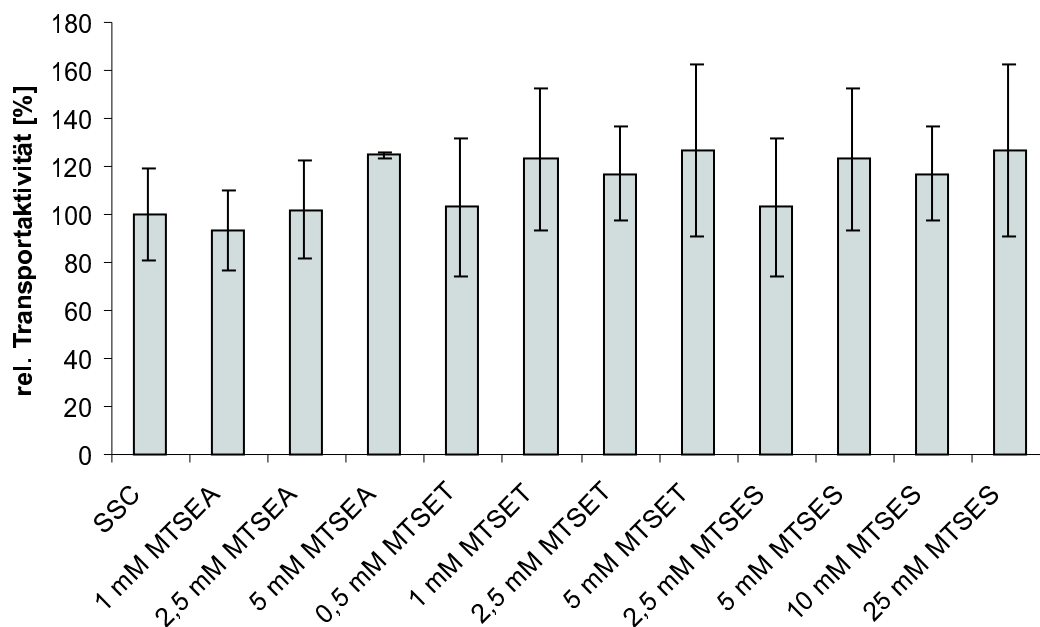
(3-10 μg Protein/mg Lipid) signifikant eingebaut (vgl auch Abb. 3.9). Insgesamt unterlag die Bestimmung der Einbaueffizienz jedoch starken Schwankungen.

3.4.2 Etablierung des MTS-Zugänglichkeitssystems

Die Etablierung des MTS-Zugänglichkeitssystems wurde mit Hilfe der transportaktiven Proteine SCS und SSC durchgeführt. Basierend auf dem Topologiemodell (Abb. 1.1 und 3.6) befinden sich die Cysteinreste der beiden Proteine in unterschiedlichen Umgebungen im gefalteten Protein. Das Cystein 300 SSC befindet sich nach diesem Modell außerhalb der Membran und sollte dadurch für alle verwendeten Reagentien gut zugänglich sein. Ein Einfluß auf die Aktivität aufgrund der Bindung der MTS-Reagentien ist nicht zu erwarten, da dieses Cystein weit vom putativen Translokationsweg entfernt ist. Das Cystein 134 von SCS befindet sich im Gegensatz zum Cystein 300 in der Membran. Nach Abb. 3.10 scheint es aber nicht am Translokationsweg beteiligt zu sein. Nach diesem Modell befindet es sich an der Berührungsfläche zweier Helices, so daß die Zugänglichkeit für die membranimpermeablen MTS-Reagentien signifikant eingeschränkt sein sollte. Da dieses Cystein im rekonstituierten System mit Mersalylsäure reagieren und dadurch der Phosphattransport inhibiert werden kann, sollte eine Bindung der MTS-Reagentien an diesen Cysteinrest ebenfalls eine Hemmung des Transports zur Folge haben. Der Nachweis der Bindung der MTS-Reagentien erfolgte nach der Reaktion mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein-5-Maleimid, der ebenfalls spezifisch mit Thiolgruppen reagiert. Im Fall einer vollständigen Absättigung aller Thiolgruppen im Protein mit dem eingesetzten MTS-Reagenz, wenn also alle Thiolgruppen gut zugänglich sind, sollte keine Bindung des anschließend zugegebenen Fluorescein-5-Maleimids an das Protein erfolgen. Daher sollte sich bei diesen Proteinen keine Fluoreszenz nachweisen lassen. Für den Fall, daß der untersuchte Aminosäurerest für das MTS-Reagenz nicht zugänglich ist, sollte durch eine deutliche Fluoreszenz des Fluorescein-5-Maleimids im Gel die freie Thiolgruppe angezeigt werden.

Zunächst wurden die optimalen Konzentrationen für die Reaktion der einzelnen MTS-Reagentien ermittelt. Dazu wurden SSC und SCS in *E. coli* Liposomen rekonstituiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen der drei MTS-Reagentien zwischen 0,5 mM bis 25 mM für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden ihre Transportaktivitäten untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.13A und 3.14A dargestellt. Wie erwartet zeigte SSC nach Reaktion mit den MTS-Reagentien keine veränderte Transportaktivität (Abb. 3.13A). In einem solchen Fall ist es sehr wichtig, die Bindung der MTS-Reagentien an die Thiolgruppe des Cysteins nachzuweisen. In Abb. 3.13B ist

A



B



C

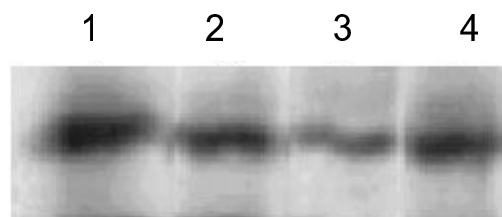


Abbildung 3.13: **A:** Relative Transportaktivitäten des Proteins SSC mit verschiedenen Konzentrationen von MTSEA, MTSET und MTSES. Die Werte wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils in Doppelbestimmungen ermittelt. Die Aktivität des unbehandelten SSC wurde gleich 100 % gesetzt. **B:** Fluoreszenz des mit Fluorescein-5-Maleimid markierten SSC nach SDS-PAGE. In Spur 1 ist SSC ohne MTS-Reagentien aufgetragen. In Spur 2 ist SSC nach 15 minütiger Inkubation mit 2,5 mM MTSEA, in Spur 3 mit 1 mM MTSET und in Spur 4 mit 10 mM MTSES aufgetragen. **C:** Silberfärbung des in B dargestellten Gels.

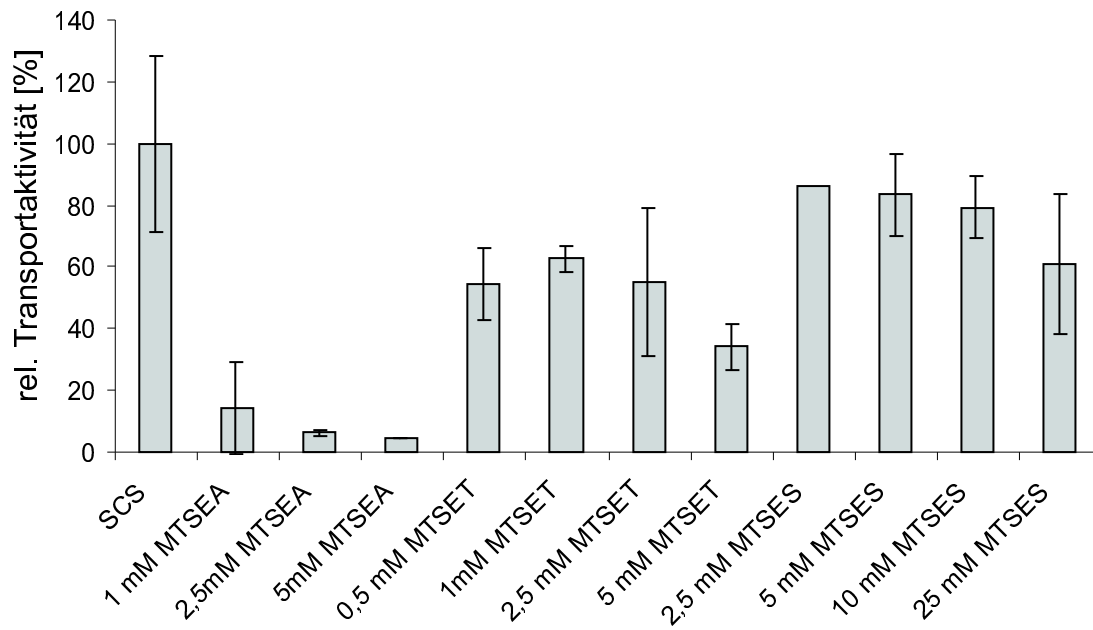
das Gel des mit Fluorescein-5-Maleimid markierten SSC-Proteins dargestellt. Die Fluoreszenz ist nur in Spur 1, der unbehandelten Kontrolle, erkennbar. Auf dem entsprechend gezeigten, mit Silber gefärbten Gel sind für alle Spuren ungefähr gleiche Mengen an Protein zu erkennen. Dies zeigt, daß das Cystein 300 für alle drei MTS-Reagentien gut zugänglich ist.

Bei SCS konnte bei einer Inkubation mit MTSEA ab einer Konzentration von 2,5 mM eine nahezu vollständige Inhibition der Transportaktivität (8 % Restaktivität) beobachtet werden (Abb. 3.14A). Die Reagentien MTSET und MTSES reduzierten nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten die Transportaktivität um 30-40 %. Der Nachweis der Bindung der MTS-Reagentien erfolgte auch hier mit Hilfe von Fluorescein-5-Maleimid. Die Abb. 3.14B zeigt die Fluoreszenz des mit Fluorescein-5-Maleimid markierten SCS-Proteins ohne MTS, mit 2,5 mM MTSEA, 1 mM MTSET und 10 mM MTSET. Das Cystein 134 reagierte vollständig mit MTSEA. In den Spuren 3 und 4 sind die Fluoreszenzsignale gegenüber der ersten Spur (Kontrolle) um ca. 50 % abgeschwächt. Dies zeigte, daß die Thiolgruppe des Cystein 134 für die membranimpermeablen Reagentien MTSET und MTSES innerhalb von 15 Minuten schwerer zugänglich war. Mit Hilfe des mit Silber gefärbten Gels (Abb. 3.14C) konnte gezeigt werden, daß in allen Proben gleiche Mengen an Protein auf das Gel aufgetragen wurden, so daß die unterschiedlich starke Fluoreszenz auf die Reaktion der Cysteine mit den MTS-Reagentien zurückgeführt werden kann.

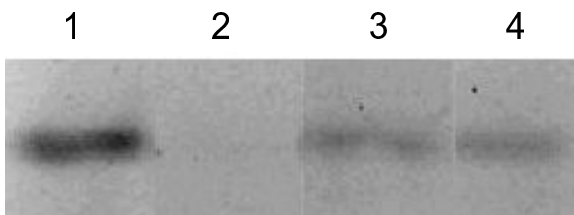
Zur Kontrolle wurden die Proteine bereits im solubilisierten Zustand mit den MTS-Reagentien behandelt und anschließend rekonstituiert. Hierbei sollten alle Cysteine komplett abreagieren, und somit war bei allen Proben eine fast vollständige Hemmung der Transportaktivität zu erwarten. Nach Rekonstitution in Liposomen und Messung der Transportaktivität konnte wie erwartet festgestellt werden, daß bei vollständiger Bindung mit MTSET und MTSES ebenfalls eine nahezu 100 %ige Inhibition der Transportaktivität auftritt (vgl. Tab. 3.2).

Die unterschiedlichen Effekte der Bindung des membrangängigen MTSEA bzw. der membranimpermeablen Reagentien auf die Transportaktivität von SCS könnte darauf zurückzuführen sein, daß aufgrund unterschiedlicher Faltungen des Proteins in den Proteoliposomen einzelne Cysteinreste an der Position 134 nicht erreicht werden können. Um dies zu untersuchen, wurden Proteoliposomen mit MTSET bzw. MTSES für 15 Minuten vorinkubiert, und nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde MTSEA zugesetzt. Hier konnte eine signifikante Abnahme der Aktivität auf 7-10 % nachgewiesen werden, was mit dem Ergebnis der alleinigen Inkubation von SCS mit MTSEA vergleichbar war (vgl. Tab. 3.2). Für das membranpermeable

A



B



C

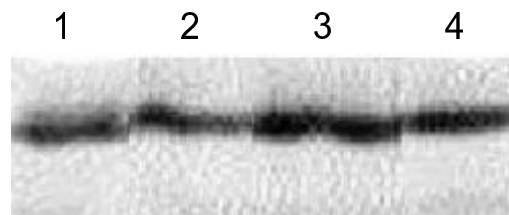


Abbildung 3.14: **A:** Relative Transportaktivitäten des Proteins SCS mit verschiedenen Konzentrationen von MTSEA, MTSET und MTSES. Die Werte wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils in Doppelbestimmung ermittelt. Die Aktivität des unbehandelten SCS wurde gleich 100 % gesetzt. **B:** Fluoreszenz des mit Fluorescein-5-Maleimid markierten SCS nach SDS-PAGE. In Spur 1 ist SCS ohne Vorbehandlung mit MTS-Reagentien aufgetragen. In Spur 2 ist SCS nach 15 minütiger Inkubation mit 2,5 mM MTSEA, in Spur 3 mit 1 mM MTSET und in Spur 4 mit 10 mM MTSES aufgetragen. **C:** Silberfärbung des in B dargestellten Gels.

