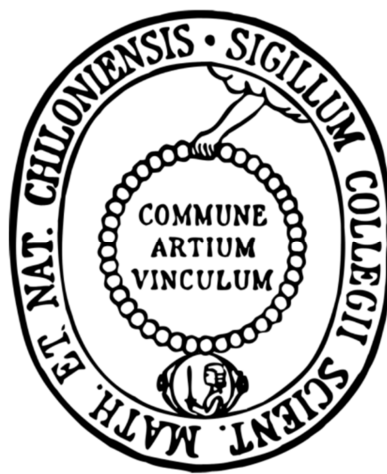


# Aquaglyceroporine: einfache Glyceroporen?

Evaluation der Leitfähigkeit ausgewählter  
Aquaglyceroporine für geladene Solute



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

vorgelegt von  
*Monja Rothert*

Kiel 2017



Erster Gutachter: Prof. Dr. Eric Beitz

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Kunze

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2017

Zum Druck genehmigt: 14.07.2017

gez. Prof. Dr. Natascha Oppelt (Dekanin)



*Für meine Familie*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Proteinfamilie der Aquaporine .....	2
1.1.1 Struktur der Aquaporine .....	3
1.1.2 Rolle der Elektrostatik bei der Selektivität von Aquaporinen.....	6
1.2 Das AQP2 aus <i>T. brucei</i> – Passage des Pentamidin-Kations? .....	9
1.2.1 Struktur und Funktion der TbAQPs.....	10
1.3 Das <i>H. sapiens</i> AQP9 – Leitfähigkeit für Anionen?.....	12
1.3.1 Struktur und Funktion von AQP9.....	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit .....	15
<b>2 Material.....</b>	<b>16</b>
2.1 Enzyme, Kits und Chemikalien.....	16
2.2 Geräte und Materialien.....	18
2.3 Plasmide.....	20
2.4 Oligonukleotide ( <i>primer</i> ).....	21
2.5 Hefestämme ( <i>S. cerevisiae</i> ).....	22
2.6 <i>E. coli</i> Stämme.....	22
2.7 Puffer, Lösungen und Nährmedien.....	23
<b>3 Methoden .....</b>	<b>27</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	27
3.1.1 Isolierung und Reinigung von DNA.....	27
3.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA .....	27
3.1.3 Standardtransformation von <i>E. coli</i> .....	28
3.1.4 Schnelltransformation von <i>E. coli</i> .....	28
3.1.5 Anlegung von Dauerkulturen von <i>E. coli</i> .....	28
3.1.6 Restriktionsverdau von DNA .....	28
3.1.7 Dephosphorylierung .....	29
3.1.8 Agarose-Gel-Elektrophorese .....	29
3.1.9 Ligation.....	30
3.1.10 <i>In vitro</i> Mutagenese .....	30
3.1.11 Einführung einer Punktmutation durch einen Linker .....	31

3.1.12	DNA-Sequenzierung.....	31
3.1.13	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	32
3.1.14	Dauerkultur von <i>S. cerevisiae</i> .....	33
3.2	Proteinchemische Methoden .....	33
3.2.1	Präparation der mikrosomalen Fraktion aus <i>S. cerevisiae</i> .....	33
3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	34
3.2.3	Proteinfällung mittels Trichloressigsäure .....	34
3.2.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	34
3.2.5	Western Blot .....	35
3.3	Funktionsassays in <i>S. cerevisiae</i> .....	36
3.3.1	Wachstumsassays auf Agarplatten .....	36
3.3.2	Bestimmung der Alkalisierung des Mediums mit der pH-Glaselektrode ....	37
3.3.3	Präparation von Hefeprotoplasten .....	37
3.3.4	Lichtstreuungsmessungen mit der Stopped-Flow-Apparatur.....	38
3.4	Bioinformatische Methoden .....	41
3.4.1	Sequenzalignments .....	41
3.4.2	3D-Proteinmodelle.....	41
3.4.3	Berechnung von Poisson-Boltzmann Potenzialen .....	41
3.5	Chemische Synthesen.....	42
3.5.1	Dinitril-pentamidin .....	42
3.5.2	Mononitril-pentamidin.....	43
3.5.3	4-(PEG)- <i>Quantum-Dot</i> gekoppeltes Pentamidin.....	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
4.1	Untersuchungen zum TbAQP2.....	45
4.1.1	Leitfähigkeit von TbAQP2 für organische Kationen .....	45
4.1.2	Inhibitionsstudien mit Pentamidin und Strukturvarianten.....	52
4.1.3	Effekt von Protonophoren auf die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2.....	58
4.1.4	Untersuchungen der Punktmutationen TbAQP2-D <sub>265</sub> A und D <sub>265</sub> N .....	61
4.1.5	Untersuchungen der Punktmutation TbAQP2-L <sub>264</sub> R .....	65
4.2	Untersuchungen zum humanen AQP9 .....	69
4.2.1	Leitfähigkeitsmessungen von Monocarbonsäuren/Monocarboxylaten.....	69
4.2.2	Einfluss von Protonophoren auf die Milchsäureleitfähigkeit von AQP9 .....	77
4.2.3	Theoretische versus reale Monocarbonsäureleitfähigkeit von AQP9 .....	79
4.2.4	Berechnungen der Poisson-Boltzmann Elektrostatik .....	80



4.2.5	Funktionskontrolle verschiedener Aminosäureaustausche in AQP9 .....	82
4.2.6	Leitfähigkeit von AQP9-H <sub>146</sub> A für Monocarbonsäuren .....	83
4.2.7	Leitfähigkeit von AQP9-RR <sub>51,53</sub> EE für Monocarbonsäuren.....	85
4.2.8	Weitere Ergebnisse aus einem Kooperationsprojekt .....	89
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>92</b>
5.1	Fungiert TbAQP2 als Transporter für das Pentamidin-Kation?.....	92
5.2	Pentamidin als nanomolarer Inhibitor der Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 ..	94
5.3	Der Bindemodus von Pentamidin an TbAQP2 .....	96
5.4	TbAQP2 ist nicht das Target von Pentamidin .....	98
5.5	Endozytose – ein möglicher Weg für Pentamidin in die Trypanosomen.....	99
5.6	Kann AQP9 organische Anionen leiten?.....	103
5.7	Die Elektrostatik von AQP9 begünstigt die Passage von Monocarbonsäuren..	106
5.8	Der Weg von Monocarbonsäuren durch AQP9 .....	110
5.9	Ist die Monocarbonsäureleitfähigkeit von AQP9 physiologisch relevant?.....	111
5.10	Aquaglyceroporine: einfache Glyceroporen? – ein Fazit.....	113
<b>6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>116</b>
<b>8</b>	<b>Summary .....</b>	<b>118</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>119</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
APD	3-Amino-1,2-propandiol
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
<i>Aqua bidest.</i>	doppelt destilliertes Wasser
ar/R-Filter	aromatischer Arginin-Selektivitätsfilter
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
CCCP	Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorphenylhydrazon
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	2,4-Dinitrophenol
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
$E_a$	Aktivierungsenergie
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
g	Fallbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunden
HA	Hämagglutinin
Hs	<i>Homo sapiens</i>

IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
ISG	<i>invariant surface glycoprotein</i>
kDa	Kilodalton
Lp	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minuten
MIP	<i>major intrinsic protein</i>
Mm	<i>Mus musculus</i>
MMP	Milchpulver
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
NaH	Natriumhydrid
NIP	<i>nodulin 26-like intrinsic protein</i>
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Sm	<i>Schistosoma mansoni</i>
β-HB	β-Hydroxybutyrat
β-HB-säure	β-Hydroxybuttersäure
Tb	<i>Trypanosoma brucei</i>

TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tg	<i>Toxoplasma gondii</i>
TLF	<i>trypanolytic factor</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U g <sup>-1</sup>	Units per Gramm
U min <sup>-1</sup>	Umdrehungen pro Minute
VSG	<i>variant surface glykoprotein</i>
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>

## 1 Einleitung

Biologische Membranen bilden die Außengrenzen von Zellen und Zellkompartimenten zu ihrer Umwelt und sind ein existenzieller Bestandteil des Lebens. Zwei Molekülschichten an Lipiden bilden eine dünne Barriere, die den passiven Durchtritt polarer Moleküle verhindert (1). Der lebenswichtige Austausch der Zelle mit ihrer Umwelt wird durch eingebettete Proteine gewährleistet. 30 % der natürlich vorkommenden Proteine befinden sich in der Lipiddoppelschicht biologischer Membranen und bewerkstelligen dort die gezielte Aufnahme von Nähr- und Botenstoffen, die Zellkommunikation, sowie die Ausschleusung von Abfall- und Stoffwechselprodukten (1). Der Anteil an Protein an der Gesamtmasse der Plasmamembranen einer typischen Zelle beträgt 50 % (2). Den mit Abstand kleinsten Anteil am Gesamtprotein bildet die Klasse der Rezeptoren (3). Eine durchschnittliche Zelle bildet an ihrer Oberfläche 10.000-20.000 Hormonrezeptoren. Dem gegenüber steht eine um vier Größenordnungen höhere Anzahl an Strukturproteinen, Enzymen, Transportern und Kanälen (4). Ohne letztere wäre die Passage von Ionen, Nährstoffen und anderen polaren Molekülen über die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran nicht möglich. Ein polares Molekül müsste für einen Durchtritt durch die Membran zunächst seine Hydrathülle abstreifen und 3 nm durch ein Medium wandern, in dem es schlecht löslich ist (3). Die Aktivierungsenergie für diesen Vorgang ist so hoch, dass diese passive Diffusion nicht stattfindet, sondern die Aufnahme durch spezialisierte Transporter und Kanäle übernommen wird. Eine Ausnahme bildet Wasser, selbst ein polares Molekül, welches passiv durch biologische Membranen diffundiert, um das osmotische Gleichgewicht zu erhalten (3). Die Aktivierungsenergie für die passive Diffusion von Wasser durch eine Lipiddoppelschicht liegt bei  $E_a > 10 \text{ kcal mol}^{-1}$  (5). Als erstaunlich galt lange die in einigen Membranen gefundene deutlich geringere Aktivierungsenergie für die Passage von Wasser. So entspricht die Permeabilität der Erythrozytenmembran für Wasser mit einer Aktivierungsenergie von  $E_a = 5 \text{ kcal mol}^{-1}$  dem Wert der Diffusion von Wasser in Lösung (6). Die Erklärung lieferte das Aquaporin-1 (AQP1), ein Kanalprotein, welches die Diffusion von Wasser durch die Lipiddoppelschicht erlaubt (7). Die Entdeckung der Aquaporine zog einen Paradigmenwechsel nach sich (8). Nachdem lange angenommen wurde, dass Wasser durch rein passive Diffusion Biomembranen überquert, wusste man nun, dass hauptsächlich spezialisierte Kanalproteine für die Diffusion verantwortlich sind (7). Es folgte die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung weiterer Vertreter dieser neu entdeckten Familie von Membranproteinen.

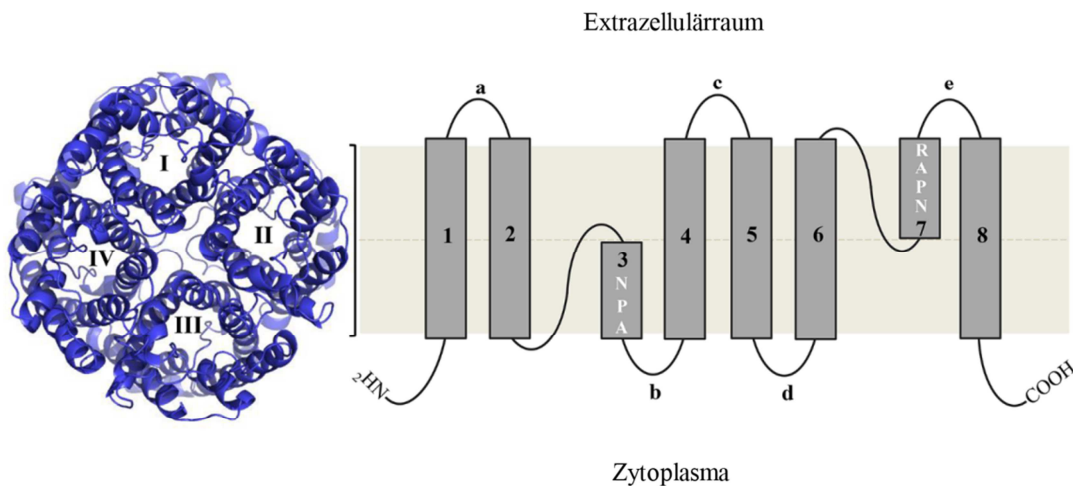
## 1.1 Die Proteinfamilie der Aquaporine

Durch Sequenzanalysen im Rahmen von Genomprojekten verschiedener Spezies folgte eine Kaskade weiterer putativer Proteine, die sich zur *major intrinsic protein*-Familie (MIP) zusammenfassen lassen. In der MIPMod Data Bank befinden sich 1507 nicht-redundante MIP-Sequenzen aus 481 Organismen durch alle Spezies und Subspezies hinweg (Stand 05/2017) (9). Phylogenetische Analysen zeigen die Aufspaltung der MIP-Superfamilie in zwei ursprüngliche Gruppen, die orthodoxen Aquaporine und die Aquaglyceroporine, die sich während der Evolution in einer frühen Genduplikation formten (10). Viele dieser katalogisierten MIP-Sequenzen wurden heterolog hergestellt und funktionell charakterisiert. Darunter befinden sich auch Aquaporine und Aquaglyceroporine aus Parasiten wie beispielsweise *Toxoplasma gondii* (11), *Plasmodium falciparum* (12) und *Trypanosoma brucei* (13), auch im Hinblick darauf diese als neue Arzneistofftargets adressieren zu können. Während die Funktion orthodoxer Aquaporine auf die Leitfähigkeit für Wasser begrenzt ist, leiten Aquaglyceroporine auch kleine neutrale Solute wie Glycerol, und Harnstoff. Dieser Fluss hängt von dem vorherrschenden osmotischen bzw. chemischen Gradienten ab, welcher automatisch die Richtung bestimmt (14). Abweichend von diesem Grundschemata, gibt es einige Aquaporine und Aquaglyceroporine, deren Leitfähigkeit jedoch nicht auf die charakteristischen Solute Wasser und Glycerol beschränkt ist, sondern die auch die Passage ungewöhnlicher Solute erlauben. So leitet das AQP1 beispielsweise neben Wasser auch die Gase Kohlenstoffdioxid und Stickstoffmonoxid (15), AQP8 leitet Wasserstoffperoxid (16, 17) und für die AQP7 und AQP9 erwies sich eine Leitfähigkeit für  $\text{As}(\text{OH})_3$  und  $\text{Sb}(\text{OH})_3$  (18). Die genauere Betrachtung zeigt die strukturelle Ähnlichkeit zu den Leitsoluten. Beispielsweise ähneln die Moleküldurchmesser der Gase Kohlenstoffdioxid und Stickstoffmonoxid dem des Wassermoleküls und Wasserstoffperoxid hat ein vergleichbares Dipolmoment. Die trivalenten Antimon und Arsen wiederum passieren bei physiologischem pH als ungeladene Hydroxide und weisen damit eine Strukturähnlichkeit zum Glycerol auf (19). Allen genannten Soluten ist also gemein, dass sie ungeladen vorliegen oder in ihrer ungeladenen Form passieren. Die zusätzlich erworbenen Funktionen von Aquaglyceroporinen scheinen keinen Trend der gesamten Familie darzustellen, sondern Paraloge, d.h. eine durch Genduplikation innerhalb der gleichen Spezies entstandene Anpassung an besondere Umweltbedingungen (10).

### 1.1.1 Struktur der Aquaporine

Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse einiger humaner und bakterieller Aquaporine, wie AQP0, AQP1, AQP4, *E.coli* GlpF und AQPZ, geben Aufschluss über das grundlegende Layout der MIP-Proteinfamilie (20–25).

Aquaporine bilden Homotetramere, wobei jedes Protomer eine eigene Funktionseinheit bildet. Die Zentralpore eines jeden Tetramers zeigt keine Leitfähigkeit für Solute, aber ermöglicht den Gasaustausch der Zelle mit ihrer Umwelt (26). Jede monomere Funktionseinheit wird aus sechs Transmembranspannen und zwei Halbhelices  $\alpha$ -helicaler Konformation gebildet, die durch fünf Schleifen miteinander verknüpft sind. N- und C-Terminus sind im Zytosol lokalisiert (27). Die Protomersequenz lässt sich gedanklich zwischen Transmembranspanne 4 und 5 in zwei Segmente trennen, die je ein imperfektes Repetitiv des anderen darstellen und vermutlich durch intragenetische Genduplikation hervorgegangen sind (28). Kernmotive sind zwei durch alle Spezies und Subspezies konservierte Asparagin-Prolin-Alanin-Folgen (NPA-Motive), die die zwei Halbhelices über Van-der-Waals-Kräfte der beiden Proline miteinander verbinden (21). Nur ca. 4 % der bekannten Sequenzen zeigen veränderte NPA-Regionen, wobei dies vorrangig den Austausch des Alanins bedeutet (10). Oberhalb der NPA-Region befindet sich der ebenfalls konservierte aromatische Arginin-Selektivitätsfilter (ar/R), der die engste Stelle im Protein markiert (**Abb. 1.1**).

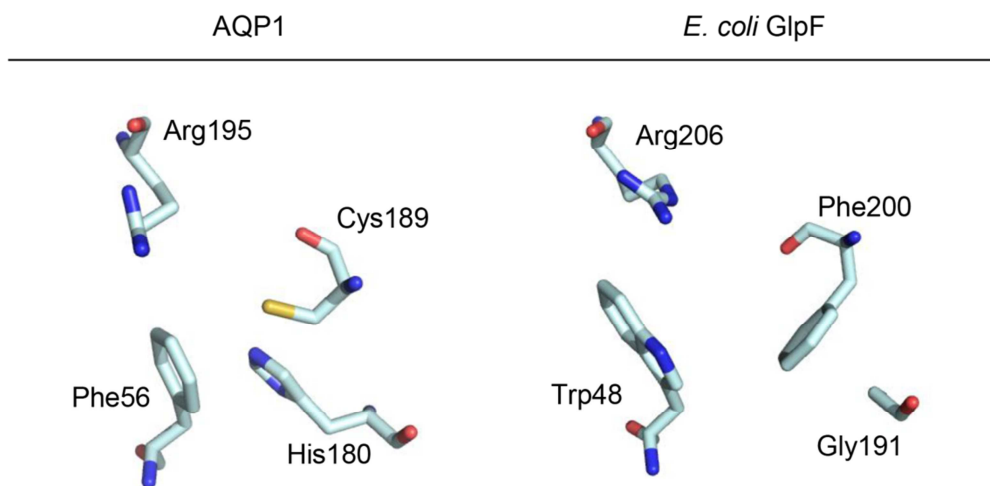


**Abb. 1.1:** In Pymol generierte Quartärstruktur von AQP1 (PDB#1J4N) bestehend aus vier Monomeren I-IV (links). Der Aufbau eines einzelnen Monomers mit den Transmembranspannen 1,2,4,5,6 und 8, den Halbhelices 3 und 7, sowie den Schleifen a-e, ist schematisch gezeigt. Die NPA-Regionen und das Arginin des ar/R-Selektivitätsfilters sind weiß hervorgehoben. Die Darstellung ist angelehnt an (29).

Der Durchmesser der Engstelle und die Aminosäuren, die das Arginin des ar/R-Selektivitätsfilters auf einer Ebene umspannen, determinieren, ob Wasser oder größere neutrale Moleküle wie Glycerol passieren, und damit die Zugehörigkeit zur Unterfamilie der orthodoxen

## Einleitung

Aquaporine oder Aquaglyceroporine (30). Die Kristallstruktur von AQP1, dem Prototypen für orthochoxe Aquaporine, zeigt an der engsten Stelle einen Porendurchmesser von 2,8 Å, was dem Durchmesser eines Wassermoleküls entspricht. Der ar/R-Selektivitätsfilter wird neben dem Arginin195 und einem Phenylalanin56 durch die hydrophilen Aminosäuren Histidin an Position 180 und Cystein an Position 189 geprägt (21). Die Kristallstruktur von *E. coli* GlpF, dem Prototypen für Aquaglyceroporine, zeigt an der engsten Stelle einen Durchmesser von 3,4 Å. Dies entspricht dem Abstand zwischen der Hydroxylgruppe eines Polyols und dem entsprechenden Kohlenstoff (31). Im Vergleich zum AQP1 befindet sich im Selektivitätsfilter ein neutrales Glycin anstelle des polaren Histidins und das Cystein ist durch ein Phenylalanin substituiert. Dieses gibt der ar/R-Filterregion zusammen mit dem Tryptophan48 eine hauptsächlich lipophile Prägung (32) (**Abb. 1.2**).



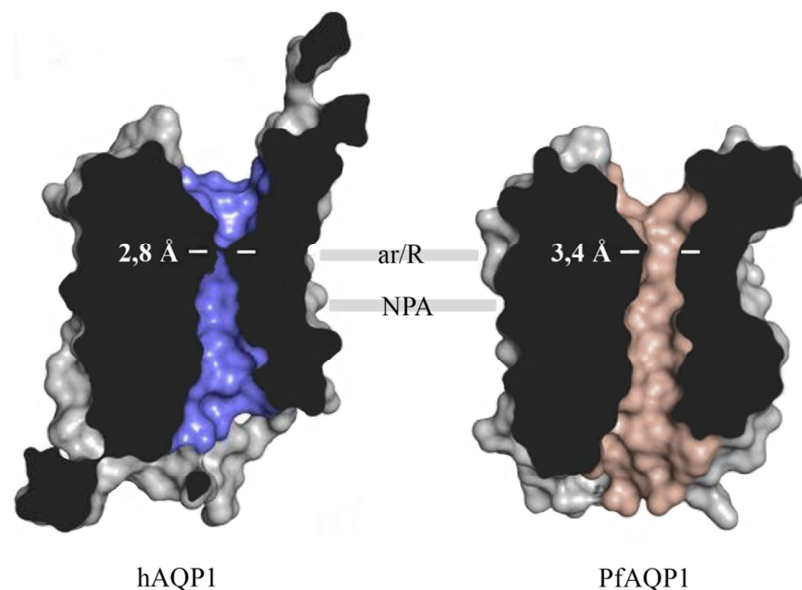
**Abb. 1.2:** Darstellung der Aminosäuren des ar/R-Selektivitätsfilters von *E. coli* GlpF (rechts) und AQP1 (links) in der Aufsicht von periplasmatischer Seite. Die Abb. wurde basierend auf den Koordinaten des *E. coli* GlpF Kristalls (PDB#1FX8) und des AQP1 Kristalls (PDB#1J4N) mit Pymol erstellt.

Eine Betrachtung des vertikalen Querschnitts von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen zeigt eine charakteristische, rigide Sanduhrstruktur der Kanalpore. Auf extrazellulärer und zyttoplasmatischer Seite sind die Öffnungen ca. 15 Å breit und verjüngen sich schnell auf ungefähr 4 Å zu einer etwa 20 Å langen Pore mit der engsten Stelle auf Höhe des ar/R-Selektivitätsfilters (33, 34) (**Abb. 1.3**). Die mit der Membran in Kontakt stehenden Bereiche sind durch überwiegend hydrophobe Aminosäuren geprägt (33). Die Pore ist so schmal, dass nur eine lineare Kette von Wasser- oder Solutmolekülen in vertikaler Ausrichtung den Kanal durchqueren kann. Im AQP1 werden die Dipole des Wassers in fein abgestimmten Rotationsbewegungen auf die Achse des Proteins ausgerichtet; die Passage von Glycerol durch *E. coli* GlpF verläuft mit den Dipolen senkrecht zur Achse (35). Ein Molekül, welches in die Porenregion eintritt, muss sich zunächst aus seinem Bulkwasser lösen, was einen energieverbrauchenden Prozess



## Einleitung

darstellt (24). Ein Wassermolekül selbst gilt als hydratisiert, wenn es vier weitere Wassermoleküle koordiniert (36, 37). In der engen Kanalpore kann ein Wassermolekül jedoch nur zwei weitere koordinieren und die Energiebarriere für die Dehydratisierung ist hoch (24). Kompensiert wird dies durch die amphiphile Oberfläche im Poreninneren. Von der hydrophoben Oberfläche ragen an einer Seite die Carbonylgruppen der Aminosäurehauptketten in das Poreninnere und bilden eine hydrophile Schnur (*hydrophilic backbone*), an der sich der Solut durch Knüpfung neuer Wasserstoffbrücken durch den Kanal hangeln kann (24). In orthodoxen Aquaporinen ist das polare Histidin für die Passage von Wasser entscheidend. In Aquaglyceroporinen wird durch das amphiphile Layout zusätzlich eine günstige Konformation des Solut fixiert. Während die Hydroxylgruppen eines passierenden Polyols mit dem *hydrophilic backbone* Wasserstoffbrücken ausbilden, wird die Alkylkette über Van-der-Waals-Kräfte stabilisiert (24). Damit geht auch eine Stereoselektivität einher. So ist eine gleichseitige Anordnung aller Hydroxylgruppen, wie im Glycerolmolekül, energetisch günstig und spiegelt sich in hohen Raten für die Leitfähigkeit wider. Eine versetzte Anordnung der Hydroxylgruppen wie beispielsweise im Mannitol resultiert in niedrigeren Raten (38).



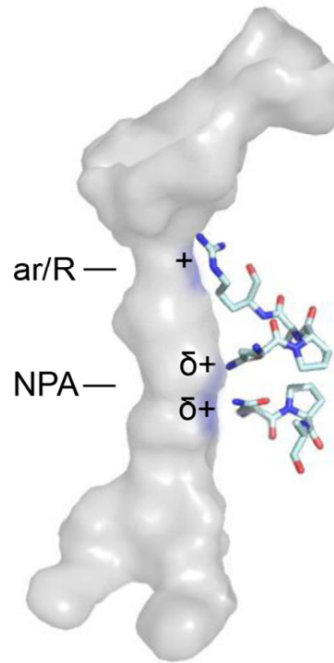
**Abb. 1.3:** 3D-Struktur des orthodoxen Aquaporins hAQP1 (PDB#1FX8) und des Aquaglyceroporins PfAQP1 (PDB#3C02). Die Abbildungen der Proteinstrukturen wurden von André Golldack bereitgestellt (39).

Es lässt sich festhalten, dass die Engstelle des ar/R-Selektivitätsfilters zu einer Selektion über die Molekülgröße des Solutes führt und Wechselwirkungen mit diesem über die Aminosäurekomposition der Filterregion und Porenoberfläche begünstigt werden. Ein weiterer Faktor ist der Ausschluss von positiver Ladung im Zusammenspiel mit der NPA-Region. Darauf soll im Folgenden unter 1.1.2 noch näher eingegangen werden.

### 1.1.2 Rolle der Elektrostatik bei der Selektivität von Aquaporinen

Aquaporine und Aquaglyceroporine zeigen eine hochspezifische Leitfähigkeit für Wasser und neutrale Solute wie das namensgebende Glycerol, während die Passage von Protonen und Kationen über einen strengen Ladungsausschluss verhindert wird (34).

Die Vermeidung der passiven Diffusion von Protonen und Kationen über Aquaporine und Aquaglyceroporine ist unerlässlich, um die Lebensfähigkeit von Zellen aufrecht zu erhalten (21). In Anbetracht der hohen Anzahl von Aquaporinen in biologischen Membranen – in roten Blutkörperchen sind es bis zu 200.000 – wird deutlich, wie notwendig ein funktionsfähiger Protonen- und Kationenfilter für die Zelle ist (40, 41). Protonen und Kationen spielen eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen, wie beispielsweise der Membranverschmelzung, dem vesikulären Transport, dem Soluttransport und der ATP-Synthese. Ihr Fluss über biologische Membranen bedarf einer strengen Regulierung durch spezialisierte Transporter wie  $H^+$ -ATPasen (21). Ein klassisches Beispiel für eine unkontrollierte Leitung von Protonen und monovalenten Kationen ist das bakterielle, porenbildende Protein Gramicidin A aus *Bacillus brevis*, auf dessen Einbau in biologische Membranen ein Zusammenbruch des Membranpotentials folgt (42). Dem Bakterium dient dies als Abwehrmechanismus; in der Forschung wird Gramicidin als Ionophor eingesetzt (42). Eine Leitung von Protonen durch die wassergefüllte Pore von Gramicidin A erfolgt durch ein schnelles, kettenreaktionsartiges Umklappen von Wasserstoffbrücken im Sinne des Grotthuß-Mechanismus (43). In der wassergefüllten Pore der Aquaporine hingegen findet kein Umklappen von Wasserstoffbrücken analog zum Gramicidin A statt. Eine theoretische Erklärung ist die Durchbrechung des Grotthuß-Mechanismus durch die Amidgruppen der zwei Asparagine der NPA-Region, die ins Poreninnere ragen und Wasserstoffbrücken zum Sauerstoffatom des Wassers ausbilden (21). Es kommt zu einem stetigen Wechsel der Bindungspartner durch nachrückendes Wasser. Dabei erfolgt die Anordnung der Wasserstoffatome so versetzt, dass ein Klappen der Bindungen verhindert wird (21). Der Vergleich der Tertiärstruktur eines Aquaporins mit dem auf den Transport von Kationen spezialisierten  $K^+$ -Kanal zeigt ein inverses Arrangement. Während der in der Porenmittle auf 10 Å geweitete Kaliumkanal ein Kaliumion auch im hydratisierten Zustand passieren lässt, stellt die Sanduhrform der Aquaporine eine dielektrische Barriere dar, die positive Ladung abstößt (44). Die elektrostatische Barriere bildet sich zum einen aus dem Arginin des ar/R-Selektivitätsfilters sowie der NPA-Region, deren Helix-Dipole ein weiteres positives Feld generieren (**Abb. 1.4**).



**Abb. 1.4:** Schematische Darstellung des Protonenausschlussfilters. Die 3D-Struktur wurde basierend auf den Koordinaten des *E. coli* GlpF Kristalls (PDB#1FX8) mit Pymol erstellt.