Reagenz MTSEA waren also alle Cysteinreste gut zugänglich. Ein entsprechendes Experiment, bei dem nach Vorinkubation mit MTSET bzw. MTSES die membranimpermeablen Reagentien MTSES bzw. MTSET zugesetzt wurden, ergab keine Änderung der Transportaktivität im Vergleich zu den einfach behandelten Proben. Dies bedeutet, daß nur ein Teil des vorhandenen Cystein 134 mit den membranimpermeablen Reagentien reagiert hat. Somit ist diese Position für die membranimpermeablen Reagentien schwer zugänglich. In Tab. 3.2 sind die Ergebnisse dieser Aktivitätsmessungen zusammengefaßt.

Tabelle 3.2: Abhängigkeit der Phosphattransportaktivität von SCS von den zugesetzten MTS-Reagentien; gemessen im Austauschmodus. Die eingesetzten Konzentrationen der MTS-Reagentien betragen für MTSEA 2,5 mM, MTSET 1 mM und MTSES 10 mM. Die MTS-Reagentien wurden im Fall von SCS (solub.) zum solubilierten Protein, sonst zum rekonstituierten Protein gegeben.

Reagenz	Restaktivität [%]
SCS	100
SCS + MTSEA	8
SCS + MTSET	37
SCS + MTSES	32
SCS + MTSET+ MTSET	35
SCS + MTSES+ MTSET	35
SCS + MTSET+ MTSEA	10
SCS + MTSES+ MTSEA	7
SCS (solub.)+ MTSEA	5
SCS (solub.) + MTSET	8
SCS (solub.) + MTSES	3

Die Variation der Konzentration der einzelnen MTS-Reagentien zeigte bei SSC und SCS keinen signifikanten Effekt auf die Transportaktivitäten (Abb. 3.13 und 3.14). Deshalb wurden für die weiteren Experimente Konzentrationen ausgewählt, die im mittleren Bereich der getesteten Konzentrationen lagen. Für MTSEA wurde eine Konzentration von 2,5 mM, für MTSET eine Konzentration von 1 mM und für MTSES eine Konzentration von 10 mM gewählt. Diese Konzentrationen der MTS-Reagentien entsprechen den in der Literatur angegebenen Konzentrationen (Akabas *et al.*, 1992; Xu und Akabas, 1993; Stauffer und Karlin, 1994; Javitch *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2000). Die drei MTS-Derivate besitzen unterschiedliche Reaktivitäten mit freien Thiolen (Roberts *et al.*, 1986; Stauffer und Karlin, 1994), welche durch die Wahl der unterschiedlichen Konzentrationen ausgeglichen werden sollten.

3.4.3 Untersuchung der Zugänglichkeiten der erzeugten rekombinanten Proteine

Mit diesem etablierten System sollte nun die Zugänglichkeit aller erzeugten rekombinanten Proteine, die nur einen Cysteinrest im Protein besitzen, für die MTS-Reagentien analysiert werden. Zunächst wurde zur Kontrolle die Transportaktivität des cysteinfreien Proteins SSS nach Behandlung mit den MTS-Reagentien untersucht. Dazu wurde das Protein in Liposomen rekonstituiert. Es konnte wie erwartet bei einer 15-minütigen Inkubation mit den Reagentien keine Änderung der Transportaktivität nachgewiesen werden. Auch eine Inkubation dieses Proteins im solubilisierten Zustand mit den MTS-Reagentien mit anschließender Rekonstitution und Transportmessung zeigte keine Verringerung der Aktivität.

Zur Untersuchung der Zugänglichkeit des Cystein 28 der ersten Transmembranhelix wurde CSS erzeugt. Das isolierte Protein zeigte eine geringe Transportaktivität im Antiportmodus (vgl. Abb. 3.12), so daß Effekte aufgrund der Bindung der MTS-Reagentien auf die Transportaktivität nicht nachgewiesen werden konnten. Da, wie bereits gezeigt, das Cystein 300 mit den MTS-Reagentien vollständig reagiert hatte und sich durch die Reaktion keinerlei Effekte bei den Aktivitätsmessungen ergaben, konnte zur Untersuchung der Zugänglichkeit des Cystein 28 das transportaktive Protein CSC herangezogen werden (vgl. Abb. 3.8). Daher sind dann alle möglichen Veränderungen der Aktivität, die nach Inkubation mit den MTS-Reagentien beobachtet werden können, auf eine Reaktion mit dem Cystein 28 zurückzuführen. Dieses Protein wurde mit einem Protein-zu-Lipid Verhältnis von 7 μg Protein/mg Lipid rekonstituiert und die Zugänglichkeit mit den MTS-Reagentien untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, daß das Cystein 28 innerhalb einer Inkubationszeit von 15 Minuten für alle MTS-Reagentien vollständig zugänglich war (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Bindung von MTSEA bzw. MTSES bewirkte eine vollständige Inhibition der Transportaktivität, während bei MTSES nur eine Reduktion der Aktivität um 80 % beobachtet werden konnte. Wurde CSC im solubilierten Zustand mit den verschiedenen MTS-Reagentien behandelt, anschließend rekonstituiert und die Transportaktivität bestimmt, so wurden bei allen MTS-Reagentien nur noch 10 % Restaktivität beobachtet (Ergebnisse nicht gezeigt).

Eine Bestimmung der Zugänglichkeiten der übrigen rekombinanten Proteine ergab, daß alle Cysteinreste innerhalb von 15 Minuten Inkubationszeit für die MTS-Reagentien vollständig zugänglich waren (Ergebnisse nicht gezeigt). Daher wurde das Zeitfenster der MTS-Reaktion deutlich verringert. Die Zugänglichkeit der Cysteinreste wurde jetzt nach 30 Sekunden, 1 Minute, 2 Minuten und 5 Minuten untersucht. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-5-Maleimid wurde die Bin-

dung der MTS-Reagentien an die untersuchten Positionen verifiziert. Die Messung der Transportaktivität der behandelten Proben erfolgte nach 5 Minuten Inkubation mit den MTS-Reagentien. Insgesamt gestaltete sich die Messung der Aktivitäten dieser Proteine schwierig, da sie nur geringe Transportaktivitäten aufwiesen (vgl. Abb. 3.12). Es traten große Schwankungen in den Aktivitäten auf, weshalb hier nur exemplarisch auf einige Aktivitäten näher eingegangen werden soll. Auf Aktivitätsebene zeigten nur wenige der rekombinanten Proteine veränderte Transportaktivitäten nach Inkubation mit den MTS-Reagentien. SSC zeigte, wie schon unter 3.4.2 beschrieben, bei einer Inkubation von 5 Minuten keine Änderung auf Aktivitätsebene (vgl. Abb. 3.15). Die Transportaktivität schwankte um 100 %. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für D130C und A25C erhalten werden. Interessant ist das Ergebnis bei SCS, da hier eine deutliche Inhibition der Transportaktivität nach Inkubation mit MTS-Reagentien für 15 Minuten sichtbar war. Der Cysteinrest dieses Proteins war für MTSEA vollständig zugänglich, während er für MTSET und MTSES schwer zugänglich war (vgl. Abb. 3.14). Bei einer Inkubationszeit mit den MTS-Reagentien von insgesamt 5 Minuten konnte jetzt gezeigt werden, daß die Transportaktivität konstant um 100 % schwankte (Abb. 3.15). Dies korreliert mit den unter 3.16 dargestellten Zugänglichkeitsmessungen, da hier gezeigt werden konnte, daß der Cysteinrest dieses Proteins innerhalb von 5 Minuten nicht mit den MTS-Reagentien reagiert. Deutliche Effekte auf die Transportaktivität waren nur bei D39C zu erkennen. Es konnte nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten und anschließender Messung der Transportaktivität eine signifikante Steigerung der Transportaktivität um 50 % bei der mit 2,5 mM MTSEA inkubierten Probe und um 100 % bei der mit 10 mM MTSES behandelten Probe beobachtet werden. Die mit 1 mM MTSET behandelte Probe zeigte die gleiche Aktivität wie die unbehandelte Probe (vgl. Abb. 3.15). Bei H32C waren nur geringe Effekte zu beobachten, die aber auch nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten mit den MTS-Reagentien nachgewiesen werden konnten. Die Aktivität der mit MTSEA und MTSET behandelten Proben stieg bis um ca. 50 % an, während die Aktivität der mit MTSES behandelten Probe so wie die der Kontrolle um 100 % Transportaktivität schwankte.

Die Ergebnisse der Zugänglichkeitsstudien mit Hilfe der Fluoreszenz- bzw. mit Silber gefärbten Gele sind in Abb. 3.16 zusammengestellt. Für SSC konnte gezeigt werden, daß der Cysteinrest innerhalb von 30 Sekunden für alle MTS-Reagentien vollständig zugänglich war, was mit den bereits vorgestellten Ergebnissen unter 3.4.2 korreliert. Weitere Proteine, deren Cysteinreste nach dieser Untersuchung ebenfalls gut zugänglich waren, sind H32C und M35C. H32C war innerhalb von 30 Sekunden für das positiv geladene Reagenz MTSET und das membranpermeable

KAPITEL 3. ERGEBNISSE

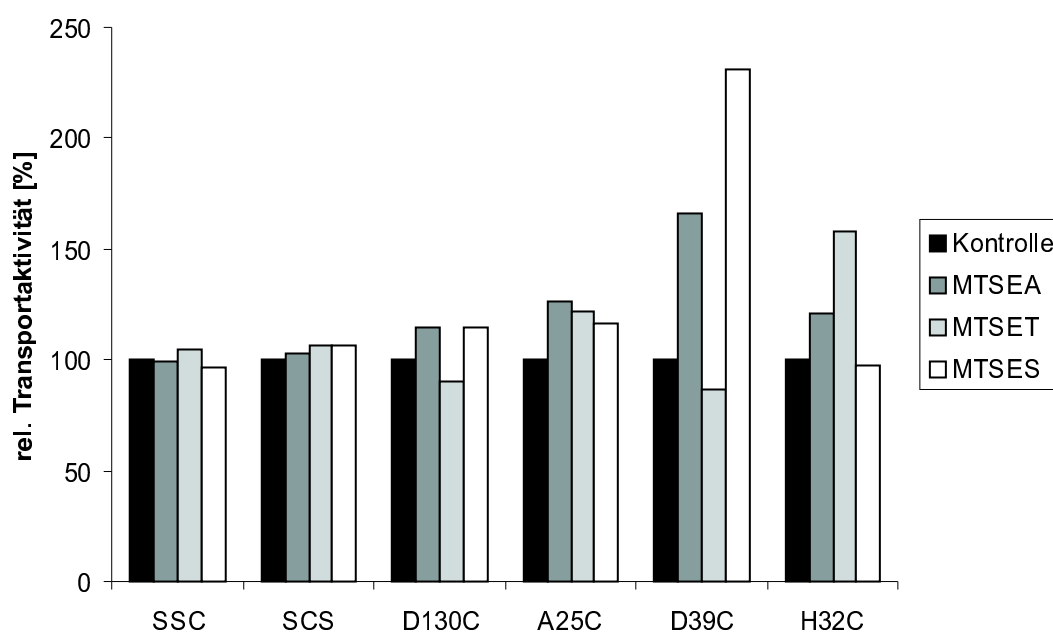


Abbildung 3.15: Vergleich der relativen Transportaktivitäten ausgewählter rekombinanter Proteine vor und nach Behandlung mit den MTS-Reagentien nach 5 Minuten Reaktionszeit. Die MTS-Reaktion wurde durch Gabe von DTT gestoppt. Anschließend wurde, wie unter 2.4.3.5 beschrieben, die Transportaktivität im Antiportmodus ermittelt. Die nicht mit MTS-Reagentien behandelten Proben (Kontrollen) wurden gleich 100 % gesetzt. Es wurden zwei Doppelbestimmungen durchgeführt.

Reagenz MTSEA zugänglich. Das negativ geladene Reagenz MTSES konnte auch nach 5 Minuten Reaktionszeit nicht mit dem Thiolrest des Cysteins reagieren, was durch das deutliche Fluoreszenzsignal gezeigt werden konnte. Daß das Ausbleiben eines Signals bei den mit MTSEA und MTSET behandelten Proben nicht auf fehlendes Protein zurückzuführen ist, konnte mit Hilfe des mit Silber gefärbten Gels nachgewiesen werden. Auch bei der Position M35C war in allen Spuren gleich viel Protein aufgetragen worden. Auf dem Fluoreszenzgel hingegen waren nur Signale für die Kontrolle und für die mit MTSET behandelte Probe zu erkennen. Diese Position war daher für das positiv geladene MTSET schwer zugänglich, während die Reagentien MTSEA und MTSES innerhalb von 30 Sekunden mit diesem Cystein reagierte.