Der vollständige Ausschluss von sowohl Protonen als auch Kationen wird durch ein Zusammenspiel des ar/R-Selektivitätsfilters und der NPA-Region erreicht. So ist der ar/R-Selektivitätsfilter vor allem für den Ausschluss von Protonen wichtig, während die NPA-Region hauptsächlich anorganische Kationen an der Passage hindert (34, 45, 46). Ergänzend zu der Abstoßung positiver Ladung durch das Arginin und die NPA-Energiebarriere spielt auch hier der Durchmesser der Engstelle eine Rolle. Für eine Passage müsste ein Proton oder Alkali-Kation seine verhältnismäßig große Hydrathülle abstreifen, was mit abnehmendem Porendurchmesser mit einer erhöhten Dehydratisierungsenergie einhergeht (47).

Berechnungen von Poisson-Boltzmann Potentialen entlang der Pore ausgewählter Aquaporine und Aquaglyceroporine zeigen, dass neben der Selektion nach Größe und Ladung durch den ar/R-Selektivitätsfilter und die NPA-Region auch das elektrostatische Gesamtprofil die Feinselektion beeinflusst (48). Die Poisson-Boltzmann-Gleichung bezieht das elektrostatische Potential auf die dielektrischen Eigenschaften von Solut (gemeint ist hier das Protein) und Solvent, die Ionenstärke des Solvent, die Zugänglichkeit der inneren Oberfläche des Solutes für Ionen, sowie die Verteilung der Partialladung einzelner Solutatome (49, 50). Die computergestützte Auflösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung ist eine numerische Herangehensweise, die Ladungsverteilung in Makromolekülen wie Proteinen zu evaluieren (51). In den Berechnungen ergeben sich für die verschiedenen Klassen charakteristische Profile. In orthodoxen Aquaporinen gestaltet sich der Verlauf ebenehmäßig, leicht negativ mit einem stark

## Einleitung

positiven Trend auf periplasmatischer Seite und einem Maximum auf Höhe des ar/R-Selektivitätsfilters (48). Im untypischen orthodoxen AQP0 mit geringer Wasserleitfähigkeit ergibt sich zusätzlich ein stark negatives Potential auf cytoplasmatischer Seite. Aquaglyceroporine hingegen weisen ein gleichmäßig neutrales bis leicht negatives Potential auf. Die Autoren interpretieren dies als evolutionäre Strategie Glycerol und apolare Moleküle dem Wasser vorzuziehen (48). Das bifunktionale PfAQP1 aus *Plasmodium falciparum*, welches sowohl Wasser als auch Glycerol mit hoher Rate leitet (52, 53), zeigt ein durchweg negatives Potential mit einem Peak am ar/R-Selektivitätsfilter, generiert durch zwei Glutamate, die zu einer Abschirmung der positiven Ladung führen (48).

Die zugrunde liegenden Mechanismen der Feinselektion von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen sind noch nicht vollständig verstanden und viele Erkenntnisse basieren auf Computermodellen. Dennoch wird die Relevanz der Elektrostatik in der sonst so starren, unbeweglichen Proteinfamilie deutlich. Ein Aquaporin ist anders als beispielsweise zahlreiche Ionenkanäle und Transporter nicht zu Konformationsänderungen befähigt, die es vor dem Eindringen unerwünschter Solute schützt, sondern ist einzig auf die Aminosäurekomposition der Oberfläche angewiesen. Auf Grundlage aller bisherigen Erkenntnisse können bedingte Vorhersagen getroffen werden, ob ein Molekül zu einer Passage durch ein Aquaglyceroporin befähigt ist. Es muss schmaler als 3,4 Å und kleiner als 300 Da sein, hydrophile Gruppen aufweisen, um in Wechselwirkung mit dem *hydrophilen backbone* zu treten und darf keine positive Ladung tragen, um nicht an der elektrostatischen Barriere der Restriktionsstellen zu scheitern (31). In den folgenden Kapiteln soll auf zwei Aquaglyceroporine eingegangen werden, die sich augenscheinlich als Ausnahmen abheben, ausschließlich einfache Glyceroporen für neutrale Solutmoleküle zu sein.

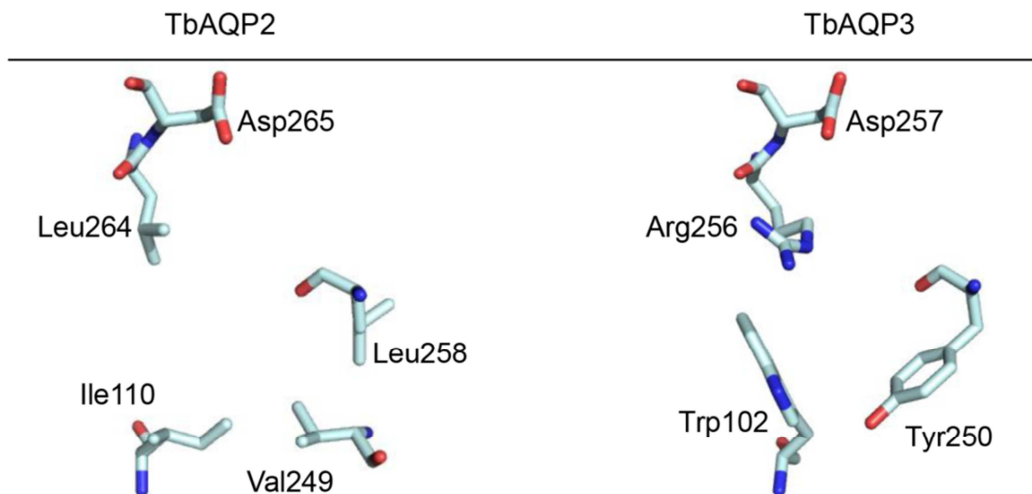
## 1.2 Das AQP2 aus *T. brucei* – Passage des Pentamidin-Kations?

Pentamidin ist ein 340 Da großes, di-kationisches Arzneistoffmolekül, welches seit Anfang der 1930er Jahre für die Behandlung der Schlafkrankheit auf dem Markt ist (54). Diese wird durch Trypanosomen, humanpathogene Protozoen, ausgelöst, die durch den Stich der Tsetsefliege *Glossina morsitans* auf den Menschen übertragen werden. Die Schlafkrankheit stellt vor allem in Afrika im sogenannten „Tsetse-Gürtel“ südlich der Sahara ein großes Problem dar (55). Jährlich kommt es dort zu 50.000-70.000 Neuinfektionen und das Spektrum verfügbarer Arzneistoffe gegen diese Erkrankung ist nicht nur begrenzt, sondern ihr Wirkmechanismus im Detail noch unverstanden (55). Eine Hochdurchsatzanalyse, die zur Entschlüsselung von Wirkprinzipien auf dem Markt befindlicher Arzneistoffe gegen Trypanosomen beitragen sollte, konnte zeigen, dass ein einzelner Genknockout in Trypanosomen zu einer Resistenz der Erreger gegenüber dem Pentamidin führt (56).

Bei diesem Gen handelt es sich um das *T. brucei* Aquaglyceroporin-2 (TbAQP2). Der *knockout* von TbAQP2 führt zu einer 16-fachen Erhöhung des EC<sub>50</sub>-Wertes im Vergleich zu Wildtyp-Trypanosomen (56). Da die *knockout*-Stämme in ihrer Lebensfähigkeit nicht gemindert sind, scheidet TbAQP2 als Arzneistofftarget aus. Vielmehr deckt sich seine Funktion mit dem in der Literatur häufig erwähnten HAPT1 – einem *high affinity pentamidine transporter* (57). Das Kanalprotein TbAQP2 wird in diesem Zusammenhang als Eintrittspforte für den Arzneistoff im Sinne eines Transporters diskutiert und es wird zusätzlich über eine Abhängigkeit vom Protonengradienten spekuliert (57–59). In diesem Zusammenhang schwimmt die begriffliche Grenze zwischen TbAQP2 als Kanalprotein oder Transporter. Die postulierte Passage des Pentamidins durch TbAQP2 erscheint bei dem literaturbekannten Selektionsmechanismus von Aquaglyceroporinen mindestens ungewöhnlich. TbAQP2 wäre demzufolge ein Aquaglyceroporin, welches sowohl der elektrostatischen als auch der sterischen Barriere in den Konstriktionsstellen zum Trotz mit dem Pentamidin ein nach dem bisherigen Kenntnisstand viel zu großes, zweifach positiv geladenes Arzneistoffmolekül durch seine Kanalpore zu leiten vermag. Dass Pentamidin, um seine Wirkung zu entfalten in den Intrazellulärraum der Trypanosomen gelangen muss, ist allerdings unumstritten. Das nach neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen postulierte Wirkprinzip ist eine Bindung von Pentamidin an mitochondriale DNA im Kinetoplasten und eine Zerstörung des Membranpotentials (60). Das heißt, die Targets sind unspezifisch und eine Selektivität wird vor allem durch die schnellen Aufnahmeraten in Trypanosomen im Vergleich zur Wirtszelle erreicht (59). In diesem Zusammenhang ist die Rolle von TbAQP2 bei der Aufnahme des Pentamidins interessant.

### 1.2.1 Struktur und Funktion der TbAQPs

Im Genom des Erregers *T. brucei* finden sich drei Gensequenzen, die für die Aquaglyceroporine bestehend aus 321 (TbAQP1), 312 (TbAQP2) und 304 (TbAQP3) langen Aminosäureketten codieren. TbAQP1-3 zeigen eine Sequenzidentität von 77 % untereinander, wobei die größte Verwandtschaft zwischen TbAQP2 und TbAQP3 zu finden ist, deren Gene in Nachbarschaft zueinander lokalisiert und wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden sind (13). Ein detaillierter Sequenzvergleich zeigt die Sonderstellung von TbAQP2. Weisen TbAQP1 und TbAQP3 die zwei charakteristischen, hochkonservierten NPA-Regionen auf, besitzt TbAQP2 ein unkonventionelles NSA/NPS-Motiv (13). In Kombination mit einem fehlenden Arginin im ar/R-Selektivitätsfilter, welches durch ein neutrales Leucin ersetzt ist, ist dieses Aminosäurelayout der Filterregion einzigartig (58). Es liegen zurzeit keine Kristallstrukturen vor und Betrachtungen der Proteinstruktur basieren auf Modellen. Eine Beleuchtung der den Selektivitätsfilter in einer Ebene umschließenden Aminosäuren zeigt eine weitere Besonderheit. Während der Filter von TbAQP3 durch typischerweise aromatische Aminosäuren wie Tyrosin und Tryptophan gebildet wird, wird dieser im TbAQP2 durch kleinere, aliphatische Aminosäuren wie Leucin, Isoleucin und Valin geprägt (58) (**Abb. 1.5**). Diese Ansammlung von Aminosäuren mit kleinerer Raumerfüllung könnte eine erweiterte Filterregion bedingen, was potenziell auf eine Passage größerer Moleküle hindeuten könnte.



**Abb. 1.5:** Darstellung der Aminosäuren des ar/R-Selektivitätsfilters von TbAQP2 (links) und TbAQP3 (rechts) in der Aufsicht von periplasmatischer Seite. Die Modelle wurde basierend auf dem *E. coli* GlpF Kristalls (PDB#1FX8) generiert und die Abb. in Pymol erstellt.

## Einleitung

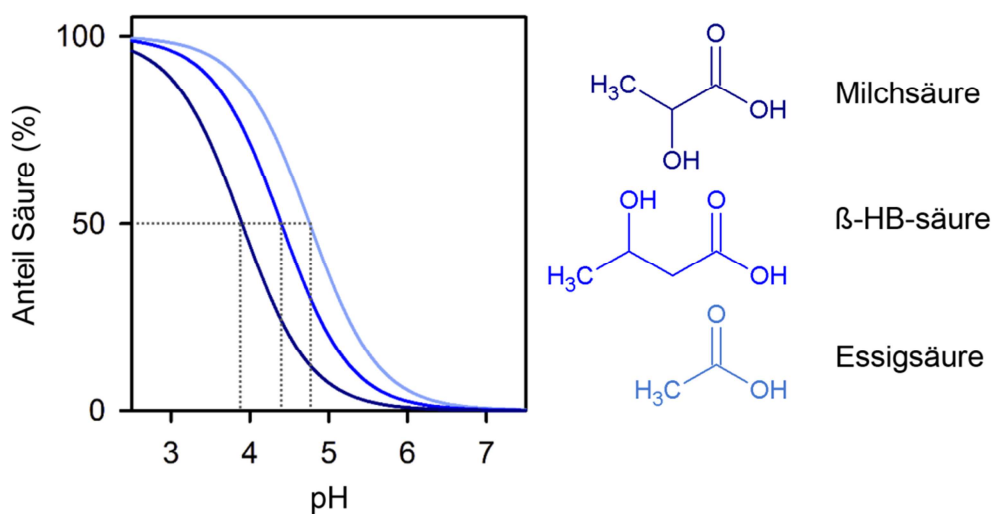
Für die TbAQPs konnten bisher Leitfähigkeiten für die Solute Harnstoff, Glycerol, Dihydroxyaceton, arsenige- und antimonige Säure nachgewiesen werden (13, 61). Die Wasserleitfähigkeit zeigt Raten, die zwischen denen von orthodoxen Aquaporinen und denen von Aquaglyceroporinen liegen (13). Aus phylogenetischer Sicht zeigen die TbAQPs eine größere Verwandtschaft zu den humanen Aquaglyceroporinen AQP3, AQP7, und AQP9, als zu orthodoxen Aquaporinen (13, 61), was sich auch auf Funktionsebene in diesem relativ breiten Solutspektrum widerspiegelt. Die physiologische Funktion der TbAQP1-3 liegt vermutlich in der Osmoregulation des Parasiten und der Leitung von Glycerol, welches ein alternatives Substrat für die Energiegewinnung der Blutform unter anaeroben Bedingungen darstellt (13, 62–64). Dass diese Funktion kein kritischer Parameter ist, zeigt die Fähigkeit von Zelllinien, die einen *knockout* von TbAQP1, TbAQP2 oder TbAQP3 aufweisen, trotz der fehlenden Aquaporine osmotischem Stress standzuhalten und die Glycerolaufnahme mit einem alternativen Glyceroltransporter zu ermöglichen (65).

TbAQP2 zeigt keine Auffälligkeiten im Solutspektrum im Vergleich mit anderen Aquaglyceroporinen. Allerdings wurde die Leitfähigkeit für positive geladene Solute bisher nicht gesondert untersucht. In Anbetracht des unkonventionellen Selektivitätsfilters bedarf es gezielter Funktionsanalysen, um über die Rolle von TbAQP2 im Zusammenhang mit der Pentamidinaufnahme in Trypanosomen endgültige Aussagen treffen zu können.

### 1.3 Das *H. sapiens* AQP9 – Leitfähigkeit für Anionen?

Die Abstoßung positiver Ladung durch den ar/R-Selektivitätsfilter und die NPA-Region scheint von größerer Bedeutung zu sein als die Feinselektion zwischen strukturell ähnlichen neutralen Soluten (31). Die Barriere sorgt für einen strengen Ausschluss von Protonen und Kationen (1.1.2). In diesem Zusammenhang tut sich ergänzend die Frage auf, ob ein positives elektrostatisches Feld, welches positive Ladung abstößt, nicht auch gleichzeitig zur Anziehung negativer Ladung beitragen kann. Die Permeabilität von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen für Anionen ist jedoch bislang wenig untersucht.

Ein bisher einzigartiges Beispiel für Anionenleitfähigkeit ist das humane Aquaporin-6 (AQP6), welches in der Membran intrazellulärer säuresezernierender Vesikel des renalen Sammelrohrs angesiedelt ist (66). Für AQP6 konnte eine Leitfähigkeit für die anorganischen Anionen  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{Cl}^-$  nachgewiesen werden (67, 68).  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{Cl}^-$  sind die Anionen starker anorganischer Säuren mit pKs-Werten  $< 0$  und liegen im physiologischen pH-Bereich vollständig dissoziiert vor. Somit kann im Falle von AQP6 von einer Passage eines echten Anions gesprochen werden. Komplexer wird die Betrachtung der Leitfähigkeit von Aquaglyceroporinen für die Anionen von organischen Monocarbonsäuren. Monocarboxylate sind die Salze schwacher organischer Säuren mit pKs-Werten von 3,9 für Laktat, 4,4 für  $\beta$ -Hydroxybutyrat und 4,8 für Acetat. Das hat zur Folge, dass ihr Protonierungsgrad im physiologischen Bereich stark vom vorherrschenden pH-Wert abhängt (69) (**Abb. 1.6**). Die Verschiebung um eine pH-Einheit ändert das Verhältnis von Monocarbonsäure zu Monocarboxylat um eine Größenordnung.



**Abb. 1.6:** Darstellung des pH-abhängigen Anteils an ungeladener Säure für die Substrate Milchsäure (dunkelblau),  $\beta$ -Hydroxybuttersäure (mittelblau) und Essigsäure (hellblau). In gestrichelter Linie sind die einzelnen pKs-Werte markiert.



## Einleitung

In der Literatur sind wenige Beispiele zu finden, in denen diese Fragestellung adressiert ist. Das pflanzliche Aquaglyceroporin aus den Wurzelspitzen der Schotenkresse, *Arabidopsis thaliana nodulin 26-like intrinsic protein 2;1* (AtNIP2;1), sticht im *Xenopus Oocyten*-Schwelltest durch seine Leitfähigkeit für Milchsäure/Laktat hervor, ist aber nur geringfügig permeabel für die familiencharakteristischen Solute Wasser und Glycerol (70, 71). Dabei ergibt sich in einem pH-Intervall von 3,5-7 eine positive Korrelation zwischen Leitfähigkeit und Anteil an neutraler Milchsäure; bis pH 4,5 bleibt die Permeabilität unter der theoretischen Erwartung (70). In einem phänotypischen Assay mit Milchsäure/Laktat als einziger Kohlenstoffquelle zeigen Hefezellen Wachstum, die eine Deletion des endogenen Laktattransporters *jen1* in sich tragen, aber gleichzeitig die *Lactobacillus plantarum* Aquaglyceroporine LpGlpF1 oder LpGlpF4 bilden (72). Da sich die Gene für LpGlpF1 und LpGlpF4 zudem im Laktat-Razemisierungs-Operon der Bakterien befinden, lässt dieses Ergebnis eine Rolle der beiden Aquaglyceroporine im Milchsäuremetabolismus vermuten (72). Ein weiteres Beispiel ist das *Schistosoma mansoni* Aquaglyceroporin (SmAQP) im Tegument des adulten Pärchenegels. SmAQP erlaubt im *Xenopus Oocyten*-Schwelltests die Passage von Milchsäure/Laktat. Eine Senkung des pH-Wertes von 7,4 auf 6,3 führt zu einer Verdreifachung der Permeabilität, was auch hier die Präferenz von SmAQP für ungeladene Milchsäure nahelegt (73). Es wird jedoch nicht geklärt, wie es bereits im pH-Milieu von 7,4, in dem das Laktat als Anion die vorherrschende Spezies ist, zu einer Leitfähigkeit kommt (73, 69). Nicht zuletzt zeigt das humane Aquaglyceroporin-9 (AQP9) neben einer Leitfähigkeit für Milchsäure/Laktat zusätzlich eine Durchlässigkeit für  $\beta$ -Hydroxybuttersäure/ $\beta$ -Hydroxybutyrat. Eine Absenkung des neutralen, physiologischen pH-Milieus auf pH 5,5 geht mit einer 3-4fachen Erhöhung der Monocarbonsäure/Monocarboxylat-Leitfähigkeit einher, was als bevorzugte Passage der neutralen Monocarbonsäure interpretiert wird (74, 75).

Die wenigen Beispiele zeigen, dass Monocarbonsäure/Monocarboxylat-Leitfähigkeit von Aquaglyceroporinen in allen Spezies von Pflanzen, über Bakterien und Parasiten bis hin zum Säuger vorkommt, was eine physiologische Relevanz vermuten lässt. Dennoch ist die geleitete Spezies, ob neutrale Säure oder Anion, nicht geklärt, was unter anderem der Komplexität der dafür erforderlichen Untersuchungen geschuldet ist. Damit bedarf die Aufklärung der passierenden Form und des zugrunde liegenden Selektionsmechanismus einer detaillierten Funktionsanalyse. Hierzu fehlen in der Literatur noch robuste Daten. Im Folgenden soll der Fokus auf das humane AQP9 gelegt werden, da dieses von allen Beispielen das breiteste Spektrum geleiteter Monocarbonsäuren/Monocarboxylate aufweist.

### 1.3.1 Struktur und Funktion von AQP9

Zusammen mit AQP3 (76), AQP7 (77) und AQP10 (78) bildet AQP9 die Familie der Aquaglyceroporine in Säugern. Das humane AQP9 wird hauptsächlich in der Plasmamembran von Hepatozyten und zu einem kleinen Teil im Gehirngewebe, hier sind insbesondere die Plasmamembranen der Blut-Hirn-Schranke, catecholaminerge Neurone und Gliazellen hervorzuheben, exprimiert (79–81). Das Gen codiert für eine Sequenz aus 295 Aminosäuren und liefert ein Protein mit einer Masse von 31 kDa und einer potenziellen N-Glykosylierungsstelle in Schleife c (82). Eine genauere Betrachtung der Aminosäuresequenz zeigt im Bereich des Selektivitätsfilters keine Auffälligkeiten. Sowohl der ar/R-Selektivitätsfilter als auch die NPA-Region entsprechen dem familientypischen Motiv (83). Für AQP9 gibt es zu diesem Zeitpunkt noch keine ausreichend aufgelöste Kristallstruktur. Betrachtungen der Proteinarchitektur basieren auf Modellen, die auf Grundlage existierender Kristallstrukturen anderer Aquaglyceroporine erstellt wurden. Jedoch gibt eine mit 7 Å aufgelöste Projektionsstruktur eines 2D-Kristalls einen Hinweis auf ein geringfügig weiteres Porenlayout als für das Prototyp-Aquaglyceroporin *E. coli* GlpF (84). Dies könnte eine teilweise Erklärung für die Passage von Soluten sein, die größer und starrer als Glycerol sind. Auf Funktionsebene hebt sich AQP9 durch ein ungewöhnlich breites Solutspektrum von allen anderen Aquaglyceroporinen ab. Neben Glycerol ist es außerdem für weitere Polyole, wie Sorbitol und Mannitol, Carbamide, Purine, Pyrimidine und, wie unter 1.3 beschrieben, für Ketonkörper und Monocarboxylate durchlässig (75). Diese einzigartige Bandbreite an Soluten brachte AQP9 den Namen des „Neutral Solute Channel“ ein. In diesem Zusammenhang wird sogar von einer neuen Aquaporinklasse gesprochen (75). Der Name suggeriert die Leitung von ausschließlich ungeladenen Soluten – eine Annahme, die im Falle der Ketonkörper und Monocarboxylate nie durch eine gründliche mechanistische Evaluierung bestätigt wurde. Die physiologische Funktion von AQP9 liegt hauptsächlich in der Aufnahme von Glycerol aus dem Blut für die hepatische Gluconeogenese (85, 86) und der Ausschleusung von Harnstoff als Abfallprodukt (87). Im Gehirn wird über eine Rolle im Energiemetabolismus spekuliert (80).

AQP9 zeigt keine Auffälligkeiten im ar/R-Selektivitätsfilter und der NPA-Region im Vergleich zu anderen Aquaglyceroporinen, allerdings ein auffällig breit gefächertes Solutspektrum. Besonders hervorzuheben ist die Leitfähigkeit für Monocarbonsäuren/Monocarboxylate, wobei die geleitete Spezies nie gesondert untersucht wurde. Eine Aufklärung der Rolle des Anions bedarf einer gründlichen funktionellen Evaluation.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

TbAQP2 zeigt einen für Aquaglyceroporine ungewöhnlichen und in seiner Konstellation einzigartigen Selektivitätsfilter. In diesem Zusammenhang wird in der Literatur von einer Passage, sogar einem protonengesteuerten Transport, des Arzneistoffes Pentamidin gesprochen. Dies erscheint auf Grundlage aller bisherigen Kenntnisse über Aquaglyceroporine und in Anbetracht der Größe und positiven Ladung des Arzneistoffes verwunderlich. In dieser Arbeit soll durch Leitfähigkeitsmessungen an der Stopped-Flow Apparatur die Funktion des Selektivitätsfilters in Bezug auf den Ausschluss positiver Ladung untersucht werden. Des Weiteren soll die Wechselwirkung von Pentamidin mit TbAQP2, auch unter Einbeziehung von Strukturvarianten des Arzneistoffes und Modifikationen des Proteins in Form von Aminosäureaustauschen, aufgeklärt, und ein möglicher Aufnahmemechanismus des Arzneistoffes in die Zellen erarbeitet werden. Während die Literatur viele Daten zur Bedeutung der positiven elektrostatischen Barriere in Aquaporinen und Aquaglyceroporinen für den Ausschluss positiver Ladung bereithält, sind Ergebnisse zur Anionenleitfähigkeit rar und es fehlt an einer detaillierten mechanistischen Betrachtung. Der zugrunde liegende Mechanismus soll in dieser Arbeit am Beispiel des AQP9 näher beleuchtet werden. Der Selektivitätsfilter von AQP9 weist keine Abweichungen vom Leitmotiv auf. In Funktionsuntersuchungen an der Stopped-Flow soll die Leitfähigkeit von AQP9 für die ausgewählten organischen Säuren Essigsäure, Milchsäure und  $\beta$ -Hydroxybuttersäure bzw. deren Salze über ein breites pH-Spektrum detailliert evaluiert werden, um die geleitete Spezies zu identifizieren. Durch Sequenzvergleiche sollen in AQP9 einzigartige Aminosäuren unter Einbeziehung der Proteinelektrostatik ermittelt und der Einfluss eines gezielten Austausches dieser auf die Leitfähigkeit von AQP9 für Monocarbonsäuren/Monocarboxylaten untersucht werden. Es soll der genaue Aufnahmemechanismus geklärt und mögliche Muster in der Sequenz anionenleitender Aquaglyceroporine herausgearbeitet werden.

Material

## **2 Material**

### **2.1 Enzyme, Kits und Chemikalien**

#### **Alfa Aesar, Karlsruhe**

Zymolyase 20 T

#### **AppliChem, Darmstadt**

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

#### **BD, New Jersey, USA**

*Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids and Ammoniumsulfate*

#### **Beckman Coluter, Krefeld**

Genome Lab™ DTCS – Quick Start Kit

#### **Bio-Rad, München**

Bio-Rad Protein Assay

#### **Carl Roth GmbH, Karlsruhe**

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

#### **Genaxxon BioScience, Ulm**

Ampicillin, TEMED

#### **Jackson Immuno Research Europe LTd., Suffolk, UK**

*Peroxidase conjugated Anti Mouse Antibody*

#### **J.T. Baker, München**

Material

Methanol, Ethanol, Isopropanol, Salzsäure

**Merck, Darmstadt**

Polyethylenglycol 300

**Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA**

Qdot® 605ITK™ Amino (PEG) Quantum Dots

**MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich**

Zymolyase 20 T, Ethidiumbromid

**Oxoid, Basingstoke, USA**

Agar bacteriological

**Peqlab, Erlangen**

Peq GOLD Prestained Protein Marker III

**Promega, Madison, USA**

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

**Roche, Mannheim**

*Anti HA 12CA5 Mouse Monoclonal Antibody*

**Sigma Aldrich Chemie, Steinheim**

L-Lysin, L-Histidin, L-Tryptophan, Adenin, Formamidinhydrochlorid, 3-Amino-1,2-propandiol, DL-β-Hydroxybutyrat, Methylaminhydrochlorid, Sperm Nuclei from Salmon (ss-carrier DNA), Pentamidin isethionate, Gramicidin A, Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon, 2,4-Dinitrophenol

**Stratagene, La Jolla, USA**

*Pfu Turbo® DNA Polymerase*

**Süd-Laborbedarf, Gauting**

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

Material

**Thermo Fischer Scientific, Schwerte**

Restriktionsendonukleasen, T4 DNA Ligase, Fast AP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase, dNTPs, λ-DNA, Orange G

**2.2 Geräte und Materialien**

**Adolf Wolf SANOclav, Bad Überklingen-Hausen**

Sterilisationsautoklav

**Beckman Coulter®, Krefeld**

Polypropylene Microfuge Tube, DNA Sequencer CEQ™ 8000, Optima™ XL-80K Ultrazentrifuge, Rotor 50.2 Ti

**Bio-Rad, München**

Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell

**Eppendorf, Wesseling-Berzdorf**

BioPhotometer

**GE Healthcare, Freiburg**

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

**Hamamatsu Photonics, Herrsching**

150 W Xenon Lampe für die Stopped-Flow

**Heraeus Holding, Hanau**

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

**Infors HT, Bottmingen**

Brutschrank Minitron

**Jasco, Gross-Umstadt**

## Material

BioLogic Stopped-Flow: Spannungsquelle ALX 250, Photomultiplier PMS 250, MPS 60 Microprocessor unit, FC-08 Fluoreszenzküvette, SFM 300 Mischeinheit, MOS-200 UV7VIS- und Fluoreszenzspektrometer, BH-10-61 UV Monochromator, Bio-Kine Software Version 4.42

### **Peqlab, Erlangen**

Perfect Spin 24R Refrigerated microcentrifuge, SDS-Gelgießstand mit Laufkammer, Primus (HT) PCR-Blöcke

### **Roche Diagnostics, Mannheim**

Lumi Imager™ F1

### **Sarstedt, Nümbrecht**

Filtropur S 0.2 µm

### **Savant Instruments, Farmingdale, USA**

Vakuumentrifuge DNA SpeedVac® DNA 110

### **Sigma Aldrich Chemie, Steinheim**

Glass beads (säuregewaschen)