Proteine, deren Cysteinrest ebenfalls zugänglich war, waren D130C, E126C, CSS, D39C und T43C. S28C zeigte innerhalb von 5 Minuten Inkubationszeit Zugänglichkeit für MTSEA und MTSES, während diese Position auch nach 5 Minuten Inkubationszeit für MTSET kaum zugänglich war. Das schwache Fluoreszenzsignal der Kontrolle (nicht mit MTS-Reagentien behandelte Probe) war auf geringere Proteinkonzentrationen zurückzuführen, wie man über das mit Silber gefärbte Gel nachweisen konnte. Es war hier deutlich weniger Protein vorhanden. Auch D130C und E126C waren innerhalb von 5 Minuten Inkubationszeit für das membranpermeable Reagenz MTSEA sowie das negativ geladene Reagenz MTSES zugänglich. Diese Positionen waren allerdings innerhalb von 5 Minuten Inkubationzeit nicht für das positiv geladene MTSET zugänglich. Ein ähnliches Bild wurde für T43C erhalten. Nach dem Topologiemodell (Abb. 1.1) befindet sich T43C nicht mehr in der transmembranen Region der ersten Helix. Somit wäre es nicht am Translokationsweg beteiligt und sollte für die hydrophilen MTS-Reagentien nur dann zugänglich sein, wenn diese durch den Translokationsweg hindurch gelangen können. Das membranpermeable Reagenz MTSEA kann jedoch auch von der Transseite mit freien Thiolgruppen reagieren. Auf dem gezeigten Fluoreszenzgel ist für die mit MTSEA behandelten Proben kein Signal mehr zu erkennen. T43C ist somit für das membranpermeable Reagenz zugänglich. Für die mit 10 mM MTSES behandelten Proben ist eine mit der Zeit abnehmende Intensität der Fluoreszenzbande zu beobachten. Nach 5 Minuten Reaktionszeit kann MTSES mit der Thiolgruppe des T43C vollständig reagieren. Nur für das positiv geladene Reagenz ist diese Position nicht zugänglich. Das sehr schwache Fluoreszenzsignal der Kontrolle korreliert mit dem sehr schwachen Signal der Silberfärbung.

Für D39C konnte gezeigt werden, daß diese für alle drei MTS-Reagentien schwer zugänglich ist. Dies ist verwunderlich, da diese Aminosäure nach dem aufgestellten

KAPITEL 3. ERGEBNISSE

Modell von Wohlrab (Abb. 3.10) direkt zum putativen Translokationsweg zeigt. Selbst nach 5 Minuten Reaktionszeit sind bei allen Reagentien noch immer deutliche, aber etwas schwächere Fluoreszenzsignale als zu Beginn der Reaktion zu erkennen. Lediglich bei den mit MTSEA behandelten Proben ist eine deutlichere Abnahme des Fluoreszenzsignals zu erkennen. Ein ähnliches Bild konnte für A25C erhalten werden.

Proteine, die nach dem Modell von Wohlrab (Abb. 3.10) schwer zugänglich sein sollten, sind S34C und S30C. Beide zeigen vom putativen Translokationsweg weg und ragen somit ins Proteininnere oder wechselwirken mit der Membran. Mit den jetzt durchgeführten Zugänglichkeitsmessungen konnte die Vermutung über die erschwerte Zugänglichkeit bestätigt werden. Auf den Fluoreszenzgelen konnte bei diesen Proteinen keine bzw. eine nur sehr geringe Abnahme der Fluoreszenz mit der Zeit beobachtet werden. Selbst nach 5 Minuten Reaktionszeit sind diese Positionen für die drei MTS-Reagentien nicht zugänglich. Ein Vergleich der Fluoreszenzgele dieser Proteine mit den entsprechenden mit Silber gefärbten Gelen zeigt, daß die aufgetragenen Proteinmengen mit den Fluoreszenzsignalen korrelieren.

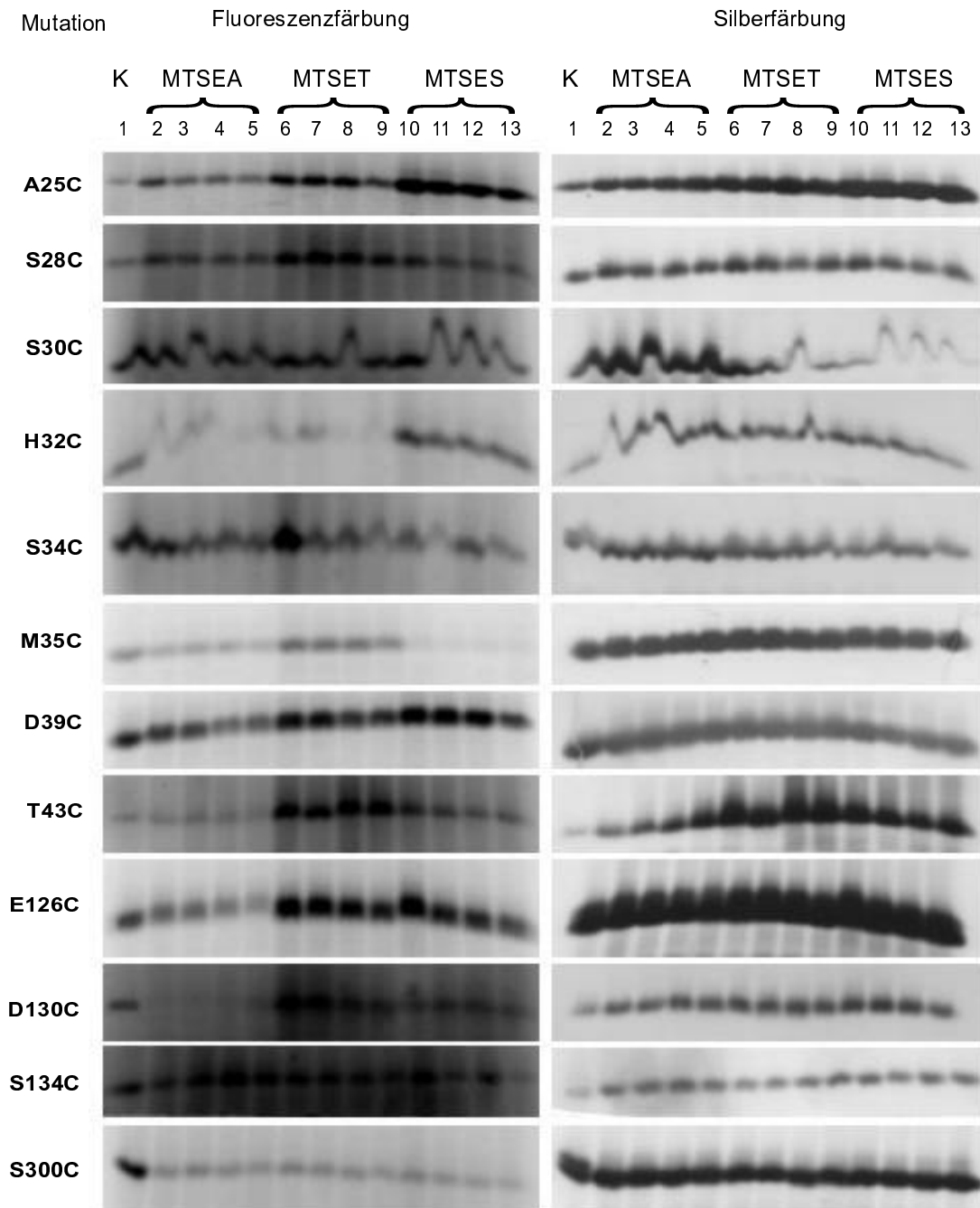


Abbildung 3.16: Untersuchung der Zugänglichkeit von verschiedenen Positionen der ersten und dritten Helix des PiC aus *S. cerevisiae*. Die unterschiedlichen Positionen sind in der ersten Spalte unter Mutation zusammengefaßt. Die entsprechenden Fluoreszenz- bzw. mit Silber gefärbten Gele sind rechts daneben abgebildet. In Spur 1 ist immer die Kontrolle (nicht mit MTS-Reagenz behandelt) aufgetragen. In den Spuren 2, 3, 4 und 5 ist das mit MTSEA behandelte, rekonstituierte Protein nach 30 Sekunden, 1 Minute, 2 Minuten und 5 Minuten Reaktionszeit aufgetragen. In den Spuren 6, 7, 8 und 9 befinden sich die mit MTSET behandelten Proben nach 30 Sekunden, 1 Minute, 2 Minuten und 5 Minuten Reaktionszeit. Eine entsprechende Anordnung für MTSES findet sich in den Spuren 10, 11, 12 und 13.

4 Diskussion

4.1 Optimierung der Rekonstitution und Charakterisierung des Meßsystems

Da mit dem Rekonstitutions- und Meßsystem, das bisher zur Untersuchung des mitochondrialen Phosphatcarriers aus Rinderherzen und aus Hefe diente, nur geringe und schlecht reproduzierbare Transportaktivitäten gemessen werden konnten, war eine Optimierung dieses Systems notwendig. Dabei wurde das Meßsystem von Francois Deuber (Deuber, 2000) durch die Umstellung von der Gabelmethode (Dawson *et al.*, 1987) auf die Verwendung von Mehrkanalpipetten und dem Einsatz von Mikrotiterplatten derart optimiert, daß sowohl die Handhabung als auch der Probendurchsatz deutlich verbessert wurden. Das Rekonstitutionssystem mußte so modifiziert werden, daß die gemessene Transportaktivität um zwei bis drei Größenordnungen auf über 10 U/mg erhöht wird. Dies konnte sowohl durch die Verwendung von *E. coli* Lipiden, die ca. 10 % Cardiolipin enthalten, als auch von selbst isolierten Truthahnlipiden, die mit 20 mg Cardiolipin/g Lipid supplementiert waren, erreicht werden. Der Einfluß dieses Phospholipids auf die mitochondrialen Carrier wurde schon seit langem intensiv in der Literatur diskutiert. So konnte für den Citratcarrier als erstes gezeigt werden, daß Cardiolipin einen stimulierenden Effekt während der Rekonstitution ausübt (Stipani *et al.*, 1980; Krämer und Palmieri, 1989). Auch für den Dicarboxylat-, den Carnitin- und den Phosphatcarrier konnte ein positiver Effekt dieses Phospholipids auf die Transportaktivität beobachtet werden (Barnerjee und Racker, 1979; Mende *et al.*, 1983). Diese Untersuchungen wurden jedoch beim Phosphatcarrier durch die Gruppe um Wohlrab in Frage gestellt, da sie durch Zugabe von Cardiolipin zu PC-haltigen Liposomen nur einen geringen stimulierenden Effekt nachwiesen (Wohlrab *et al.*, 1984; Krämer und Palmieri, 1989). Die Beobachtungen der Transportstimulation durch Cardiolipin wurden hingegen durch Experimente gestützt, die mit den Cardiolipin-spezifischen Inhibitoren Doxorubicin und Daunomycin durchgeführt wurden. Diese Untersuchungen bestätigten die Stimulation des Phosphatcarriers durch Zugabe von Cardiolipin zu Proteoliposo-

men und deren Umkehrung durch Zugabe dieser Inhibitoren (Cheneval *et al.*, 1983; Müller *et al.*, 1984). Für den Nukleotidcarrier konnte sogar gezeigt werden, daß dieser sechs fest gebundene Moleküle Cardiolipin im solubilisierten Zustand besitzt (Beyer und Klingenberg, 1985). Zusammengenommen konnte die Wichtigkeit dieses Phospholipids für viele mitochondriale Carrier gezeigt werden. Da sowohl mit *E. coli* Lipiden als auch mit den selbst isolierten Truthahnlipiden, die mit Cardiolipin supplementiert wurden, die gleiche Aktivität gemessen werden konnte, kann angenommen werden, daß die Diskrepanz eines Faktors von acht bis zwölf zu den publizierten Aktivitäten von homolog exprimierten Protein auf systematische Unterschiede der Experimente zurückzuführen ist. Da bei Verwendung von *E. coli* Lipiden geringere Schwankungen bei den Aktivitätsmessungen auftraten, wurden diese für die Rekonstitution und Transportmessung verwendet.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit das Verfahren zur reversiblen Inaktivierung des Phosphatcarriers optimiert. Diese Methode ermöglichte die Anwendung chromatographischer Verfahren zur freien Variation der externen Phosphatkonzentration bei konstanter interner Phosphatkonzentration. Es konnte gezeigt werden, daß der WT-PiC im P_i/OH^- -Antiport eine um 70 % verringerte Transportaktivität im Vergleich zur Transportaktivität im P_i/P_i -Antiport aufweist (Stappen, 1994). Die maximale Transportaktivität des P_i/P_i - Antiports konnte in den verwendeten *E. coli* Liposomen zu ca. 10 U/mg Protein ermittelt werden, während im P_i/OH^- -Antiport nur eine Aktivität von 0,9 U/mg Protein gemessen wurde. Dieses Verhältnis von 10 % der Geschwindigkeit im P_i/OH^- -Antiport im Vergleich zum P_i/P_i -Antiport entspricht nicht den bekannten Daten. Jedoch konnte gezeigt werden, daß die maximale Transportaktivität im P_i/P_i -Antiport nach Inhibition mit Mersalylsäure, Gelfiltration und Start der Transportreaktion durch Gabe von DTT, also gleicher Vorbehandlung wie bei den Rücktauschexperimenten, drastisch auf 1,5 U/mg Protein sinkt. Der Aktivitätsverlust, der bei dieser Behandlung auftrat, konnte auf die Gelfiltration zurückgeführt werden. Die genaue Ursache ist jedoch nicht klar. Ein Vergleich dieser Transportaktivität mit der erzielten Aktivität im P_i/OH^- -Antiport zeigt ein Verhältnis von 60 %, was vergleichbar mit den bereits veröffentlichten Daten ist.