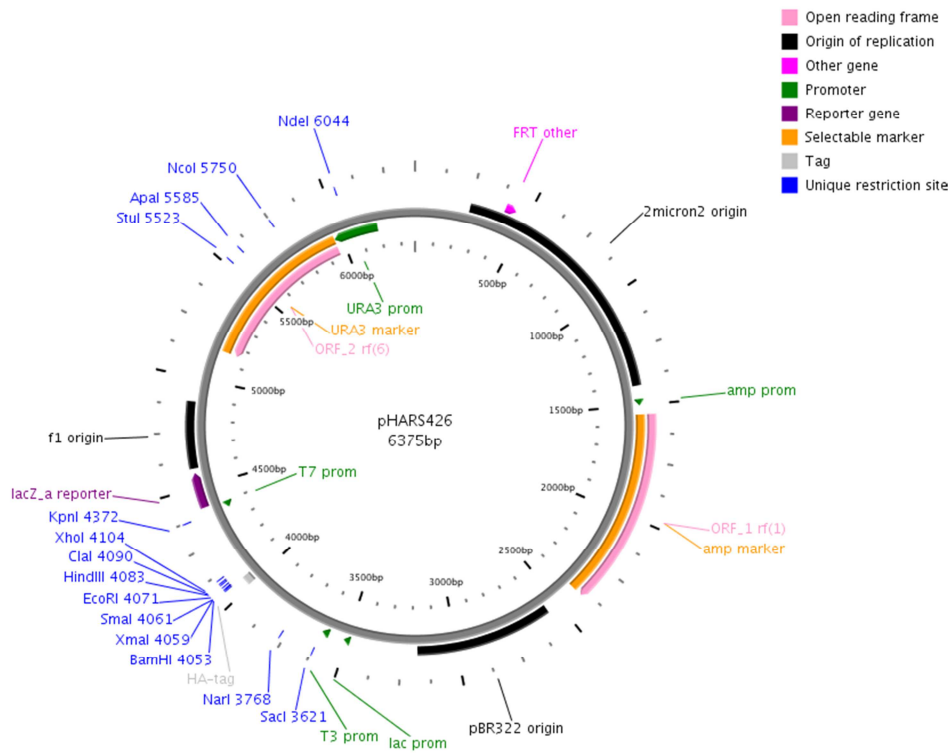
### **Süd-Laborbedarf, Gauting**

Vortex®-Genie 2

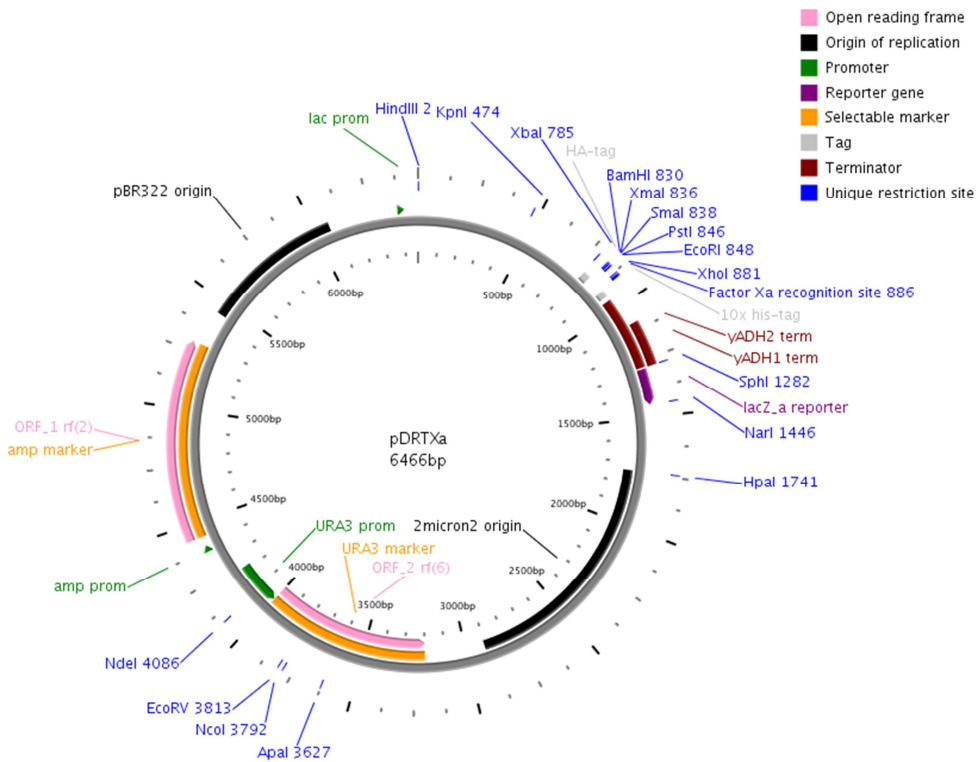
### **WTW, Weilheim**

Multiparameter-Labormessgerät inoLab® Multi 9310 IDS

### 2.3 Plasmide



**Abb. 2.1:** Der pHARS426 ist durch Einfügen eines N-terminalen Hämagglutinin (HA)-tags aus dem Ursprungsvektor pRS426 entstanden



**Abb. 2.2:** Der pDRTXa ist durch Einfügen einer C-terminalen Faktor-Xa-Schnittstelle aus dem Ursprungsvektor pDR196 entstanden.



## 2.4 Oligonukleotide (*primer*)

Mutageneseprimer

Das mutierte Codon ist fett hervorgehoben:

Name	Sinn	Sequenz (5'-3')	Position
pDRTXa- HsAQP9	R <sub>51,53</sub> A	CAA GCT ATT CTC AGT <b>GCT</b> GGA <b>GCT</b> TTT GGA GGG GTC ATC	136-174
	R <sub>51,53</sub> A	ACT GAG AAT AGC TTG GGC AAC ACA GCC ACA TCC AAG	150-115
R <sub>51,53</sub> E	s	CAA GCT ATT CTC AGT <b>GAA</b> GGA <b>GAA</b> TTT GGA GGG GTC ATC	136-174
	as	ACT GAG AAT AGC TTG GGC AAC ACA GCC ACA TCC AAG C	150-114
H <sub>146</sub> A	s	GAA AAT GCA ACA GCA <b>GCT</b> ATT TTT GCA ACA TAC	421-453
H <sub>146</sub> A	as	TGC TGT TGC ATT TTC TCC CAC GAT CAG CTG	435-406
R <sub>219</sub> V	s	GCC ATG AAC CCA GCT <b>GTT</b> GAC CTG AGT CCC AGA	640-672
R <sub>219</sub> V	as	AGC TGG GTT CAT GGC ACA GCC ACT GTT CAG	654-625
pHARS426 -TbAQP2	D <sub>265</sub> A	CTT GCG ATG AAT CCC TCA CTT <b>GCT</b> TTC GGT CCC AGG GAT TCA TCG CAA G	774-823
	D <sub>265</sub> A	C ACC GAA GAC CCT GGG ACC GAA <b>AGC</b> AAG TGA GGG ATT CAT CGC AAG	823-774
D <sub>265</sub> N	s	CTT GCG ATG AAT CCC TCA CTT <b>AAT</b> TTC GGT CCC AGG GAT TCA TCG CAA G	774-823
D <sub>265</sub> N	as	C ACC GAA GAC CCT GGG ACC GAA <b>ATT</b> AAG TGA GGG ATT CAT CGC AAG	823-774

## Material

L <sub>264</sub> R_Linkers	s	TTA GCG TCT CCC CTT GCG ATG AAT CCC TCA CGT GAT TTC GGT CC	762-806
L <sub>264</sub> R_Linkers	as	CT GGG ACC GAA ATC <b>ACG</b> TGA GGG ATT CAT CGC AAG GGG AGA CGC	809-765

## Sequenzierungsprimer

Vektor	Name	Sinn	Sequenz (5'-3')
pDRTXA	PMA 5'	s	CTCTCTTTTATACACACATTC
	ADH 3'	as	CATAAATCATAAGAAATTCGC
pHARS426	MET25	s	AGT AAA GCG TCT GTT AGA AAG G
	Cyc1	as	GAC TTC AGA TCC AGG GAT A

## 2.5 Hefestämme (*S. cerevisiae*)

Name	Genotyp	Quelle
BY4742Δ <i>fps1</i>	MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 <i>fps1::KanMX4</i>	Brachmann
W3031AΔ <i>jenΔady2</i>	MATα; leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11-15 <i>jen1::kanMX4 ady2::hphMX4</i>	Casal

## 2.6 *E. coli* Stämme

Name	Genotyp
DH5α	F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>k</sub></i> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i> <sup>-</sup>

## 2.7 Puffer, Lösungen und Nährmedien

### Molekularbiologie

#### Agarose-Gelelektrophorese

<u>TAE-Puffer:</u>	<u>Ethidiumbromid (10 mg ml<sup>-1</sup>):</u>	<u>10x Probenpuffer (Orange G):</u>
40 mM Tris-Acetat pH 8,0	1 Tablette Ethidiumbromid	0,4 % Orange G
1 mM EDTA	10 ml <i>Aqua bidest.</i>	30 % Glycerol
		100 mM EDTA

#### Medien für *E. coli*

<u>LB-Flüssigmedium:</u>	<u>LB-Agar:</u>	<u>LB-Amp-Selektionsmedium:</u>
20 g LB-Medium (Lennox)	35 g LB-Agar	+ 100 µg/ml Ampicillin
1 l <i>Aqua bidest.</i>	1 l <i>Aqua bidest.</i>	

#### Medien für *S. cerevisiae*:

<u>YPD-Flüssigmedium:</u>	<u>YNB-ura-Flüssigmedium:</u>	<u>YNB-ura-Selektionsmedium:</u>
20 g Pepton	1,7 g YNB	KHL (für BY4742)
10 g Hefeextrakt	5 g Ammoniumsulfat	20 mg/l L-Lysin
20 g Glucose	20 g Glucose	20 mg/l L-Histidin
ad 1l <i>Aqua bidest.</i>	ad 1l <i>Aqua bidest.</i>	100 mg/l L-Leucin
20 min autoklavieren	20 min autoklavieren	
<u>YPD-Platten:</u>	<u>YNB-Platten:</u>	AHLW (für W3031A)
1l YPD Flüssigmedium	1l YNB-ura-Flüssigmedium	25 mg/l Adenin
0,1 g NaOH	pH 5,6 mit 5 N NaOH	20 mg/l L-Histidin
20 g Oxoid Agar	20 g Oxoid Agar	100 mg/l L-Leucin
20 min autoklavieren	20 min autoklavieren	10 mg/l L-Tryptophan
auf 50 °C abkühlen	auf 50 °C abkühlen	nach dem Autoklavieren auf
und ausgießen	und ausgießen	50 °C abkühlen und Amino-
		säuren zugeben.

Material

## Proteinchemie

### Isolierung der mikrosomalen Fraktion von *Saccharomyces cerevisiae*:

#### Puffer B:

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

#### Puffer M:

100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
50 mM NaCl  
pH 8,0 mit HCl  
20 min autoklavieren

## SDS-PAGE

#### 4x Sammelgelpuffer:

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

#### 4x Trenngelpuffer:

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

#### 10x Kathodenpuffer:

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

#### 4x SDS-Ladepuffer:

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

#### 10 % APS-Lösung:

5 g Ammoniumpersulfat  
ad 50 ml *Aqua bidest.*  
  
In 1,5 ml Eppendorfgefäße  
aliquotieren und bei -20°C  
wegfrieren.

## Material

### Western Blot

#### 5x Transferpuffer (Stock)

12,5 mM Tris

96 mM Glycin

0,2 % SDS

#### 1x Transferpuffer

20 % 5x Transferpuffer

20 % Methanol

30 % *Aqua bidest.*

#### 10x TBS-Puffer (Stock)

0,2 M Tris

1,35 M NaCl

pH 7,6 mit HCl

#### 1x TBST-Puffer

10 % 10x TBS-Puffer

90 % *Aqua bidest.*

0,1 % Tween 20

#### M-TBST 3%

3 % Magermilchpulver

ad 40 ml 1x TBST-Puffer

Frisch vor dem Blocken herstellen und Magermilchpulver klumpenfrei lösen

### Funktionsassays

#### Methylaminplatten für phänotypische Wachstumsassays

#### Lösung I (in *Aqua bidest.*)

0,17 % YNB

3 % D-Glucose

50 mM Methylamin

600 mg/l L-Prolin

20 mg/l L-Lysin

20 mg/l L-Histidin

100 mg/l L-Leucin

Lösung im Wasserbad auf

50 °C erwärmen

#### Lösung II (in *Aqua bidest.*)

20 mM MES (für pH 5,5/6,5)

oder

20 mM MOPS (für pH 7,5)

pH mit NaOH einstellen

2 % Oxoid Agar

Lösung autoklavieren und

auf 50 °C abkühlen lassen

Lösung I + Lösung II

## Material

### **Puffer für die Präparation von Hefeprotoplasten**

<u>Puffer I:</u>	<u>Puffer II:</u>	<u>Puffer III:</u>
50 mM MOPS pH 7,2	50 mM MOPS pH 7,2	10 mM Puffersubstanz (*)
	1,8 M Saccharose	1,2 M Saccharose
		50 mM NaCl
		5 mM CaCl <sub>2</sub>
20 min autoklavieren	sterilfiltrieren (0,2 µm)	sterilfiltrieren (0,2 µm)
+ 0,2 % β-Mercaptoethanol	+ 0,2 % β-Mercaptoethanol	

---

(\*) Citronensäure für pH 3-5, MES für pH 6, MOPS für pH 7, Bis-Tris für pH 8-9

### **Messpuffer für die Stopped-Flow**

<u>Puffer IV isoosmolar:</u>	<u>Puffer IV hyperosmolar:</u>
10 mM MOPS pH 7,2	10 mM Puffersubstanz (*)
0,6 M Glycerol	0,1-0,6 M Solut (**)
0,6 M Saccharose	1,2 M Saccharose
50 mM NaCl	50 mM NaCl
5 mM CaCl <sub>2</sub>	5 mM CaCl <sub>2</sub>

---

(\*) Citronensäure für pH 3-5, MES für pH 6, MOPS für pH 7, Bis-Tris für pH 8-9

(\*\*) Glycerol, Formamidin, 3-Amino-1,2-propandiol, Na-Acetat, Na-Laktat, Na-β-Hydroxybutyrat

### **Puffer für Alkalisierungsmessungen des Mediums an der pH-Elektrode**

<u>Puffer zur Resuspension</u>	<u>Messung</u>
4 mM Citronensäure	1 ml Puffer
0,5 % 6-Desoxyglucose	+ 7 ml <i>Aqua bidest</i>
pH 5 mit NaOH	+ 160 µl 1 mM Na-Laktat-Stammlösung

### 3 Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 Isolierung und Reinigung von DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System eingesetzt. Eine Kolonie wurde hierzu in 5 ml frisches LB-Flüssigmedium mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit der Übernachtskultur wurde entsprechend der Herstellerangaben verfahren. Abweichend zum Protokoll wurde keine alkalische Protease zugesetzt und die abschließende Elution der DNA mit 50 µl statt 100 µl *Aqua bidest.* durchgeführt.

##### 3.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Für die Bestimmung von Gehalt und Reinheit wurde die vorliegende DNA verdünnt, in eine Quarzküvette überführt und in einem BioPhotometer (Innova U535) die Absorption bei 260 nm gemessen. Als Leerwert diente *Aqua bidest.* Die Konzentration errechnete sich wie folgt:

$$c (\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}) = A_{260} \times f \text{ Verdünnung}$$

f = 0,04 für Doppelstrang-DNA, Plasmide

f = 0,02 für Einzelstrang-DNA, RNA, Oligonukleotide

Zur Einschätzung der DNA-Reinheit wurde das Verhältnis von  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  herangezogen. Dieses gibt einen Hinweis auf Verunreinigungen mit Molekülen, die bei 280 nm absorbieren, wie Phenole und Proteine. Ein Wert  $> 1,8$  wurde als ausreichend festgelegt. Ein weiteres Kriterium war ein Verhältnis von  $A_{260}$  zu  $A_{230} > 2$ , womit ein zu hoher Anteil von Substanzen, die bei 230 nm absorbieren, wie EDTA, ausgeschlossen wurde.

### **3.1.3 Standardtransformation von *E. coli***

100 µl kompetente DH5α-*E. coli* Zellen wurden auf Eis für 3 min angetaut, der vollständige Ligationsansatz (10 µl) (3.1.9) oder 3 µl des Produktes aus der Mutagenese-PCR (3.1.10), hinzupipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde 1 min im Heizblock bei 42 °C erhitzt, 5 min auf Eis gekühlt und um 900 µl LB-Flüssigmedium ergänzt. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C unter Rotation für 45 min. Anschließend wurde bei 13.000 g für 20 s zentrifugiert und 900 µl des Überstandes verworfen. Das Zellpellet in den verbleibenden 100 µl resuspendiert und auf LB-Platten mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht.

### **3.1.4 Schnelltransformation von *E. coli***

50 ng Plasmid wurden zu 100 µl angetauten kompetenten DH5α-*E. coli* Zellen hinzu pipettiert, 30 min auf Eis inkubiert und der Ansatz 1 min im Heizblock bei 42 °C erhitzt. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis wurden 50 µl des Transformationsansatzes direkt auf LB-Platten mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **3.1.5 Anlegung von Dauerkulturen von *E. coli***

Für die langfristige Aufbewahrung von Konstrukten wurden Dauerkulturen in *E. coli* angelegt. Dazu wurde genau eine Kolonie in 5 ml LB-Flüssigmedium, mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum, überführt und über Nacht unter Rotation bei 37 °C inkubiert. 1 ml der Übernachtskultur wurden mit 500 µl Glycerol 80 % versetzt, sgevortex und bei – 80 °C gelagert. Bei Bedarf wurde mit einer Eppendorfspitze eine dünne Schicht des gefrorenen Glycerolstocks abgeschabt, auf Selektionsmedium ausgestrichen und nach Inkubation bei 37 °C am Folgetag eine Kolonie in 5 ml LB-Amp-Flüssigmedium überführt (2.7). Aus dieser Übernachtskultur konnte das Plasmid wieder rückgewonnen werden (3.1.1).

### **3.1.6 Restriktionsverdau von DNA**

Der Restriktionsverdau von Plasmiden wurde in einem Volumen von 10-20 µl durchgeführt. Es wurden 1 µg DNA und 5 U des Enzyms eingesetzt. Im Falle eines gestaffelten Verdau wurde für jedes Enzym der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet. Beim simultanen Einsatz zweier Enzyme wurde als Kompromiss ein Puffer eingesetzt, der mit beiden Enzymen kompatibel war und ausreichende Aktivitäten gewährleistete. Die Inkubation erfolgte für 2-3 h bei 37 °C. Die Verdau mit *Pas* I erfolgte bei 55 °C.



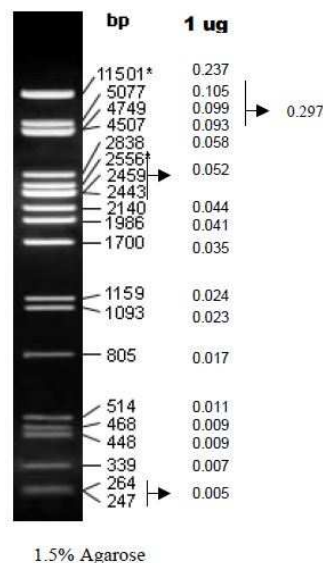
### 3.1.7 Dephosphorylierung

Um eine Religation des verdauten Plasmids zu verhindern, war es in einigen Fällen notwendig eine Dephosphorylierung durchzuführen. Für 1 µg DNA wurden 1,5 U *fast alkaline phosphatase* eingesetzt und der Ansatz für 10 min bei 37 °C inkubiert.

### 3.1.8 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese diente der Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten, sowie der Überprüfung von Ligationsprodukten.

Zur Herstellung eines 1%igen Gels wurden 50 ml TAE-Puffer mit 0,5 g Agarose versetzt und in 2-3 Intervallen in der Mikrowelle kurz aufgeköcht. Die Lösung wurde für 10 min abgekühlt, mit 1 µl Ethidiumbromid (10 mg ml<sup>-1</sup>) versetzt und nach der Aushärtung in eine mit TAE -Puffer gefüllte Laufkammer überführt. Bis zu 20 µl DNA-Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und luftblasenfrei in die Taschen des Gels pipettiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in Abhängigkeit der Größe der DNA-Fragmente bei 120 V für 20-30 min.



**Abb. 3.1:** λ-DNA für die Agarose-Gelelektrophorese verdaut mit *Pst* I

Zur Ermittlung der Größe von DNA-Fragmenten wurden 5 µl λ-DNA-*Pst* I-Marker (**Abb. 3.1**) eingesetzt. Durch Interkalation von Ethidiumbromid in DNA konnten die Banden bei 366 nm zur Fluoreszenz angeregt und auf Fotopapier dokumentiert werden. Wurden Fragmente für weitere Schritte benötigt, wurden diese mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit dem Hi Yield® Gel/PCR Fragment Extraction Kit isoliert .

### 3.1.9 Ligation

Für die Ligation der geschnittenen DNA-Fragmente wurde in einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  gearbeitet, wobei das molare Verhältnis von Insert zu Vektor in einem Bereich von 2:1-5:1 variiert wurde. Die Inkubation mit der T4-DNA-Ligase wurde im empfohlenen Puffer bei Raumtemperatur für 30 min oder im PCR-Block bei 16 °C über Nacht durchgeführt.

#### 3.1.10 *In vitro* Mutagenese

Die verschiedenen AQP9-Mutanten und TbAQP2-Mutanten wurden mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene unter Verwendung der in unter 2.4 aufgelisteten *primer* generiert. Die Mutagenese-Ansätze wurden nach folgendem Schema (**Tab. 3.1**) pipettiert:

0,5 $\mu\text{l}$	DNA
5 $\mu\text{l}$	10x Pfu Puffer
4 $\mu\text{l}$	dNTPs (je 2,5 mM)
1 $\mu\text{l}$	<i>sense primer</i> (25 $\mu\text{M}$ )
1 $\mu\text{l}$	<i>antisense primer</i> (25 $\mu\text{M}$ )
0,8 $\mu\text{l}$	Pfu-Turbo® DNA Polymerase 2,5 U $\mu\text{l}^{-1}$
ad 50 $\mu\text{l}$	<i>Aqua bidest.</i>

**Tab. 3.1:** Pipettierschema für die PCR-Reaktion zur Einführung von Punktmutationen

Der Mutagenese-Ansatz wurde folgendem Temperaturprogramm (**Tab. 3.2**) unterzogen:

Temperatur (°C)	Zeit (min)		
95	0,5	Denaturierung	
95	0,5	Denaturierung	
55-65	1	Anlagerung der <i>primer</i>	16 Zyklen
68	16	Elongation	
68	20	Elongation	
8	$\infty$	Kühlung	

**Tab. 3.2:** Temperaturprogramm der Mutagenese-PCR

## Methoden

Dabei richtete sich die Temperatur für die Anlagerung der Primer nach deren GC-Gehalt und somit ihrer Schmelztemperatur. Die Berechnung erfolgte über folgende Formel:

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

GC (%)      GC-Gehalt des verwendeten *primers* in Prozent

N            Anzahl der Basen des verwendeten *primers*

Um ein reines Mutageneseprodukt zu erhalten, wurde die nicht mutierte methylierte Mutterstrang-DNA über Nacht bei 37 °C mit *Dpn I* verdaut. Dazu wurde 1 µl des Enzyms zu 50 µl-Gesamtprodukt hinzugegeben und durch sorgfältiges Auf- und Abpipettieren gemischt.

### 3.1.11 Einführung einer Punktmutation durch einen Linker

Die Punktmutation TbAQP2-L264R wurde durch einen Linker eingeführt. Dazu wurden zwei komplementäre *primer* (2.4) synthetisiert, welche die gewünschte Punktmutation enthielten, und nach folgendem Temperaturprogramm (**Tab. 3.3**) zu einem Doppelstrang zusammengelagert:

Temperatur (°C)	Zeit (min)	
95	1	Trennung der Einzelstränge
95-25	12	Anlagerung /Temperaturgradient (0,1 °C/s)
25	∞	Lagerung

**Tab. 3.3:** Temperaturprogramm für die Zusammenlagerung der Oligonukleotide

Der Zielvektor pHARS426 wurde mit *Pas I* und *Blp I* verdaut (3.1.6) und mit dem synthetisierten Linker ligiert (3.1.9).

### 3.1.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Konstrukten erfolgte mit dem Genome<sup>TM</sup> Lab DTCS Quick Start Kit. Die DNA-Fragmente wurden über Kapillar-Gel-Elektrophorese im CEQ<sup>TM</sup> 8000 Genetic Analysis System von Beckmann Coulter® getrennt und über die Fluoreszenzmarkierung eingebauten Didesoxynukleotide detektiert.

## Methoden

Pro Sequenzierungsansatz wurden 50-100 fmol DNA-Template in 9,5  $\mu\text{l}$  *Aqua bidest.* vorgelegt, 1,5  $\mu\text{l}$  *primer* (5 $\mu\text{M}$ ) und 2  $\mu\text{l}$  DTCS Quick Start Master Mix zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Das Verhältnis zwischen *primer* und *template* war dabei  $> 40$ . Die Sequenzierungs-PCR erfolgte mit folgendem Temperaturprogramm (**Tab. 3.4**):

Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Zeit		
86	5 min	Initiale Denaturierung	
96	20 s	Denaturierung	
50	20 s	Primeranlagerung	30 Zyklen
60	4 min	Elongation	
8	$\infty$	Kühlung und Lagerung	

**Tab. 3.4:** Temperaturprogramm der Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit 5  $\mu\text{l}$  eines Mastermix, bestehend aus 2  $\mu\text{l}$  3 M Na-Acetat-Lösung, 2  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -Lösung und 1  $\mu\text{l}$  Glykogen (20 mg  $\text{ml}^{-1}$ ), abgestoppt. Das PCR-Produkt wurde mit 60  $\mu\text{l}$  Ethanol 95% (v/v) gefällt, mit 200  $\mu\text{l}$  Ethanol 70 % (v/v) gewaschen und das Pellet nach Trocknung in der Vakuumzentrifuge in 20  $\mu\text{l}$  *sample loading solution* resuspendiert.

### 3.1.13 Transformation von *S. cerevisiae*

Kulturen der nicht transformierten *S. cerevisiae* Stämme wurden alle 3 Monate frisch auf YPD-Platten ausgestrichen, bei 29  $^{\circ}\text{C}$  für 3 Tage inkubiert und die Platten für anstehende Transformationen im Kühlschrank aufbewahrt.

Eine Kolonie wurde in 5 ml YPD-Flüssigmedium überführt und über Nacht inkubiert (29  $^{\circ}\text{C}$ , 220  $\text{U min}^{-1}$ ). Aus der Übernachtskultur wurden 50 ml einer frischen Hauptkultur mit einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,1 angeimpft und weiter inkubiert. Die Zellen wurden bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 geerntet (2.500 g, 5 min), mit 25 ml eiskaltem *Aqua bidest.* gewaschen, das Pellet in 1 ml resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Es folgte ein weiterer Waschschrift (13.000 g, 30 s) und das Pellet wurde in *ad* 1 ml *Aqua bidest.* resuspendiert. Für jeden Transformationsansatz wurden 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension vorgelegt, die Zellen bei 13.000 g für 20 s gesammelt und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 360  $\mu\text{l}$  Transformationsmix (**Tab. 3.5**) 0,5  $\mu\text{l}$  DNA versetzt und resuspendiert.

## Methoden

PEG 3500 50 % (m/v)	240 $\mu$ l
Lithiumacetat 1 M	36 $\mu$ l
Einzelstrang-carrier-DNA	50 $\mu$ l
<i>Aqua bidest.</i>	37 $\mu$ l

**Tab. 3.5:** Transformationsmix

Die Ansätze wurden 45 min bei 42 °C auf dem Heizblock erwärmt, anschließend die Zellen durch Zentrifugation gesammelt (13.000 g, 20 s) und in 1 ml *Aqua bidest.* resuspendiert. 100  $\mu$ l der Zellsuspension wurden auf einem geeigneten Selektionsmedium (SD-KHL oder SD-AHLW) ausgestrichen und die Platten bei 29 °C für 4 Tage inkubiert.

### 3.1.14 Dauerkultur von *S. cerevisiae*

Zur Anlegung von Dauerkulturen der Hefestämme wurden Kolonien von transformierten BY4742 $\Delta$ fps1-Hefezellen in 5 ml SD-KHL-Flüssigmedium und von transformierten W3031A $\Delta$ jen $\Delta$ ady-Hefezellen in 5 ml SD-AHLW-Flüssigmedium überführt und 24 h bei 29 °C unter Schütteln (220 U min<sup>-1</sup>) inkubiert. 500  $\mu$ l Hefekultur wurden mit 500  $\mu$ l Glycerol 85 % gemischt, gut gevortext, und bei -80 °C gelagert.

## 3.2 Proteinchemische Methoden

### 3.2.1 Präparation der mikrosomalen Fraktion aus *S. cerevisiae*

100 ml Hefekultur wurden über Nacht bei 29 °C unter Schütteln (220 U min<sup>-1</sup>) im entsprechenden Medium – SD-KHL für BY4742 $\Delta$ fps1-Hefezellen und SD-AHLW für W3031A $\Delta$ jen1 $\Delta$ ady2-Hefezellen – wachsen gelassen und bei einer OD<sub>600</sub> von 1 gerettet (2.500 g, 4 °C, 5 min). Das Pellet wurde einmal mit 50 ml eiskaltem Wasser und anschließend mit 10 ml eiskaltem Extraktionspuffer B (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA) gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 250  $\mu$ l Extraktionspuffer B resuspendiert. Es wurde ein gleicher Volumenteil an säurebehandelten Glasperlen zugegeben und alternierend 20-mal für 30 s gevortext und 1 min auf Eis ruhen gelassen. Es war wichtig, für eine starke Verwirbelung der Glasperlen mit der Hefesuspension zu sorgen, um ein effektives Brechen der Zellwand zu gewährleisten. Glasperlen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (5 min, 1.000 g, 4°C) gesammelt und der Zellextrakt in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die Glasperlen und Zelltrümmer wurden nochmals mit 500  $\mu$ l Extraktionspuffer B gewaschen und die Zellextrakte vereinigt. Eine weitere Zentrifugation bei 1.000 g trennte letzte Zelltrümmer

## Methoden

vom Zellextrakt. Die Trümmer wurden aufbewahrt, in 100 µl Puffer M (100 mM Na-Phosphat pH 8,0, 50 ml NaCl) solubilisiert und bei -20 °C gelagert. Der gewonnene Zellextrakt wurde in Zentrifugenröhrchen (Beckmann Coulter) überführt und zur Gewinnung der mikrosomalen Fraktion 40 min bei 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Puffer M resuspendiert und für 10 min auf Eis solubilisiert.

### **3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay durchgeführt. 2 µl Proteinlösung wurden mit 798 µl *Aqua bidest.* versetzt und mit 200 µl Bradford-Reagenz gemischt. Nach 5 min wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Leerwert diente 800 µl *Aqua bidest.* und 200 µl Bradford-Reagenz. Die Kalibrierung wurde mit BSA durchgeführt. Lag die Absorption außerhalb des Lambert-Beer'schen Bereiches, wurde die Verdünnung der Probe entsprechend angepasst.