Das optimierte Meßsystem wurde in Bezug auf Innenvolumina, K_M und V_{max} -Werte und die Abhängigkeit der Aktivität vom Protein-zu-Lipid Verhältnis charakterisiert. Der K_M -Wert weist keine außergewöhnlichen Abweichungen von den bisher veröffentlichten Daten auf. Der ermittelte K_M -Wert in diesem System ist etwa viermal so hoch wie die ermittelten externen K_M -Werte für den heterolog exprimierten Carrier aus Hefe in dem Rekonstitutionssystem nach Wohlrab, den

KAPITEL 4. DISKUSSION

rekonstituierten Carrier aus Rinderherzmitochondrien und in intakten Mitochondrien (Stappen, 1994; Coty und Petersen, 1974; Ligeti *et al.*, 1985). Demnach kann man noch nicht von einem drastisch veränderten K_M -Wert sprechen, wie er sich z. B. durch strukturelle Veränderungen einer Substratbindungsstelle ergeben würde. Jedoch kann eine Veränderung des K_M -Wertes aufgrund der veränderten Lipidumgebung in *E. coli* Liposomen im Vergleich zur Zusammensetzung der inneren Hefemitochondrienmembran oder zu Liposomen aus Phosphatidylcholin nicht ausgeschlossen werden. Die ermittelten Innenvolumina zeigten das erwartete Verhalten, daß mit zunehmender Proteininkorporation in Liposomen das Innenvolumen sinkt. Auch bei der Bestimmung der Abhängigkeit der Aktivität von dem eingestellten Protein-zu-Lipid Verhältnis konnte ein ähnliches Ergebnis erhalten werden, wie es schon für den mitochondrialen Phosphatcarrier aus Rinderherzen publiziert wurde (Stappen und Krämer, 1993). Bei einem Vergleich mit anderen mitochondrialen Carriern fällt auf, daß das festgestellte optimale Protein-zu-Lipid Verhältnis von ca. 1 μg Protein/mg Phospholipid auch für den Carnitincarrier publiziert wurde (Invideri *et al.*, 1991a). Für den ADP/ATP-Carrier liegt dieses Verhältnis dagegen um einen Faktor 10, bei dem Asp/Glu-Carrier um den Faktor 100 über dem ermittelten Wert für den Phosphatcarrier (Krämer und Heberger, 1986).

Mit dem neuen Rekonstitutions- und Meßsystem steht eine experimentelle Anordnung zur Verfügung, die einen hohen Durchsatz an fehlerarmen und reproduzierbaren Transportmessungen mit dem mitochondrialen Phosphatcarrier unter vereinfachten Arbeitsbedingungen gestattet. Das neue System bietet eine gute Grundlage für eine weitergehende Charakterisierung des mitochondrialen Phosphatcarriers.

4.2 Zugänglichkeitsstudien am mitochondrialen Phosphatcarrier

Wie für die meisten sekundären Transporter liegen auch für den mitochondrialen Phosphatcarrier keine dreidimensionalen Strukturdaten vor. Die bisherigen Informationen über strukturelle und funktionelle Eigenschaften beruhen auf biochemischen, biophysikalischen und molekularbiologischen Untersuchungen. Über Mutationsstudien konnten sowohl in Ionenkanälen (Akabas *et al.*, 1992, 1994a, 1994b; Javitch *et al.*, 1995; Xu und Akabas, 1993, 1996) als auch in sekundären Transportern (Frillingos *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 1993; Kaplan *et al.*, 2000, Sahin-Toth *et al.*, 1993, Briggs *et al.*, 1996) Aminosäurereste identifiziert werden, die für den Transport essentiell sind. Bei der Lactose Permease aus *E. coli* ergab eine solche Untersuchung, daß von 402 Aminosäuren nur sechs Reste für den Transport essentiell

sind (Frillingos *et al.*, 1998). Erste Studien am mitochondrialen Phosphatcarrier ergaben, daß Mutationen an fünf der geladenen Aminosäuren (H32, D39, E126, D130 und E137) den Transport inhibieren (Phelps *et al.*, 1996). Aufbauend auf diesen Studien und auf Crosslink-Experimenten, die belegten, daß die beiden Cysteine an den Positionen 28 im aktiven Dimer direkt miteinander verbunden werden können (Phelps und Wohlrab, 1993), wurde das in Abb. 3.10 dargestellte Helixmodell entwickelt. Basierend auf diesem Modell sollte ein System etabliert werden, mit dem die Zugänglichkeiten bestimmter Aminosäurereste im PiC_{SC} für MTS-Reagentien und deren Einfluß auf die Transportaktivität untersucht werden konnte.

4.2.1 Charakterisierung der erzeugten rekombinanten Proteine

Zur Bestimmung von Zugänglichkeiten mit Hilfe von MTS-Reagentien war die Konstruktion von Proteinen, die nur ein Cystein enthalten, notwendig. Ausgangspunkt zu deren Erzeugung war die Konstruktion eines cysteinfreien Proteins. Dabei wurden alle Cysteine gegen Serin ausgetauscht. Serin ist im Vergleich zu Cystein isosterisch; es besitzt ähnliche helixbildende Eigenschaften wie Cystein, und es kann ebenfalls Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden (Xu *et al.*, 2000). An vielen anderen Transportern konnte gezeigt werden, daß ein Austausch von Cystein zu Serin in der Regel nicht zu einer Störung der physiologischen Funktion führt. Jedoch wird diese Substitution nicht an allen Positionen gleich gut toleriert, wie Experimente mit der Lactose Permease aus *E. coli*, dem heterolog in *E. coli* exprimierten Citratcarrier aus *S. cerevisiae*, dem Zuckerphosphatcarrier UhpT aus *E. coli* u. a. zeigten (van Iwaarden *et al.*, 1991; Yan und Maloney, 1993; Due *et al.*, 1995; Arechaga *et al.*, 1993, Xu *et al.*, 2000). So konnte für das cysteinfreie Protein des Citratcarriers, bei der alle nativen Cysteine durch Serin ersetzt wurden, nur eine Transportaktivität von 6 % im Vergleich zum Wildtypprotein gemessen werden. Nach Substitution des Cys73 zu Val konnte eine Transportaktivität von 63 % verglichen mit der Wildtypaktivität gemessen werden (Xu *et al.*, 2000). Für das cysteinfreie Protein SSS des mitochondrialen Phosphatcarriers konnte eine geringe, aber mit 10 % Restaktivität, verglichen mit der Wildtypaktivität, signifikante Aktivität gemessen werden. Dies steht im Widerspruch zu den von Wohlrab veröffentlichten Daten, der in seinem Meßsystem für dieses Protein eine der Wildtyp-Aktivität vergleichbare Aktivität messen konnte (Phelps und Wohlrab, 1993; Schroers *et al.*, 1997). Diese gemessene Transportaktivität belegt jedoch, daß keines der Cysteine essentiell für den Phosphattransport ist.

Zur Durchführung der Zugänglichkeitsstudien wurden auf Basis des cysteinfreien Proteins SSS „Einzelcystein-Proteine“ konstruiert. Eine Substitution zu Cystein

KAPITEL 4. DISKUSSION

wird in Transportproteinen in der Regel gut toleriert (Frillingos *et al.*, 1998). Bei den erzeugten rekombinanten Proteinen konnte nur für T43C eine vollständige Inhibition des Phosphattransportes festgestellt werden, was im Einklang mit den bereits veröffentlichten Daten steht (Wohlrab und Briggs, 1994). Weiterhin zeigten viele Proteine sehr geringe Transportaktivitäten, während nur wenige der isolierten Proteine deutlich meßbare Transportaktivitäten besaßen. Die drastisch verringerte Transportaktivität von einem Teil der rekombinanten Proteine gibt einen Hinweis darauf, daß die substituierten Aminosäuren für den Transport oder die Struktur essentiell sein könnten. Auffällig ist, daß nach dem aufgestellten Modell (vgl. Abb. 3.10) die Aminosäurereste derjenigen Proteine, die nur geringe Transportaktivitäten zeigen, alle zum putativen Translokationsweg zeigen. Diese Tatsache zeigt die Wichtigkeit der beiden Transmembrandomänen für den PiC_{SC} -Translokationsmechanismus. Daher müssen hier für den Substratweg essentielle Elemente enthalten sein. Die stark verringerte Aktivität der Proteine kann so interpretiert werden, daß die Substitution an der wasserzugänglichen Oberfläche eine direkte Modifikation des Substratweges bewirkt und dadurch nur wenig toleriert wird.

4.2.2 Etablierung eines Systems zur Messung von Zugänglichkeiten mit MTS-Reagentien

Die Etablierung der Zugänglichkeitsstudien erfolgte mit den Proteinen SCS und SSC. Anhand dieser beiden Proteine konnte gezeigt werden, daß die Bindung der MTS-Reagentien unterschiedliche Effekte bezüglich der Transportaktivität ausüben kann. Während die Transportaktivität von SCS durch die Zugabe der Reagentien reduziert wurde, kam es bei SSC durch die Bindung der Reagentien nicht zu einer Beeinflussung der Transportaktivität. Daher war es notwendig, ein System zu etablieren, welches die Bindung der MTS-Reagentien auch ohne Aktivitätsänderung nachweisbar macht. Dies erfolgte mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffes Fluorescein-5-Maleimid, der ebenfalls spezifisch mit Sulfhydrylgruppen reagiert.

Da nach Gabe der MTS-Reagentien keine Änderung der Transportaktivität bei SSC auftrat, scheint das Cys300 nicht an dem Transportmechanismus beteiligt zu sein. Die beobachtete Inhibition des Phosphattransportes mit MTSEA (und auch mit Mersalylsäure) bei SCS könnte somit auf eine sterische Blockade des Transportweges zurückzuführen sein. Diese Beobachtungen setzen eine direkte Beteiligung des Cys134 am Transport nicht voraus. Aus diesen Ergebnissen wurde abgeleitet, daß in der gewählten Inkubationszeit die Zugänglichkeiten bzw. die Reaktivität dieser Cysteinreste mit den MTS-Reagentien ausreichend differenzierbar ist, so daß unter diesen Bedingungen auch die übrigen rekombinanten Proteine untersucht wur-

den. Nach Durchführung der Zugänglichkeitsstudien mit 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur konnte für alle weiteren Proteine außer SCS eine vollständige Zugänglichkeit für alle Reagentien ermittelt werden. Dieses Ergebnis würde den Schluß zulassen, daß der Phosphatcarrier sehr viele hydrophile Bereiche besitzt, die somit für alle drei MTS-Reagentien gut zugänglich sind. Ein solcher hydrophiler Bereich wäre dann nicht nur beim putativen Translokationsweg zu finden, sondern auch auf der gegenüberliegenden Seite der ersten Helix, da die Proteine S30C und S34C, bei denen eigentlich eine Anordnung zur Lipidschicht oder ins Proteininnere angenommen wurde, ebenfalls gut zugänglich waren. Unter anderem müßte gefordert werden, daß der Translokationsweg groß genug ist, so daß diese großen Reagentien problemlos hindurch diffundieren können, um auch Positionen, die auf der Matrixseite oder nahezu auf der Matrixseite liegen (T43C, D39C), gut zu erreichen. Denkbar wären auch große hydrophile Bereiche, die nicht notwendigerweise den Translokationsweg bilden. Solche Bereiche wurden allerdings in der 3D Struktur von integralen Membranproteinen bislang nicht beobachtet (Cowan *et al.*, 1992; Deisenhofer *et al.*, 1984; Doyle *et al.*, 1998; Koepke *et al.*, 1996; Kühlbrandt, 1995; Schirmer *et al.*, 1995, Tsukihara *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1991). Da die Existenz solcher hydrophiler Bereiche unwahrscheinlich ist, wurden die Inkubationszeiten mit den MTS-Reagentien gekürzt und die Experimente nochmals durchgeführt. Mit diesem neuen Ansatz konnten jetzt deutliche Unterschiede in der Zugänglichkeit für die MTS-Reagentien von den zu untersuchenden Aminosäurepositionen festgestellt werden.

4.2.3 Die Orientierung des mitochondrialen Phosphatcarriers in *E. coli* Proteoliposomen

Mit Hilfe der Zugänglichkeitsstudien konnte ein Hinweis auf die Orientierung des mitochondrialen Phosphatcarriers in den Proteoliposomen gewonnen werden. So konnte für SSC, bei dem das native Cys300 wieder in das Protein eingeführt wurde, gezeigt werden, daß diese Position schon nach 30 Sekunden fast vollständig mit allen eingesetzten MTS-Reagentien reagiert hat (vgl. Abb. 3.16). In dieser kurzen Zeit können die membranimpermeablen Reagentien MTSET und MTSES jedoch nicht durch den Translokationsweg auf die Transseite des Proteins diffundieren. Daher ist eine Orientierung dieses Cysteins nach außen, und somit eine *right side out* Orientierung des Proteins, wahrscheinlich. In dem bisher in unserer Arbeitsgruppe verwendeten Rekonstitutionssystem konnte für den PiC_{BHM} über Bisubstratkinetiken gezeigt werden (Stappen und Krämer, 1994), daß die Orien-

tierung dieses Proteins in den PC-Liposomen *right side out* ist, was der nativen Orientierung in Mitochondrien entspricht.

4.2.4 Wo befindet sich der Translokationsweg?

Die hier untersuchten Proteine zeigten ein unterschiedliches Verhalten bezüglich ihrer Reaktivität mit den MTS-Reagentien. Es existieren Proteine, deren Cysteinrest für die MTS-Reagentien schwer zugänglich ist, während der Cysteinrest von anderen Proteinen für die MTS-Reagentien leichter erreicht werden kann (vgl. Abb. 4.1). So zeigten S34C und S30C keine Reaktion mit den Reagentien unter den verwendeten Bedingungen. Sie sind also für die eingesetzten Reagentien nur schwer zugänglich. Dies läßt vermuten, daß diese beiden Positionen ins Proteininnere oder zur Lipidschicht zeigen und somit nicht am Translokationsweg beteiligt sind. Da bei einer Orientierung zur Lipidschicht eine Reaktion mit dem membrangängigen Reagenz MTSEA wahrscheinlich gewesen wäre, kann eine Anordnung dieser Position in der dreidimensionalen Struktur des Proteins zum Proteininneren vermutet werden. Eine weitere Position, die für die MTS-Reagentien ebenfalls schwer zugänglich war, ist S134C (vgl. Abb. 4.1). Über einen Zeitraum von 5 Minuten war keine Änderung in der Signalintensität der Fluoreszenz zu sehen. Selbst nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten konnten die Reagentien MTSET und MTSES nicht vollständig mit diesem Cysteinrest abreagieren. Auch A25C war für die MTS-Reagentien schwer zugänglich (Abb. 4.1). Es konnte nur eine geringe Abnahme der Fluoreszenzintensitäten bei den mit MTSEA behandelten Proben beobachtet werden. Dies spricht dafür, daß sowohl S134C als auch A25C im Inneren des Proteins verborgen und daher nur sehr schlecht für die eingesetzten Reagentien erreichbar sind. Positionen, die hingegen für die MTS-Reagentien gut zugänglich waren, sind H32C und M35C (vgl. Abb. 4.1). Es konnte hier schon nach 30 Sekunden Inkubation eine fast vollständig abgeschlossene Reaktion mit den MTS-Reagentien beobachtet werden. Dabei sind beide Positionen gleichermaßen gut für MTSEA zugänglich. Ein wichtiger Unterschied besteht jedoch in ihrer Selektivität. H32C ist als einzige hier untersuchte Position für das positiv geladene Reagenz MTSET zugänglich. Eine Reaktion mit dem negativ geladenen Reagenz konnte innerhalb von 5 Minuten nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu zeigte M35C eine hohe Selektivität für das negativ geladene Reagenz MTSES, während keine Reaktion mit MTSET innerhalb von 5 Minuten nachweisbar war. Ähnliche Ergebnisse wie für M35C konnten für CSS, D39C, D130C, E126C und T43C erzielt werden (Abb. 4.1). Diese sind ebenfalls für MTSEA und MTSES zugänglich, reagieren aber langsamer mit den zugesetzten Reagentien. Interessant ist dieses Ergebnis vor allem für T43C, da sich

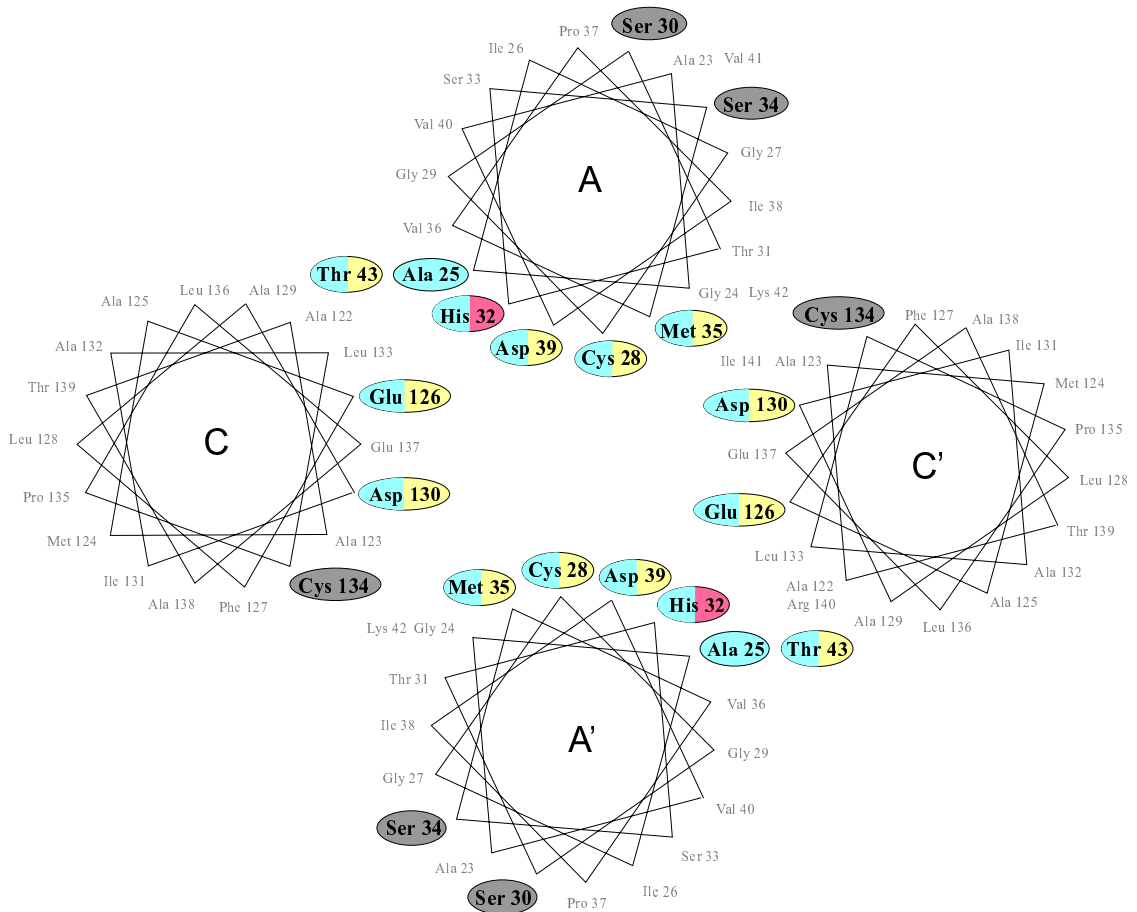


Abbildung 4.1: *Helical Wheel* Modell des putativen Translokationsweges nach Phelps *et al.* (1996). In fett markiert sind die in dieser Arbeit untersuchten Positionen. Die graue Unterlegung bedeutet keine Zugänglichkeit für die MTS-Reagentien. Die blaue Unterlegung entspricht der Zugänglichkeit für MTSEA, die rote Unterlegung der Zugänglichkeit für das positiv geladene MTSET und die gelbe Unterlegung der Zugänglichkeit für das negativ geladene MTSES. Bei einer zweifarbigen Markierung ist die Position für zwei Reagentien zugänglich.

KAPITEL 4. DISKUSSION

diese Position bei einer *right side out* Orientierung des Proteins auf dessen Matrix-Seite befindet. T43C ist für MTSEA zugänglich. Da MTSEA durch Membranen diffundieren kann, war dieses Ergebnis zu erwarten. Aber auch für MTSES ist eine Abnahme des Fluoreszenzsignals mit der Zeit zu erkennen. Somit ist T43C für MTSES zugänglich. Eine Reaktion mit MTSES ist bei dieser Position nur dann möglich, wenn das Reagenz durch das Protein auf die gegenüberliegende Seite gelangen kann. Dann müßte der putative Translokationsweg aufgrund der Größe der MTS-Reagentien einen Durchmesser von mehr als 0,6 nm besitzen. Es ist ebenfalls zu beobachten, daß die Reaktion mit MTSES bei T43C sehr viel langsamer abläuft als mit MTSEA. Das spricht dafür, daß MTSES nur langsam durch den Phosphat-Translokationsweg diffundieren kann.

Wie an Abbildung 4.1 eindeutig zu sehen ist, korrelieren die erhaltenen Ergebnisse mit dem aufgestellten Modell von der Gruppe um Wohlrab. Positionen, die zum putativen Translokationsweg zeigen, sind für die MTS-Reagentien zugänglich, während Positionen, die eventuell an Salzbrückenbildung oder Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sein könnten bzw. nicht zum Translokationsweg zeigen, schwerer oder nicht zugänglich sind. Das aufgestellte Modell konnte daher mit Hilfe der durchgeführten Zugänglichkeitsstudien bestätigt werden.

4.2.5 Mechanistische Betrachtungen

Der Transport von Phosphat wird als Symport mit einem Proton bzw. als Antiport mit einem Hydroxylion beschrieben (Wohlrab, 1986; Stappen und Krämer, 1994). Interessant ist in diesem Zusammenhang das Ergebnis der Zugänglichkeitsstudien an der Position H32C. Wie unter 4.2.4 erwähnt wurde, konnte gezeigt werden, daß diese Position als einzige hier untersuchte Position für das positiv geladene MTSET zugänglich war. Auch auf Aktivitätsebene zeigte die Reaktion von H32C mit dem positiv geladenen Reagenz eine leichte Aktivitätsverbesserung um 50 %. Daraus kann geschlossen werden, daß eine positive Ladung an dieser Position - wie sie z. B. durch Protonierung des Histidins erzeugt werden kann - für die Transportfunktion vorteilhaft ist. Es kann angenommen werden, daß die Mikroumgebung des Histidins im aktiven Homodimer einen Überschuß an negativen Ladungen aufweist, wodurch die gute Zugänglichkeit für das positiv geladene Reagenz, aber auch die schlechte Zugänglichkeit für das negativ geladene Reagenz erklärt werden könnte. Mögliche negativ geladene Aminosäuren könnten E137 oder D130 sein. Eine solche Anordnung wurde auch schon bei der Lactose Permease aus *E. coli* beobachtet. Die Permease muß zunächst protoniert werden, bevor die Translokation von Lactose stattfinden kann. Dabei liegt das Proton zwischen H322 und E269 delokalisiert

vor. In dieser Konformation kann das Substrat Lactose dann vom Protein gebunden werden. Diese Bindung induziert eine Konformationsänderung, die zum Transfer des Protons von H322 und E269 auf E325 und zur Reorientierung der Bindungstasche zur inneren Seite mit einer erniedrigten Affinität zum Substrat führt. E325 wird dann deprotoniert, und das Protein reorientiert sich. Nach Bindung eines weiteren Protons an H322 und E269 kann der Zyklus wieder von vorne beginnen (Sahin-Toth *et al.*, 2000). Eine ähnliche Anordnung wäre für den mitochondrialen Phosphatcarrier denkbar. Im Grundzustand läge das Histidin deprotoniert vor. Die Protonierung könnte ein Teilschritt bei der Bildung des transportaktiven Komplexes sein. Ein weiterer Schritt bei der Bildung dieses Komplexes wäre die anschließende Anlagerung von externem Phosphat. Anschließend würde das Phosphat transloziert werden, wobei weiterhin unklar ist, ob bei der Translokation ein Proton mit oder ein Hydroxylion gegen das Phosphat transportiert wird.