### **3.2.3 Proteinfällung mittels Trichloressigsäure**

Um Proteine zu konzentrieren und bessere Signale bei der Western Blot Analyse zu erhalten, wurde die Proteinlösung (3.2.1) mittels TCA gefällt. Dazu wurden vier Volumenteile Proteinlösung mit einem Volumenteil frisch hergestellter wässriger TCA-Lösung 100 % ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) gemischt und 30 min im Kühlschrank ruhen gelassen. Das ausgefällte Protein wurde durch Zentrifugation (13.000 g, 4 °C, 10 min) gewonnen, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 200 µl eiskaltem Aceton gewaschen. Der Acetonüberstand wurde verworfen, das Pellet mit geöffnetem Deckel für 5 min bei 95 °C im Heizblock getrocknet, in 20 µl PBS-Puffer resuspendiert und 1 h auf Eis solubilisiert. Die Ausbeute entsprach jeweils einer Spur für die SDS-PAGE (3.2.4).

### **3.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Zur Trennung von Proteinen nach Größe wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt (88). Die Proben wurden mit SDS versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch Anlagerung des anionischen Tensides SDS kommt es zum einen zu einer Linearisierung des Proteins und zum anderen zur Überdeckung der Eigenladung. Alle Proteine wandern in Abhängigkeit ihrer Größe zur Anode der elektrophoretischen Trennkammer. Für die untersuchten Proteine wurde ein diskontinuierliches 12,5%iges Polyacrylamidgel gegossen. Die Lösungen für Trenn- und Sammelgel setzten sich wie folgt zusammen:

Trenngel		Sammelgel	
<i>Aqua bidest.</i>	5,25 ml	<i>Aqua bidest.</i>	2,4 ml
4x Trenngelpuffer	3,00 ml	4x Sammelgelpuffer	1,0 ml
Acrylamid Rotiphorese 40 %	3,75 ml	Acrylamid Rotiphorese 40 %	0,6 ml
TEMED	10 $\mu$ l	TEMED	6 $\mu$ l
10 % APS	80 $\mu$ l	10 % APS	25 $\mu$ l

**Tab. 3.6:** Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgelpuffers

Es wurden pro Spur 75-100  $\mu$ g Gesamtprotein und zur Abschätzung der Größe 6  $\mu$ l des PeqGOLD Prestained Protein Marker III aufgetragen. Die Proben wurden zunächst in einer Sammelphase für 15 min bei 160 V im Sammelgel konzentriert. Der eigentliche Trennvorgang fand bei 200 V für 1h im Trenngel statt. Das Polyacrylamidgel wurde anschließend für einen Western Blot (3.2.5) verwendet.

### 3.2.5 Western Blot

Zur Detektion der in der SDS-PAGE (3.2.4) getrennten Proteine wurden diese vom Trenngel bei 17 V für 1h auf eine in Transferpuffer getauchte und mit Methanol aktivierte PVDF-Membran übertragen. Dafür wurde das Gel auf die PVDF-Membran geschichtet und, eingebettet zwischen je drei Lagen in Transferpuffer getränkten Whatman-Papieren, zwischen Kathode und Anode der Trans Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell von BIO-RAD gespannt. Zur Besetzung freier Bindestellen wurde die PVDF-Membran 1 h mit 3 % M-TBST unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur geblockt. Die Inkubation mit dem gegen das Hämagglutininepitop (HA-tag) der untersuchten Proteine gerichteter Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:2.000 oder 1:5.000 in M-TBST erfolgte unter leichtem Schütteln bei 4 °C über Nacht. Als Sekundärantikörper wurde ein mit Meerrettichperoxidase gekoppelter *goat anti mouse* Antikörper im Verhältnis 1:2.000 eingesetzt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 1h bei Raumtemperatur. Nach jeder Antikörperbehandlung wurde die Membran in drei Intervallen von 15 min in frischem TBST gewaschen. Eine an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysierte die Umsetzung des zugegebenen Amersham ECL Plus-Reagenz (89) und erzeugte ein Chemielumineszenzsignal, welches im Lumi-Imager F1™ detektiert werden konnte.

### 3.3 Funktionsassays in *S. cerevisiae*

#### 3.3.1 Wachstumsassays auf Agarplatten

Phänotypische Wachstumsstudien auf Festmedium wurden für qualitative Aussagen zur Funktionalität von Aquaglyceroporinen durchgeführt. Für die Untersuchungen wurde der Hefestamm BY4742 $\Delta$ fps1 verwendet, der eine Deletion des endogenen Aquaglyceroporin Scfps1 aufweist.

Je eine Kolonie wurde am Vortag in 1,5 ml SD-KHL-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 29°C, 220 U min<sup>-1</sup> auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (13.000 g, 30 s), mit 1 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in 0,5 ml *Aqua bidest.* resuspendiert. Die optische Dichte der Hefesuspension wurde bestimmt, auf 1 eingestellt und davon ausgehend eine Verdünnungsreihe mit 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> und 10<sup>-3</sup> erstellt. Die Agarplatten wurden auf einem Rastervordruck platziert und je 10  $\mu$ l der Hefesuspensionen nach zunehmender Verdünnung tropfenförmig auf das Medium überführt. Die Platten wurden 20 min an der Luft getrocknet und 3-5 Tage bei 29°C inkubiert.

#### Methylamin-Efflux-Assay

Methylamin ist toxisch für Hefezellen. Mit einem pK<sub>s</sub>-Wert von 10,64 liegt unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich das positiv geladene Methylammonium vor, welches von den Hefezellen über spezialisierte Ammoniumtransporter Mep 1-3 aus dem Nährmedium aufgenommen wird. Die für den Assay verwendeten Platten enthielten 50 mM Methylamin/Methylammonium, wobei das Verhältnis von ungeladenem Methylamin zum protonierten Methylammonium vom jeweils vorherrschenden pH (5,5, 6,5 und 7,5) abhängt. Bei pH 5,5 liegt mit 0,36  $\mu$ M der kleinste Anteil an Methylamin vor, dessen Konzentration sich mit jedem pH-Schritt ins Alkalische um den Faktor 10 erhöht. Bei Agarplatten mit einem kleineren pH-Wert als dem zytosolischen der Hefezellen (pH 6,8-7,2) baut sich zwischen Intra- und Extrazellulärraum ein chemischer, auswärts gerichteter Methylamingradient aus. Ein Ausstrom und damit eine Entgiftung kann nur bei Vorliegen eines funktionsfähigen Aquaglyceroporins erfolgen (90).



### 3.3.2 Bestimmung der Alkalisierung des Mediums mit der pH-Glaselektrode

200 ml einer Kultur von W3031A $\Delta$ jen1 $\Delta$ ady2-Hefezellen wurden über Nacht bei 29 °C in SD-AHLW-Flüssigmedium unter Schütteln bei 220 U min<sup>-1</sup> auf eine OD<sub>600</sub> von 1 kultiviert, geerntet (4.000 g, 5 min) und mit eiskaltem *Aqua bidest.* gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde in 4 mM Citronensäurepuffer pH 5 mit 0,5 % Desoxyglucose resuspendiert. Es wurde auf eine OD<sub>600</sub> von 60 eingestellt. 1 ml der Zellsuspension wurde um 7 ml *Aqua bidest.* ergänzt, bei 800 U min<sup>-1</sup> gerührt und die pH-Wert-Aufzeichnung mit einer Glasmembranelektrode gestartet. Nach einer Minute wurden 20 mM Na-Laktat hinzu pipettiert und pH-Wertänderungen gegen die Zeit registriert. Das Messintervall betrug 8 min. Es wurden drei unabhängige Experimente mit jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt. Die erhaltenen Kurven wurden gemittelt und für jedes Experiment die Kinetik durch lineares Fitting mit der SigmaPlot-Software ermittelt.

### 3.3.3 Präparation von Hefeprotoplasten

Um ein Schwell- und Schrumpfverhalten der Hefezellen und damit ein auswertbares Signal-Rausch-Verhältnis der Messung zu gewährleisten, wurde die starre Zellwand mit Zymolyase 20T aus *Arthrobacter luteus* verdaut. Es handelt sich hierbei um ein Enzymgemisch, welches vorwiegend  $\beta$ -1,3 Glucanbindungen spaltet, aber auch eine Proteaseaktivität von  $1,0 \times 10^4 \text{ U g}^{-1}$  aufweist, weshalb die zu untersuchenden Kanalproteine durch Zusatz von Albumin im statistischen Überschuss vor dem Abverdau geschützt wurden.

Für die Präparation wurden aus einer Vorkultur der transformierten Hefe je nach Menge der benötigten Protoplasten 50-100 ml Kultur in SD-KHL-Medium für BY4742 $\Delta$ fps1-Hefezellen oder in SD-AHLW für W3031A $\Delta$ jen1 $\Delta$ ady2-Hefezellen angeimpft und über Nacht bei 29 °C unter Schütteln (220 U min<sup>-1</sup>) auf eine OD<sub>600</sub> von 1 herangezogen und geerntet (2.000 g, 4 °C, 5 min). Nach Waschen mit 5 ml Puffer I (2.7) wurde das Nasspelletgewicht notiert, dieses in 2 ml Puffer I resuspendiert, und für 10 min bei 29 °C inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer II, 100 mg BSA und Zymolyase 20T entsprechend dem Nasspelletgewicht ( $400 \text{ U g}^{-1}$ ), wurde unter leichtem Schütteln (100 U min<sup>-1</sup>) für 60 min inkubiert und die entstandenen Protoplasten abzentrifugiert (2.000g, 4 °C, 5 min). Nach Waschen mit 5 ml Puffer III wurde das Pellet in 2 ml Puffer III unter vorsichtigem Schwenken resuspendiert und für die Messung auf eine OD<sub>600</sub> von 2 eingestellt.

### 3.3.4 Lichtstreuungsmessungen mit der Stopped-Flow-Apparatur

Es handelt sich um ein Verfahren zur kinetischen Untersuchung schnell ablaufender Prozesse. So können durch ein schnelles Mischen zweier oder mehrerer Flüssigkeiten in einer Messküvette und eine dynamische Aufnahme mittels eines Fluoreszenzdetektors spektroskopische Änderungen der Analyse registriert werden.

Die für diese Arbeit durchgeführten Versuche beruhen auf dem Schwell- und Schrumpfverhalten von Hefeprotoplasten, die in Abhängigkeit von der Fragestellung in verschiedenen osmolyt-basierten Puffersystemen präpariert und als Suspension in der Stopped-Flow-Apparatur vermessen wurden. Die Signalstärke der dynamischen Lichtstreuung durch die Hefeprotoplasten verhält sich umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Ein Schrumpfen oder Schwellen der Hefeprotoplasten wird durch Änderung der äußeren osmotischen Bedingungen mit verschiedenen Testpuffern (hyperosmotisch oder isoosmotisch) erreicht und die Signalstärke der resultierenden Lichtstreuung mit der Biokine®-Software in Volt gegen die Zeit aufgezeichnet.

Es wurden folgende Parameter eingestellt:

Xe/Hg-Bogenlampe	150 W
Monochromator	496 nm
Output Filter	300 $\mu$ s
Photomultiplier	400 x
Temperatur	20 °C
Injektionsvolumen	150 $\mu$ l
Mischungsverhältnis	1:1
Injektionsgeschwindigkeit	7 ml s <sup>-1</sup>
Erwartete Totzeit	5,2 ms
Datenpunkte	8000

**Tab. 3.7:** Einstellungsparameter der Stopped-Flow Apparatur

## Methoden

Die Protoplasten befanden sich als Suspension in Puffer III mit 1,2 M Osmolyt, welcher eine Umgebung mit gleichem Wasserpotential wie im Zellsaft vorherrschend schafft und den natürlichen Zellturgor aufrechterhält. In der Küvette der Stopped-Flow-Apparatur wurde diese Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit dem Messpuffer vermischt und die Änderung der Lichtstreuung registriert. In den jeweiligen Messungen wurde mit einem Testsubstrat-haltigen hyperosmotischen Puffer (1,2 M Osmolyt + 0,1 - 0,6 M Testsubstrat) oder einem Testsubstrat-haltigen isoosmotischen Puffer (0,6 M Osmolyt + 0,6 M Testsubstrat) gearbeitet.

### Auswertung der Messkurven

Es wurden für die jeweilige Fragestellung zwei bis drei unabhängige Experimente durchgeführt. Für jedes Experiment wurden 6-9 Kurven aufgezeichnet und mit der Biokine®-Software gemittelt.

### **Hyperosmotisch:**

Die Mischung der Protoplastensuspension mit hyperosmotischem Testpuffer im Verhältnis 1:1 erzeugte einen biphasischen Kurvenverlauf, der sich durch folgende Gleichung beschreiben lässt und die zudem die Grundlage für das Kurvenfitting mit BioKine® bildete:

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

a: Steilheit

t: Zeit in s

b: Achsversetzung (Offset)

$c_w$ : Amplitude Wasserausstrom

$d_w$ : Ratenkonstante Wasserausstrom

$c_{sol}$ : Amplitude Soluteinstrom

$d_{sol}$ : Ratenkonstante Soluteinstrom

## Methoden

Im ersten Kurvenabschnitt kommt es zu einem exponentiellen Anstieg durch einen osmotisch bedingten Wasserausstrom, was in einem Schrumpfen der Protoplasten und einer Erhöhung des Streulichtsignals resultiert. Im zweiten Abschnitt wird das Protoplastenvolumen durch einen chemischen Solutgradienten und den resultierenden Wassereinstrom wieder kompensiert. Die Protoplasten schwellen, was zu einer langsamen Abnahme des Streulichtsignals führt. Die Signaländerung der Messkurve wurde auf einen Bereich von 0-1 normalisiert (d.h. der Startpunkt wurde auf 0 festgelegt und die Plateauphase durch Multiplikation auf 1 gestreckt). Dadurch wurde ein direkter Vergleich der Solutleitfähigkeiten untersuchter Aquaglyceroporine ermöglicht. Um den zweiten Kurvenabschnitt isoliert betrachten zu können wurde die 1. Ableitung des zweiten Terms (Soluteinstrom) gebildet und vor dem Fitting  $t=0$  in den Einstellungen definiert:

$$y = c_{\text{sol}} \times e^{-d_{\text{sol}} t}$$
$$y' = -d_{\text{sol}} \times c_{\text{sol}} \times e^{-d_{\text{sol}} t}$$

mit  $t = 0$  entspricht der Wert der initialen Ratenkonstante für den Soluteinstrom  $k_{\text{sol}}$  folgender Gleichung:

$$k_{\text{sol}} = \left| -d_{\text{sol}} \times c_{\text{sol}} \right|$$

Die Werte für  $d_{\text{sol}}$  und  $c_{\text{sol}}$  wurden aus der von BioKine® generierten Fittingfunktion entnommen.

### **Isoosmotisch:**

Vor jeder Messung wurde der isoosmotische solut-haltige Puffer mit Protoplasten, die kein Aquaglyceroporin herstellen, kalibriert. Dazu wurde das Streulichtsignal aufgezeichnet und der Puffer mit schrittweiser Zugabe von Glycerol justiert bis das Signal waagrecht zur x-Achse verlief.