4.2.6 Mögliche Salzbrücken im mitochondrialen Phosphatcarrier

Geladene Aminosäurereste in transmembranen Helices sind im Gegensatz zu vielen anderen hydrophoben Aminosäuren meist von großer struktureller oder funktioneller Bedeutung. Dies konnte die Arbeitsgruppe um Kaback durch Experimente an der Lactose Permease aus *E. coli* eindrücklich zeigen (Frillingos *et al.*, 1998). Der Austausch des nativen D39 durch Cystein beim mitochondrialen Phosphatcarrier führte zu einem nahezu vollständigen Verlust der Transportaktivität. Dies ist ein erster Hinweis darauf, daß diese Position für die Funktion oder die Struktur wichtig ist. Mit Hilfe der Zugänglichkeitsstudien konnte gezeigt werden, daß diese Position für die Reagentien MTSEA und MTSES zugänglich ist. Auf Aktivitätsebene äußert sich diese Zugänglichkeit in einer drastischen Erhöhung der Transportaktivität. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß an dieser Position die negative Ladung essentiell ist. Möglicherweise bildet D39 mit dem R140 der dritten Helix eine Salzbrücke aus und ist somit für die Struktur des Proteins ein essentieller Baustein. Die Gruppe um Wohlrab konnte neuerdings über die Bestimmung von Einbaueffizienzen von PiC_{SC} in Liposomen zeigen, daß D39 keine essentielle Funktion für den Transportvorgang übernimmt, aber für die Struktur des Proteins notwendig ist (Phelps *et al.*, 2001). Die Ausbildung einer Salzbrücke ist mit diesem Ergebnis konform. Ob die vermutete Salzbrücke aus den beiden Helices eines Monomers oder aus den Helices der unterschiedlichen Monomere gebildet wird, kann nicht gesagt werden. Auch in anderen Proteinen konnte das Vorhandensein von Salzbrücken gezeigt werden. In dem Zuckerphosphatcarrier UhpT aus *E. coli* konnte eine intrahelicale Salzbrücke

KAPITEL 4. DISKUSSION

zwischen Asp388 und K391 in der Helix XI nachgewiesen werden, die für die Funktion des Proteins essentiell ist (Hall *et al.*, 1999). In der Lactose Permease aus *E. coli* befinden sich Salzbrücken zwischen den Resten R302 und E325, K319 und D240 und R144 und E126 (Sahin-Toth *et al.*, 2000).

Auch E126 zeigt ein ähnliches Verhalten gegenüber den MTS-Reagentien wie D39. Da die Position E126C trotz ihrer Lage im oberen Drittel der dritten Transmembranhelix für die MTS-Reagentien schwer zugänglich ist, könnte das mit Helix-Helix-Wechselwirkungen erklärt werden, wie sie bei einer Salzbrücke auftreten. Putative Aminosäuren, mit denen das Glutamat wechselwirken könnte, wären die beiden Lysine 187 oder 179 der vierten Transmembranhelix. Für beide Positionen konnte bereits gezeigt werden, daß die positive Ladung an dieser Position essentiell ist (Briggs *et al.*, 1999). Ein ähnliches Ergebnis wurde für den heterolog in *E. coli* exprimierten Citratcarrier aus *S. cerevisiae* erhalten (Xu *et al.*, 2000).

Eine ganze Reihe Fragen über strukturelle und funktionelle Zusammenhänge bleibt jedoch weiterhin offen oder ergibt sich aus den vorliegenden experimentellen Befunden. Hierzu gehört auch die Frage nach dem Aufbau des Translokationsweges. Eine Beteiligung der Helices 1 und 3 ist aufgrund der erhaltenen Ergebnisse mit den MTS-Reagentien wahrscheinlich. Eine Wechselwirkung der vierten Transmembranhelix mit den Helices 1 und 3, wie sie von der Gruppe um Wohlrab postuliert wurde (Phelps *et al.*, 2001), kann nicht ausgeschlossen werden. Proteine, die nur einen Cysteinrest in der vierten Helix besitzen, wären daher noch von Interesse um zu zeigen, ob Positionen dieser Helix für die MTS-Reagentien zugänglich und auch am putativen Translokationsweg beteiligt sind. Zur weiteren Charakterisierung des putativen Translokationsweges könnten mit Hilfe von Spinlabelexperimenten Abstände der einzelnen Cysteine im Protein voneinander bestimmt werden. Durch diese Untersuchung wäre eine Bestimmung der räumlichen Anordnung der Helices und somit des putativen Translokationsweges möglich.

5 Zusammenfassung

Der mitochondriale Phosphatcarrier ist für die Phosphataufnahme in Mitochondrien verantwortlich und daher für die ATP-Synthese essentiell. Mit seinen 6 transmembranen Helices, einer molekularen Masse von 32 kDa und 311 Aminosäuren ist er ein typischer Vertreter der mitochondrialen Carrierfamilie, die allein in *Saccharomyces cerevisiae* 35 Mitglieder umfaßt. Das Protein katalysiert zwei verschiedene physiologische Transportreaktionen: die Aufnahme von Phosphat im Antiport mit Hydroxylionen und den homologen Austausch von Phosphat. Es wird angenommen, daß der Phosphatcarrier in homodimerer Form aktiv ist.

Zur genauen kinetischen Charakterisierung von Transportproteinen ist die funktionelle Rekonstitution in Liposomen ein wichtiger Ansatz. In dieser Arbeit wurde für den heterolog in *Escherichia coli* exprimierten mitochondrialen Phosphatcarrier aus *S. cerevisiae* das bis dahin in unserer Gruppe verwendete Rekonstitutionssystem optimiert. Durch die Verwendung von Gesamtlipidextrakt aus *E. coli* oder selbst isolierten Lipiden aus Truthahneigelb supplementiert mit Cardiolipin konnte die Transportaktivität des mitochondrialen Phosphatcarriers um zwei bis drei Größenordnungen im Vergleich zum bisherigen Rekonstitutionssystem verbessert werden. Daten zur näheren Charakterisierung des Phosphatcarriers wie z. B. K_M - und V_{max} -Bestimmungen stimmten mit veröffentlichten Werten überein. Dies belegt, daß das optimierte System zur weiteren Untersuchung des Phosphatcarriers geeignet ist.

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des mitochondrialen Phosphatcarriers aus *S. cerevisiae* durch Proteinkristallographie ist bis heute noch nicht gelungen. Aussagen über die Struktur sind daher bislang nur durch indirekte Nachweismethoden, wie z. B. chemische Modifikationen, möglich. In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, mit der die Zugänglichkeit verschiedener Aminosäurepositionen im rekonstituierten System mit Hilfe von MTS-Reagentien untersucht werden kann. Dazu wurden ausgehend von dem Plasmid pUC18-SSS, auf dem das cysteinfreie Protein kodiert ist, durch ortsgerichtete Mutagenese gezielte Aminosäuresubstitutionen zu Cystein durchgeführt. Nach Expression der Proteine wurden die Transportaktivitäten bestimmt. Einige der erzeugten Proteine zeigten nur ge-

KAPITEL 5. ZUSAMMENFASSUNG

ringe Transportaktivitäten, was nahelegte, daß diese Aminosäuren wichtig für den Phosphattransport sind. Die restlichen Proteine besaßen deutlich meßbare Transportaktivitäten. Mit Hilfe der MTS-Reagentien wurden alle rekombinanten Proteine auf ihre Zugänglichkeit untersucht. Die Bindung der MTS-Reagentien an den Phosphatcarrier wurde mit Fluorescein-5-Maleimid nachgewiesen, einem ebenfalls sulfhydrylspezifischen und zudem fluoreszierenden Molekül. Mit diesem System konnten sowohl Aminosäuren identifiziert werden, die für diese Reagentien nicht zugänglich waren als auch Reste, die gut von den zugesetzten Reagentien erreicht wurden. Der Translokationsweg im mitochondrialen Phosphatcarrier konnte näher charakterisiert und dadurch das von der Gruppe um Wohlrab aufgestellte Modell bestätigt werden (Phelps *et al.*, 1996).

Literaturverzeichnis

- Akabas, M. H., Stauffer, D. A., Xu, M. und Karlin A. (1992) : Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants, *Science* **258**, 307-310
- Akabas, M. H., Kaufmann, C., Archdeacon, P. und Karlin, A. (1994a) : Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the entire M2 segment of the α subunit, *Neuron* **13**, 919-927
- Akabas, M. H., Kaufmann, C., Cook, T. A. und Archdeacon, P. (1994b) : Amino acid residues lining the chloride channel of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *J. Biol. Chem.* **269**, 14865-14868
- Akabas, M. H. und Karlin, A. (1995) : Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the M1 segment fo the α -subunit, *Biochemistry* **34**, 12496-12500
- Aquila, H., Misra, D., Eulitz, M. und Klingenberg, M. (1982) : Complete amino acid sequence of the ADP/ATP carrier from bovine heart mitochondria, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 345-349
- Aquila, H., Link, T. A. und Klingenberg, M. (1985) : The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP-Carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane, *EMBO J.* , 2369-2376
- Aquila, H., Link, T. A. und Klingenberg, M. (1987) : Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family, *FEBS Lett.* **212**, 1-9
- Arechaga, I., Raimbault, S., Prieto, S., Levi-Meyrueis, C., Zaragoza, P., Miron, B., Ricquier, D., Bouillaud, F. und Rial, E. (1993) : Cysteine residues are not essential for uncoupling protein function, *Biochem. J.* **296**, 693-700

LITERATURVERZEICHNIS

- Barnerjee, R. K. und Racker, E. (1979)** : Partial purification and characterization of the phosphate transporter from bovine heart mitochondria, *Memb. Biochem.* **2**, 203-225
- Bell, G. I., Burant, C. F., Takeda, J. und Gould, G. W. (1993)** : Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters, *J. Biol. Chem.* **268**, 19161-19164
- Benz (1985)** : Porin from bacteria and mitochondrial outer membranes, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **19**, 145-190
- Beyer, K. und Klingenberg, M. (1985)** : ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria has high amounts of tightly bound cardiolipin, as revealed by ³¹P nuclear magnetic resonance, *Biochemistry* **24**, 3821-3826
- Bisaccia, F., de Palma, A., Dierks, T., Krämer, R. und Palmieri, F. (1993)** : Reaction mechanism of the reconstituted tricarboxylate carrier from rat liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* **1142**, 139-145
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987)** : Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* **8**, 93-99
- Bolli, R., Nalecz, K. A. und Azzi, A. (1989)** : Monocarboxylate and alpha-ketoglutarate carriers from bovine heart mitochondria. Purification by affinity chromatography on immobilized 2-cyano-4-hydroxycinnamate, *J. Biol. Chem.* **264**, 18024-18030
- Briggs, C., Mincone, L. und Wohlrab, H. (1999)** : Replacement of basic and hydroxyl amino acids identify structurally and functionally sensitive regions of the mitochondrial phosphate carrier, *Biochemistry* **38**, 5096-5102
- Bruice, T. W. und Kenyon, G. L. (1982)** : Novel alkyl alkanethiolsulfonate sulfhydryl reagents. Modification of derivatives of L-cysteine, *J. Protein Chem.* **1**, 47-58
- Capobianco, L., Brandolin, G. und Palmieri, F. (1991)** : Transmembrane topography of the mitochondrial phosphate carrier explored by peptide-specific antibodies and enzymatic digestion, *Biochemistry* **35**, 8483-8488
- Cheneval, D., Müller, M. und Carafoli, E. (1983)** : The mitochondrial phosphate carrier reconstituted in liposomes is inhibited by doxorubicin, *FEBS Lett.* **159**, 123-126

LITERATURVERZEICHNIS

- Chung, C. T., Niemela, S. L. und Miller, R. H. (1989)** : One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 2172-2175
- Coty, W. A. und Petersen, P. L. (1974)** : Phosphate transport in rat liver mitochondria, *J. Biol. Chem.* **249**, 2593-2598
- Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steinert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., Jansonius, J. N. und Rosenbusch, J. P. (1992)** : Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins, *Nature* **358**, 727-733
- Dawson, A., Klingenberg, M. und Krämer (1987)** : Transport across membranes, in „Mitochondria: A practical approach“, Darley-Usmar V. M. et al., ed.; 35-79, IRL Press, Oxford
- Deisenhofer, J., Ep, O., Miki, K., Huber, R. und Michel, H. (1984)** : X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*, *J. Mol. Biol.* **180**, 385-398
- Deuber, F. (2000)** : Untersuchungen zur dimeren Struktur des mitochondrialen Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertation, Universität zu Köln
- Dierks, T., Riemer, E. und Krämer, R. (1988)** : Reaction mechanism of the reconstituted aspartate/glutamate carrier from bovine heart mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* **943**, 231-244
- Dierks, T., Salentin, A., Heberger, C. und Krämer, R. (1990a)** : The mitochondrial aspartate/glutamate carrier and ADP/ATP carrier switch from obligate counter exchange to unidirectional transport after modification by SH-reagents, *Biochim. Biophys. Acta* **1028**, 268-280
- Dierks, T., Salentin, A. und Krämer (1990b)** : Pore-like and carrier-like properties of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier after modification by SH-reagents: evidence for a preformed channel as a structural requirement of carrier-mediated transport, *Biochim. Biophys. Acta* **1028**, 281-288
- Dolce, V., Fiermonte, G. und Palmieri, F. (1996)** : Tissue specific expression of the two isoforms of the mitochondrial phosphate carrier in bovine tissues, *FEBS Lett.* **399**, 95-98

LITERATURVERZEICHNIS

- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. und MacKinnon, R. (1998) : The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity, *Science* **280**, 69-77
- Due, A. D., Cook, J. A., Fletcher, S. J., Zhi-Chao, Q., Powers, A. C. und May, J. M. (1995) : A „cysteineless” GLUT1 glucose transporter has normal function when expressed in *Xenopus* oocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 590-596
- El Moulaj, B., Duyckaerts, C., Lamottebrasseur, J. und Sluse, F. E. (1997) : Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* **13** (6), 573-581
- Engstova, H., Zackova, M., Ruzicka, M., Meinhardt, A., Hanus, J., Krämer, R., Jezek, P. (2000) : Natural and azido fatty acids inhibit phosphate transport and activate fatty acid anion uniport mediated by the mitochondrial phosphate carrier, *J. Biol. Chem.* **275**
- Fiermonte, G., Walker, J. E. und Palmieri, F. (1993) : Abundant bacterial expression and reconstitution of an intrinsic membrane-transport protein from bovine mitochondria, *Biochem. J.* **294**, 293-299
- Flitsch, S. L. und Khorana, H. G. (1989) : Structural studies on transmembrane proteins. 1. Model study using bacteriorhodopsin mutants containing single cysteine residues, *Biochemistry* **28**, 7800
- Frillingos, S., Sahin-Toth, M., Wu, J. und Kaback R. (1998) : Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure-function relationship in polytopic membrane proteins, *FASEB J.* **12**, 1281-1299
- Gropp, T., Brutovetsky, N., Klingenberg, M., Müller, V., Fendler, K. und Bamberg, E. (1999) : Kinetics of electrogenic transport by the ADP/ATP carrier, *Biophys. J.* **77**, 714-726
- Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R. und Hanahan, D. (1990) : Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 4645-4649
- Guerin, B., Bukusoglu, C., Rakotomanana, F. und Wohlrab, H. (1990) : Mitochondrial phosphate transport - N-ethylmaleimide insensitivity correlates with ab-

- sence of beef heart-like Cys-42 from the *Saccharomyces cerevisiae* phosphate transport protein, *J. Biol. Chem.* **265**, 19736-19741
- Hackenberg, H. und Klingenberg, M. (1980)** : Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-diphosphate/adenosine 5'-triphosphate carrier in Triton X-100, *Biochemistry* **19**, 548-555
- Hall, J. A., Fann, M. und Maloney, P. C. (1999)** : Altered substrate selectivity in a mutant of an intrahelical salt bridge in UhpT, the sugar phosphate carrier of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* **274**, 6148-6153
- Hanahan, D. (1985)** : Techniques of transformation of *E. coli*. In: Glover, D. M. (ed.), DNA cloning. IRL-Press, Oxford, Washington DC. Vol. 1, 109-135
- Harold, F. M. (1986)** : The vital force: a study of bioenergetics, Kap. 7: Mitochondria and oxidative phosphorylation, *Freeman, New York*, 197-250
- Herbert, D. N. und Carruthers, A. (1991)** : Glucose transporter oligomeric structure determines transporter function - reversible redox-dependent interconversions of tetrameric and dimeric GLUT1, *Biochemistry* **34**, 9734-9747
- Henderson, P. J. F. (1990)** : Sugar transport proteins, *Curr. Opinion Struct. Biol.* **1**, 590-601
- Herick, K. und Krämer, R. (1995)** : Kinetic and energetic characterization of solute flux through the reconstituted aspartate/glutamate carrier from beef heart mitochondria after modification with mercurials, *Biochim. Biophys. Acta* **1238**, 63-71
- Holmgren, M., Liu, Y., Xu, Y. und Yellen, G. (1996)** : On the use of thiol-modifying agents to determine channel topology, *Neuropharmacology* **35**, 797-804
- Indiveri, C., Dierks, T., Krämer, R. und Palmieri (1991a)** : Reaction mechanism of the reconstituted oxoglutarate carrier from bovine heart mitochondria, *Eur. J. Biochem.* **198**, 339-347
- Indiveri, C., Tonazzi, A. und Palmieri, F. (1991b)** : Characterization of the unidirectional transport of carnitine catalyzed by the reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria, *Biochim. Biophys Acta* **1069**, 110-116
- Indiveri, C., Tonazzi, A., Prezioso, G. und Palmieri, F. (1991c)** : Kinetic characterization of the reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* **1065**: 231-238

LITERATURVERZEICHNIS

- Indiveri, C., Tonazzi, A., Dierks, T., Krämer, R. und Palmieri, F. (1992a) :** The mitochondrial carnitine carrier protein: characterization of SH-groups relevant for its transport function, *Biochim. Biophys. Acta* **1140**, 53-58
- Indiveri, C., Tonazzi, A. und Palmieri, F. (1992b) :** Identification and purification of the ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria, *Eur. J. Biochem.* **207**, 449-454
- Indiveri, C., Prezioso, G., Dierks, T., Krämer, R. und Palmieri, F. (1993) :** Kinetic characterization of the reconstituted dicarboxylate carrier from mitochondria - A 4-binding-site sequential transport system, *Biochim. Biophys. Acta* **1189**, 65-73
- Indiveri, C., Iacobazzi, B., Giangregorio, N. und Palmieri, F. (1997a) :** The mitochondrial carnitine carrier protein: cDNA cloning, primary structure and comparison with other mitochondrial transport proteins, *Biochem. J.* **321**, 713-719
- Indiveri, C., Tonazzi, A., Stipani, I. und Palmieri, F. (1997b) :** The purified and reconstituted ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria: electrical nature and coupling of the exchange reaction with H⁺ translocation, *Biochem. J.* **327**, 349-355
- Indiveri, C., Abruzzo, G., Stipani, I. und Palmieri, F. (1998) :** Identification and purification of the reconstitutively active glutamine carrier from rat kidney mitochondria, *Biochem. J.* **333**, 285-290
- Inoue, I., Nojime, H. und Okayama, H. (1990) :** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene* **96**, 23-28
- Javitch, J. A., Fu, D., Chen, J. und Karlin A. (1995) :** Mapping the binding-site crevice of the dopamine D2 receptor by the substituted-cysteine accessibility method, *Neuron* **14**, 825-831
- Jung, K., Jung, H., Wu, J., Prive, G. G. und Kaback, R. (1993) :** Use of site-directed fluorescence labeling to study proximity relationships in the lactose permease of *Escherichia coli*, *Biochemistry* **32**, 12273-12278
- Kaplan, R. S., Mayor, J. A., Kakhniashvili, D., Gremse D. A., Wood, D. O. und Nelson, D. R. (1996) :** Deletion of the nuclear gene encoding the mitochondrial citrate transport protein from *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**, 657-662

- Kaplan, R. S., Mayor, J. A. und Wood, D. O. (1993)** : The mitochondrial tricarboxylate transport protein. cDNA cloning, primary structure, and comparison with other mitochondrial transport proteins, *J. Biol. Chem.* **268**, 13682-13690
- Kaplan, R. S. und Pedersen, P. L. (1985)** : Isolation and reconstitution of the n-butylmalonate-sensitive dicarboxylate transporter from rat liver mitochondria, *J. Biol. Chem.* **260**, 10293-10298
- Kaplan, R. S., Mayor, J. A., Brauer, D., Kotaria, R., Walters, D. E. und Dean, A. M. (2000)** : The yeast mitochondrial citrate transport protein, *J. Biol. Chem.* **275**, 12009-12016
- Karlin, A. und Akabas, M. H. (1998)** : Substituted-cysteine accessibility method, *Meth. Enzymol.* **293**, 123-145
- Kenyon, G. L. und Bruce, T. W. (1977)** : Novel sulfhydryl reagents, *Meth. Enzymol.* **47**, 407-430
- Klingenberg, M. (1981)** : Membrane protein oligomeric structure and transport function, *Nature* **290**, 449-454
- Klingenberg, M. (1989)** : Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.* **270**, 1-14
- Klingenberg, M. (1990)** : Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue, *TIBS* **15**, 108-112
- Klingenberg, M. (1992)** : Structure-Function of the ADP/ATP carrier, *Biochem. Soc. Trans.* **20**, 547-549
- Klingenberg, M. (1999)** : Uncoupling protein - a useful energy dissipator, *J. Bioenerg. Biomembr.* **5**, 419-430
- Koepke, J., Hu, X., Muenke, C., Schulten, K. und Michel, H. (1996)** : The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800-850) from *Rhodospirillum rubrum*, *Structure* **4**, 581-597
- Krämer, R. und Heberger, C. (1986)** : Functional reconstitution of carrier proteins by removal of detergent with a hydrophobic ion exchange column, *Biochim. Biophys. Acta* **863**, 289-296
- Krämer, R. und Palmieri, F. (1989)** : Molecular aspects of isolated and reconstituted carrier proteins from animal mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* **974**, 1-32

LITERATURVERZEICHNIS

- Krämer, R. und Palmieri, F. (1992)** : Structure and function of metabolite carrier in mitochondria, in „Molecular Mechanisms in Bioenergetics” (Ernster, L., ed.) 359-384, Elsevier, Amsterdam.
- Kuan, J. und Saier, M. H. (1993)** : The mitochondrial carrier family of transport proteins: Structural, functional, and evolutionary relationships, *Crit Rev. Biochem. Molec. Biol.* **28**, 209-233
- Kühlbrandt, W. (1995)** : Structure and function of bacterial light-harvesting complexes, *Structure* **3**, 521-525
- Kürz, L. L., Zühlke, R. D., Zhang, H.-J. und Joho, R. H. (1995)** : Side chain accessibilities in the pore of a K⁺ channel probed by sulfhydryl specific reagents after cysteine scanning mutagenesis, *Biophys. J.* **68**, 900-905
- Kuner, T., Wollmuth, L. P., Karlin, A., Seeburg, P. und Sakmann, B. (1996)** : Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines, *Neuron* **17**, 343-352
- Lämmli, U. K. (1970)** : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685
- LaNoue, K. F. und Schoolwerth, A. C. (1979)** : Metabolite transport in mitochondria, *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 871-922
- LaNoue, K. F. und Schoolwerth, A. C. (1984)** : Metabolite transport in mammalian mitochondria, in „Bioenergetics” (Ernster L., ed.) 221-268, Elsevier, Amsterdam
- Ligeti, E., Brandolin, G., Dupont, Y. und Vignais, P. V. (1985)** : Kinetics of P_i/P_i exchange in rat liver mitochondria; rapid filtration experiments in the millisecond range, *Biochemistry* **24**, 4423-4428
- Lin, C. S., Hackenberg, H. und Klingenberg, M. (1980)** : The uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria is a dimer. A hydrodynamic study, *FEBS Lett.* **113**, 302-306
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951)** : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Majima, E., Ikawa, K., Takeda, M., Hashimoto, M., Shinohara, Y. und Tera-da, H. (1995)** : Translocation of loops regulates transport activity of mitochondrial ADP-ATP carrier deduced from formation of a specific intermolecular disulfide bridge catalyzed by copper-o-phenanthroline, *J. Biol. Chem.* **270**, 29548-29554

LITERATURVERZEICHNIS

- Maloney, P. C. (1990)** : A consensus structure for membrane transport, *Res. Microbiol.* **141**, 374-383
- Manella, C. A., Forte, M. und Colombini, M. (1992)** : Towards the molecular structure of the mitochondrial channel VDAC, *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 7-19
- Manella, C. A. (1996)** : Mitochondrial channels revisited, *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 89-91
- Marger, M. D. und Saier, M. H., Jr. (1993)** : A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport, *Trends Biochem. Sci.* **18**, 13-20
- Mende, P., Hüther, F.-J. und Kadenbach, B. (1983)** : Specific and reversible activation and inactivation of the mitochondrial phosphate carrier by cardiolipin and nonionic detergents, respectively, *FEBS Lett.* **158**, 331-334
- Meuller, J. und Rydstrom, J. (1999)** : The membrane topology of proton-pumping *Escherichia coli* transhydrogenase determined by cysteine labeling, *J. Biol. Chem.* **274**, 19072-19080
- Miller, J. H. (1992)** : A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N. Y.
- Mitchell, P. (1966)** : Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation, *Biol. Rev.* **41**, 445-502
- Mitchell, P. (1976)** : Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling: power transmission by proticity, *Trans. Biochem. Soc.* **4**, 399 - 430
- Müller, M., Cheneval, D. und Carafoli (1984)** : Doxorubicin inhibits the phosphate transport protein reconstituted in liposomes. A study on the mechanism of the inhibition, *Eur. J. Biochem.* **140**, 447-452
- Murakami, H., Blobel, G. und Pain, D. (1993)** : Signal sequence region of the mitochondrial precursor proteins binds to mitochondrial import receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 3358-3362
- Nelson, M. und McClland, M. (1992)** : Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combination for megabase mapping chromosomes, *Meth. Enzymol.* **216**, 279-303

LITERATURVERZEICHNIS

- Norrander, J., Kempe, T. und Messing, J. (1983)** : Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis, *Gene* **1**, 101-106
- Palmieri, F., Indiveri, C., Bisaccia, F. und Krämer, R. (1993)** : Functional properties of purified and reconstituted mitochondrial metabolite carriers, *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 525-535
- Palmieri, L., Lasorsa, F. M., de Palma, A., Palmieri, F., Runswick, M. J. und Walker, J. E. (1997)** : Identification of the yeast ACR1 gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate, *FEBS Lett.* **417**, 114-118
- Palmieri, L., Vozza, A., Agrimi, G., de Marco, V., Runswick, M. J., Palmieri, F. und Walker J. E. (1999)** : Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate, *J. Biol. Chem.* **274**, 22184-22190
- Palmieri, L., Agrimi, G., Runswick, M. J., Fearnley, I. M., Palmieri, F. und Walker, J. E. (2001)** : Identification in *Saccharomyces cerevisiae* of two isoforms of a novel mitochondrial transporter for 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate, *J. Biol. Chem.* **276**, 1916-1922
- Pascual, J. M., Shieh, C.-C., Kirsch, G. E. und Brown, A. M. (1995)** : K⁺ pore structure revealed by reporter cysteines at inner and outer surfaces, *Neuron* **14**, 1055-1063
- Phelps, A., Schobert, C. T. und Wohlrab, H. (1991)** : Cloning and characterization of the mitochondrial phosphate transport protein gene from *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry* **30**, 10757-10762
- Phelps, A. und Wohlrab, H. (1993)** : Cys 28 of the mitochondrial phosphate transport protein is responsible for the inhibition of the transport by oxygen, *FASEB J.*, 321
- Phelps, A., Briggs, C., Mincone, L. und Wohlrab, H. (1996)** : Mitochondrial phosphate transport protein. Replacement of glutamic, aspartic, and histidine residues affect transport and protein conformation and point to a coupled proton path, *Biochemistry* **35**, 10757-10762
- Phelps, A., Briggs, C., Haefele, A., Mincone, L., Ligeti, E. und Wohlrab, H. (2001)** : Mitochondrial phosphate transport protein. Reversions of inhibitory conservative mutations identify four helices and a nonhelix protein segment with trans-

- membrane interactions and Asp39, Glu137, and Ser158 as nonessential for transport, *Biochemistry* **40**, 2080-2086
- Prohl, C., Pelzer, W., Diekert, K., Kmita, H., Bedekovics, T., Kispal, G. und Lill, R. (2001)** : The yeast mitochondrial carrier Leu5p and its human homologue Graves' disease protein are required for accumulation of coenzyme A in the matrix, *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1089-1097
- Ramirez-Latorre, J., Yu, C. R., Qu, X., Perin, F., Karlin, A. und Role, L. (1996)** : Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels, *Nature* **380**, 347-351
- Riccio, P., Auila, H. und Klingenberg, M. (1975)** : Purification of the carboxyatractylate binding protein from mitochondria, *FEBS Lett.* **56**, 133 - 138
- Rigaud, J. L., Pitard, B. und Levy, D. (1995)** : Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1231**, 223-246
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D.-S., Lin S.-W., Dunn, J. J. und Studier, F. W. (1987)** : Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase, *Gene* **56**, 125-135
- Runswick, M. J., Powell, S. J., Nyren, P. und Walker, J. E. (1987)** : Sequence of the bovine mitochondrial phosphate carrier protein: structural relationship to ADP/ATP translocase and the brown fat mitochondria uncoupling protein, *EMBO J.* **6**, 1367-1373
- Runswick, M. J., Walker, J. E., Bisaccia, F., Iacobazzi, V. und Palmieri, F. (1990)** : Sequence of the bovine 2-oxoglutarate-malate carrier protein: structural relationship to other mitochondrial transport proteins, *Biochemistry* **29**, 11033-11040
- Sahin-Toth, M., Dunten, R. L. und Kaback, R. (1993)** : The lactose permease of *Escherichia coli*: a paradigm for membrane transport proteins, *Soc. Gen. Physiol. Ser.* **48**, 1-9
- Sahin-Toth, M., Lawrence, M. C. und Kaback, H. R. (1994)** : Properties of permease dimer, a fusion protein containing two lactose permease molecules from *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 5421-5425
- Sahin-Toth, M., Karlin, A. und Kaback, R. (2000)** : Unraveling the mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **97**, 10729-10732

LITERATURVERZEICHNIS

- Sambrook, J., Fritsch, E. E. und Maniatis, T. (1989)** : Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977)** : DNA sequencing with chain terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
- Saraste, M. und Walker, J. E. (1982)** : Internal sequence repeats and the path of polypeptide on mitochondrial ADP/ATP translocase, *FEBS Lett.* **144**, 250-254
- Schirmer, T., Keller, T. A., Wang, Y. F. und Rosenbusch (1997)** : Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3,1 Å resolution, *Science* **267**, 512-514
- Schroers, A., Krämer, R. und Wohlrab, H. (1997)** : The reversible antiport-uniport conversion of the phosphate carrier from yeast mitochondria depends on the presence of a single cysteine, *J. Biol. Chem.* **272**, 10558-10564
- Sluse, F. E., Ranson, M. und Liebecq, C. (1972)** : Mechanism of the exchanges catalysed by the oxoglutarate translocatory of rat-heart mitochondria. Kinetics of the exchange reactions between 2-oxoglutarate, malate and malonate, *Eur. J. Biochem.* **25**, 207-217
- Sluse, F. E., Evens, A., Dierks, T., Duyckaerts, C., Sluse-Goffart, C. M. und Krämer, R. (1991)** : Kinetic study of the aspartate/glutamate carrier in intact heart mitochondria and comparison with a reconstituted system, *Biochim. Biophys. Acta* **1058**, 329-338
- Sorgato, M. C. und Moran, O. (1993)** : Channels in mitochondrial membranes: knowns, unknowns, and perspectives for the future, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **18**, 127-171
- Stappen, R. und Krämer, R. (1993)** : Functional properties of the reconstituted phosphate carrier from bovine heart mitochondria: Evidence for asymmetric orientation and characterization of three different transport modes, *Biochim. Biophys. Acta* **1149**, 40-48
- Stappen, R. und Krämer, R. (1994)** : Kinetic mechanism of phosphate/phosphate and phosphate/OH⁻-antiport catalyzed by the reconstituted phosphate carrier from beef heart mitochondria, *J. Biol. Chem.* **269**, 11240-11246

LITERATURVERZEICHNIS

- Stappen, R. (1994)** : Funktionelle und strukturelle Eigenschaften der Anionencarrier der inneren Mitochondrienmembran: Untersuchungen am Aspartat/Glutamatcarrier und Phosphatcarrier im rekonstituierten System, Dissertation, Düsseldorf
- Stauffer, D. A. und Karlin, A. (1994)** : Simple alkanethiol groups for temporary blocking of sulfhydryl groups of enzymes, *Biochemistry* **14**, 766-771
- Stipani, I., Krämer R., Palmieri, F. und Klingenberg, M. (1980)** : Citrate Transport in liposomes reconstituted with triton extracts from mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **97**, 1206-1214
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986)** : Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130
- Tahiliani, A. G., Keene, T. und Kaplan, R. S. (1992)** : Characterization of the inhibitor sensitivity of the coenzyme A transport system in isolated rat heart mitochondria, *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 635-640
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. und Yoshikawa, S. (1996)** : The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2,8 Å, *Science* **272**, 1136-1144
- Tzagoloff, A., Jang, J., Glerum, D. M. und Wu, M. (1996)** : FLX1 codes for a carrier protein involved in maintaining a proper balance of flavin nucleotides in yeast mitochondria, *J. Biol. Chem.* **271**, 7392-7397
- van Iwaarden, P. R., Pastore, J. C., Konings, W. N. und Kaback, H. R. (1991)** : Construction of a functional lactose permease devoid of cysteine residues, *Biochemistry* **30**, 9595-9600
- Walker, J. E. (1992)** : The mitochondrial transporter family, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 519-526
- Weiss, M. S., Abele, U., Weckesser, J., Welte, W., Schiltz, E. und Schulz, G. E. (1991)** : Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin, *Science* **254**, 1627-1630
- Wohlrab, H., Collins, A. und Costello, D. (1984)** : Purified mitochondrial phosphate carrier, improved proteoliposomes and some properties of the transport proteins SH-groups, *Biochemistry* **23**, 1057-1064

LITERATURVERZEICHNIS

- Wohlrab, H. (1986)** : Molecular aspects of inorganic phosphate transport in mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* **853**, 115-134
- Wohlrab, H. und Briggs, C. (1994)** : Yeast mitochondrial phosphate transport protein expressed in *Escherichia coli*. Site directed mutations at threonine-43 and at a similar location in the second tandem repeat (isoleucine-141), *Biochemistry* **33**, 9371-9375
- Xu, M. und Akabas, M. H. (1993)** : Amino acids lining the channel of the gamma-aminobutyric acid type A receptor identified by cysteine substitution, *J. Biol. Chem.* **268**, 21505-21508
- Xu, Y., Mayor, J. A., Gremse, D., Wood, D. O. und Kaplan, R. S. (1995)** : High-yield bacterial expression, purification, and functional reconstitution of the tri-carboxylate transport protein from rat liver mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**, 783-789
- Xu, M. und Akabas, M. H. (1996)** : Identification of channel lining residues in the M2 membrane spanning segment of the GABA_A receptor $\alpha 1$ subunit, *J. Gen Physiol.* **107**, 195-205
- Xu, Y., Kakhniashvili, D. A., Gremse, D. A., Wood, D. O., Mayor, J. A., Walters, D. E. und Kaplan, R. S. (2000)** : The yeast mitochondrial citrate transport protein: probing the roles of cysteines, Arg¹⁸¹, and Arg¹⁸⁹ in transporter function, *J. Biol. Chem.* **275**, 7117-7124
- Yang, N., Geroche, A. L. und Horn, R. (1996)** : Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels, *Neuron* **16**, 113-122
- Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J., Erfle, H., Stucky, K., Kristensen, T. und Ansorge, W. (1990)** : A simplified protocol for fast plasmid DNA sequencing, *Nucleic Acids Res.* **18**, 105-109
- Zotolla, R. J., Cloherty, E. K., Coderre, P. E., Hansen, A., Herbert, D. N. und Carruthers, A. (1995)** : Glucose transporter function is controlled by transporter oligomeric structure. A single, intramolecular disulfide promotes GLUT1 tetramerization, *Biochemistry* **34**, 9734-9747

Lebenslauf

- 12.02.1972 Geboren in Rüsselsheim
- 1978-1982 Grundschule Niedernhausen
- 1982-1984 Förderstufe, Niedernhausen
- 1984-1986 Pestalozzigymnasium, Idstein
- 1986-1991 Frauenlobgymnasium, Mainz
- 1991-1998 Studium der Chemie an der Joh.-Gutenberg-Universität Mainz
- 1995/96 integriertes Auslandsstudium an der University of California at Irvine, USA; Fachrichtung Biochemie; Teilstipendium des DAAD
- 1997/98 Diplomarbeit im Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Joh.-Gutenberg-Universität Mainz bei Herrn Prof. Dr. W.E.G. Müller
- 1998-2001 Promotion am Institut für Biochemie der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Krämer im Rahmen des SFB 189 der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Thema: Untersuchungen zur Struktur und Funktion des mitochondrialen Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae*

Erklärung:

Ich versichere,

daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe;

daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie,

daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Reinhard Krämer betreut worden.

Teilpublikationen:

Engstova, H., Zackova, M., Ruzicka, M., Meinhardt, A., Hanus, J., Krämer, R., Jezek, P (2000): Natural and azido fatty acids inhibit phosphate transport and activate fatty acid anion uniport mediated by the mitochondrial phosphate carrier, *J. Biol. Chem.* **275**

Ich versichere, daß ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffende Veränderung, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Datum: 23.04.2001

Unterschrift:

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Universität zu Köln angefertigt.

Sie wurde mir ermöglicht von Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer, dem an erster Stelle mein aufrichtiger Dank gilt. Insbesondere bedanke ich mich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Übertragung des interessanten und reizvollen Aufgabengebietes. Die engagierte Betreuung trotz seines oft knapp bemessenen Zeitplans und seine zahlreichen wertvollen Ratschläge waren mir eine große Hilfe. Ich danke dafür und möchte in diesem Zusammenhang auch die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, die mir jederzeit geboten wurden, und die angenehme Arbeitsatmosphäre hervorheben.

Frau P.D. Dr. Sabine Waffenschmidt danke ich in erster Linie für die freundliche Übernahme des Koreferates, aber auch für ihre Unterstützung im Bereich meiner privaten Interessen.

Auch Herrn Dr. Michael Massow danke ich sehr herzlich für die kompetente Betreuung, sein unermüdliches Interesse und seine zeitaufwendige Unterstützung - auch außerhalb normaler Arbeitszeiten.

Ein großes Dankeschön geht ebenfalls an meine lieben KollegInnen der „Dritten Welt“ Matthias, Ute und Birgit sowie an die Ehemaligen Eva, Francois, Andreas und Sebastian für die Beantwortung so mancher Frage, ständige Hilfsbereitschaft, jede Menge guter Ratschläge und viele schöne Stunden - trotz zeitweiliger großer Hektik.

Bei allen meinen ehemaligen und jetzigen LaborkollegInnen aus den „anderen Welten“ bedanke ich mich für all die Kleinigkeiten, die zur Bewältigung der Aufgaben und zur guten Stimmung im Arbeitskreis beigetragen haben.

Für das mir entgegengebrachte Verständnis - vor allem in den letzten Wochen, für die ständige Auskunftsbereitschaft und tatkräftige Hilfestellung im Zusammenhang mit der in dieser Arbeit verwendeten LINUX-Software danke ich meinem Freund Chris recht herzlich.

Mein besonderer Dank gilt schließlich meinen lieben Eltern, die mich während meines gesamten Studiums unterstützt und ermutigt haben, auf deren Rückhalt ich mich jederzeit verlassen konnte und die, auch in schwierigen Phasen, immer Verständnis zeigten.