Die Mischung der Protoplastensuspension mit isoosmotischem Testpuffer im Verhältnis 1:1 erzeugt bei Vorhandensein eines funktionellen Aquaglyceroporins eine abfallende Exponentialfunktion. Durch Einstrom des Sutes in die Protoplasten kommt es zu einem Schwellvorgang, der sich in einer Abnahme des Streulichtsignals zeigt. Die Kurven wurden auf einen Startpunkt bei 1 V normiert und die initiale, einheitlich festgelegte, lineare Phase mit SigmaPlot® gefittet.

## **3.4 Bioinformatische Methoden**

### **3.4.1 Sequenzalignments**

Sequenzalignments sind ein bewährtes Tool, um eine Vielzahl von Aminosäuresequenzen zu vergleichen. So können zum einen Schlüsse auf die funktionelle oder evolutionäre Verwandtschaft von Proteinen geschlossen werden, zum anderen aber auch Abweichungen von typischen Mustern und einzigartige Aminosäuren innerhalb eng verwandter Proteine ermittelt werden. Die für diese Arbeit benötigten Sequenzanalysen, sowie deren optische Darstellungen, wurden von Prof. Dr. Eric Beitz LATEX2 $\epsilon$  basiert mit TEXshade durchgeführt (91).

### **3.4.2 3D-Proteinmodelle**

Die dreidimensionalen Koordinaten von Proteinen, für die bereits Kristallstrukturdaten vorlagen wurden der RCSB Protein Data Bank entnommen. Für alle anderen Proteine wurden mit SWISS-MODEL Tertiär- und Quartärstrukturen auf Grundlage von bereits kristallisierten Proteinen, die die größte Sequenzähnlichkeit aufweisen, generiert (92). Die Visualisierung und Erstellung von Abbildungen erfolgte mit Pymol.

### **3.4.3 Berechnung von Poisson-Boltzmann Potenzialen**

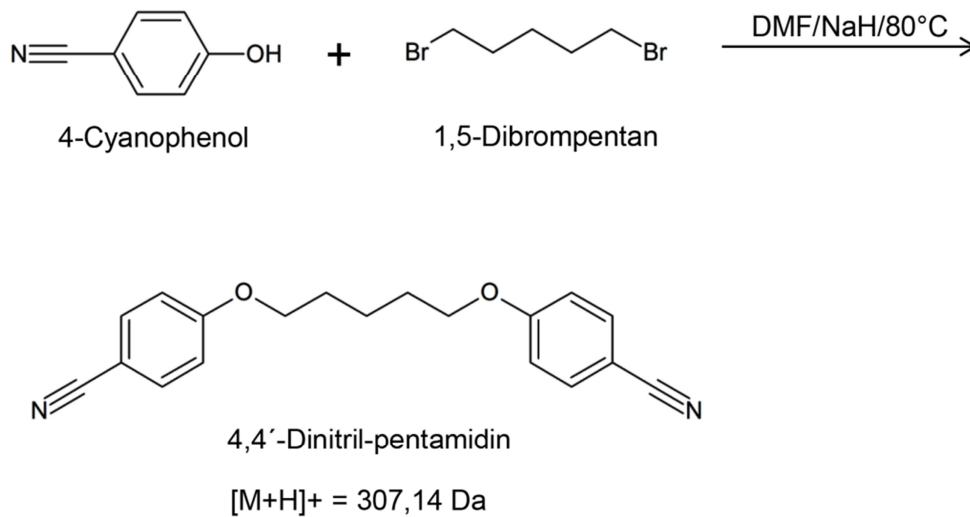
Die computergestützte Berechnung von Poisson-Boltzmann Potenzialen erfordert präzise strukturelle Daten in Bezug auf Atomladungen- und radii, um möglichst realistische Ergebnisse zu generieren.

Die Vorbereitung der aus der Protein Data Bank oder über SWISSMODEL vorliegenden Strukturdateien erfolgte über PDB2PQR-Server. Das Hinzufügen von Schweratomen, die Abschätzung von  $pK_s$  und Protonierungsgrad des Proteins, sowie die Ergänzung fehlender Wasserstoffatome und Zuordnung von Ladungen und Atomradien werden über diese Software abgewickelt (93). Aus dem PDB-Inputfile wurde so ein PQR-Outputfile generiert auf dessen Grundlage mit der APBS-Software die Berechnung der Poisson-Boltzmann Elektrostatik erfolgte (51). Die graphische Darstellung erfolgte über das Programm UCSF Chimera (94).

### 3.5 Chemische Synthesen

#### 3.5.1 Dinitril-pentamidin

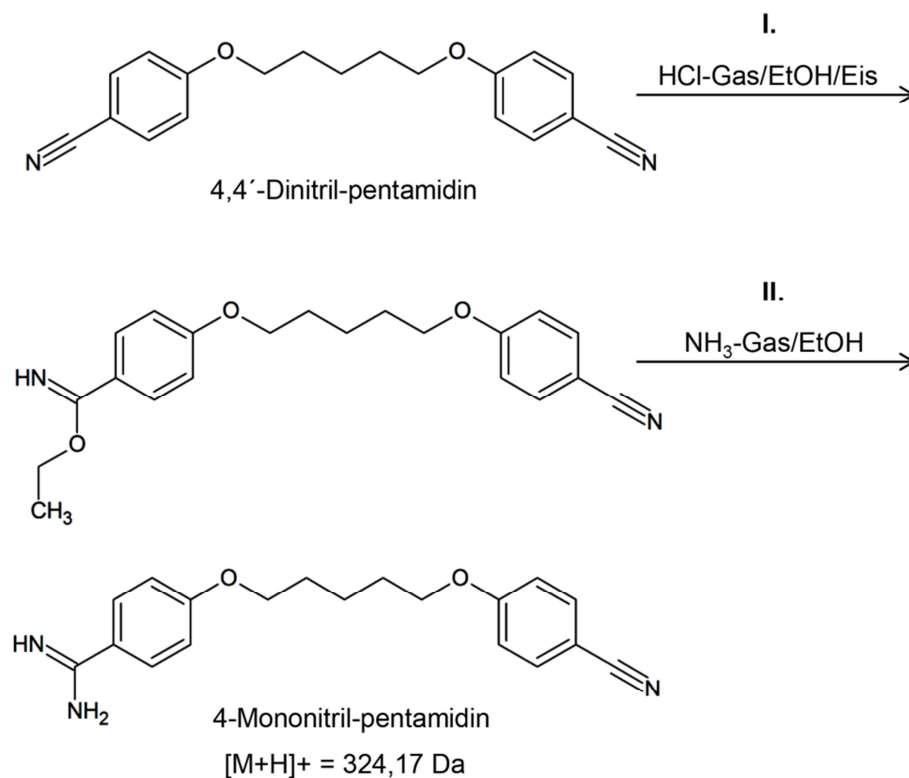
4,4'-Bis(nitril)-diphenoxypentan (Dinitril-pentamidin) wurde in einer nucleophilen Substitution 2. Ordnung aus 4-Cyanophenol und 1,5-Dibrompentan von Björn Henke generiert. 4-Cyanophenol wird in Gegenwart von Natriumhydrid (NaH) deprotoniert und greift als Nukleophil am 1,5-Dibrompentan an. Brom wird als Abgangsgruppe eliminiert und somit zwei Ether geknüpft (Williamson-Ethersynthese) (**Abb. 3.2**).



**Abb. 3.2:** Syntheseweg 4,4'-Dinitril-pentamidin

### 3.5.2 Mononitril-pentamidin

4-(Nitrilo)-4'-(amidino)diphenoxypentan (Mononitril-pentamidin) wurde durch Umsetzung von 4,4'-Dinitril-pentamidin in einer Reaktion nach Pinner generiert. In einem ersten Schritt wurde unter wasserfreien Bedingungen mit HCl-Begasung und mit durch ein Molekularsieb getrocknetem Ethanol das Pinner-Salz, ein hochreaktiver Imidoester, erhalten. Die Reaktion wurde gestoppt bevor beide Nitrilfunktionen zu Iminoestern umgewandelt wurden und das Produkt chromatografisch isoliert. Die Amidinfunktion wurde aus dem Iminoester durch Ammoniakbegasung erhalten. Die Synthese wurde von Björn Henke durchgeführt (**Abb. 3.3**).



**Abb. 3.3:** Syntheseweg von 4-Mononitril-pentamidin

### 3.5.3 4-(PEG)-*Quantum-Dot* gekoppeltes Pentamidin

In einem ersten Schritt wurde 4-Methylamido-pentamidin durch Umsetzung von 4-Mononitril-pentamidin unter HCl-Begasung mit durch ein Molekularsieb getrocknetem Methanol in einer Reaktion nach Pinner generiert. Der reaktive Imidoester wurde mit Amino-(PEG)-*Quantum-Dots* in Boratpuffer pH 8,3 zusammengegeben. Die Synthese wurde von Björn Henke durchgeführt (Abb. 3.4).

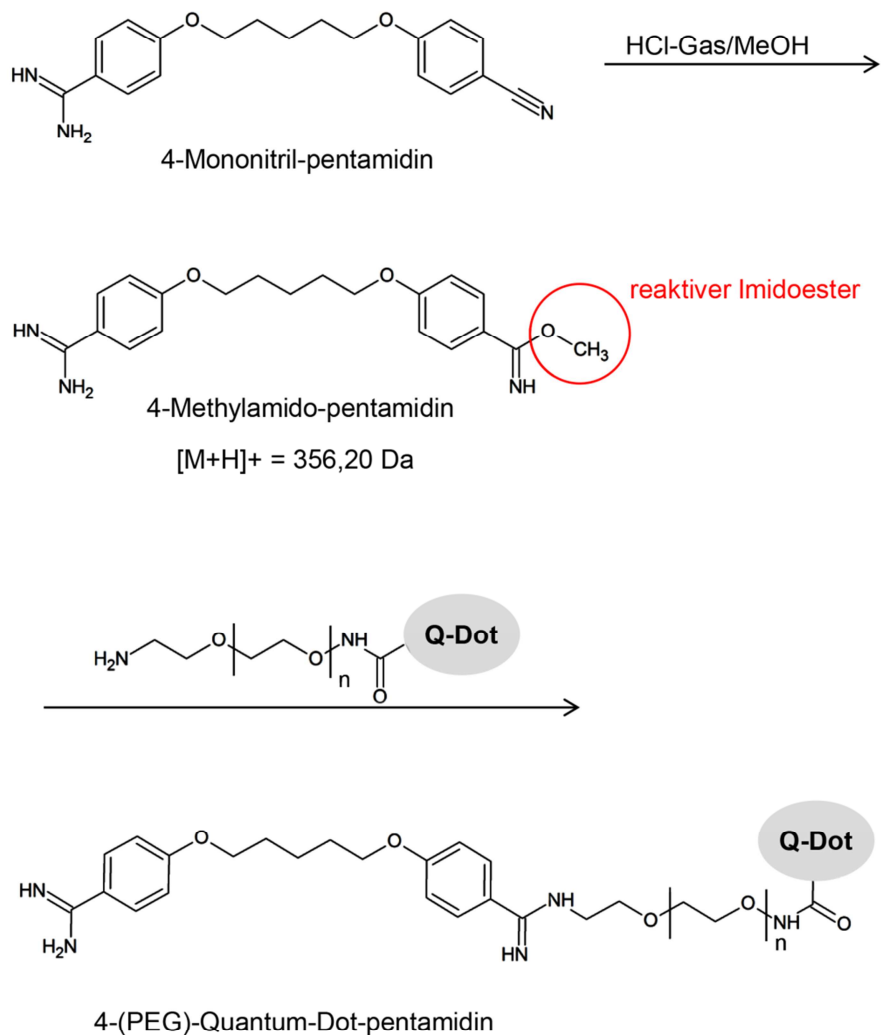


Abb. 3.4: Syntheseweg von 4-(PEG)-*Quantum-Dot*-pentamidin



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen zum TbAQP2

Die in diesem Abschnitt gezeigten Daten sind zum Teil in Zusammenarbeit mit Dr. Jie Song und in Kooperation mit Dr. Dawid Horn, University of Dundee, entstanden. Dies wird an den jeweiligen Stellen gekennzeichnet.

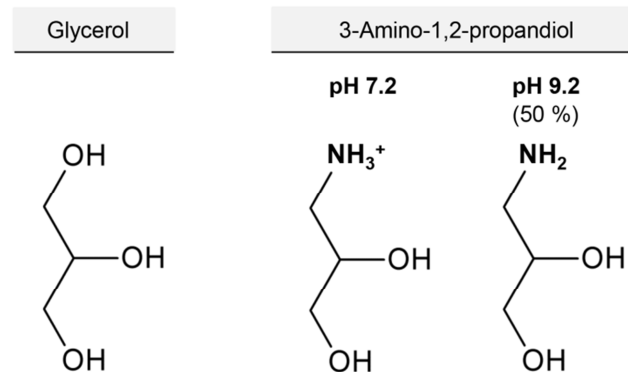
#### 4.1.1 Leitfähigkeit von TbAQP2 für organische Kationen

Um die Frage zu adressieren, ob Pentamidin als di-kationisches Arzneistoffmolekül das Aquaglyceroporin TbAQP2 passieren kann, wurde zunächst die grundsätzliche Leitfähigkeit von TbAQP2 für organische Kationen evaluiert. TbAQP2 hat einen unkonventionellen ar/R-Selektivitätsfilter. Das in der MIP-Familie hochkonservierte positiv geladene Arginin, welches durch eine Abstoßung positiver Ladung zu einem Ausschluss von Kationen beiträgt, ist durch ein neutrales Leucin ersetzt. Die in der NPA-Region essentiellen Asparagine zur Generierung einer positiven Barriere sind jedoch intakt (1.2.1). Die Funktion des Selektivitätsfilters für den Ausschluss positiver Ladung sollte zunächst mit zwei Substanzen überprüft werden, die bei physiologischem pH positiv geladen vorliegen, aber aufgrund ihrer Größe die Restriktionsstellen eines typischen Aquaglyceroporins überwinden könnten: 3-Amino-1,2-propandiol und Formamidin.

Zunächst wurde der Hefestamm *S. cerevisiae* BY4742 $\Delta$ fps1 transformiert (3.1.13). Als Shuttle für die codierende DNA aller in den nächsten Abschnitten aufgeführten *T. brucei* Aquaglyceroporine, sowie deren Mutanten, in die Hefezelle wurde der unter 2.3 aufgeführte *high-copy vector* pHARS426 verwendet (95). Der Hefestamm *S. cerevisiae* BY4742 $\Delta$ fps1 weist eine Deletion des endogenen Aquaglyceroporingens *fps1* auf (96). Dies ermöglicht die isolierte Betrachtung der Funktion eines ausgewählten Aquaglyceroporins. Aus TbAQP2-bildenden Hefezellen wurden durch Zymolyase-20T-Verdau der rigiden Zellwand elastische, osmosensitive Protoplasten präpariert und so einer Funktionsmessung in der Stopped-Flow Apparatur zugänglich gemacht (3.3.3). Die Hefeprotoplasten wurden einem, das entsprechende Testsubstrat enthaltenden, hyperosmotischen Messpuffer (2.7) bei pH 7,2 ausgesetzt und ein chemischer Gradient von 300 mM Solut erzeugt. Diese Bedingungen herrschten, wenn nicht anders beschrieben, bei allen aufgeführten hyperosmotischen Messungen. Volumenänderungen der Hefeprotoplasten aufgrund von Schwell- und Schrumpfungsvorgängen wurden als Änderungen des Streulichtsignals detektiert (3.3.4).

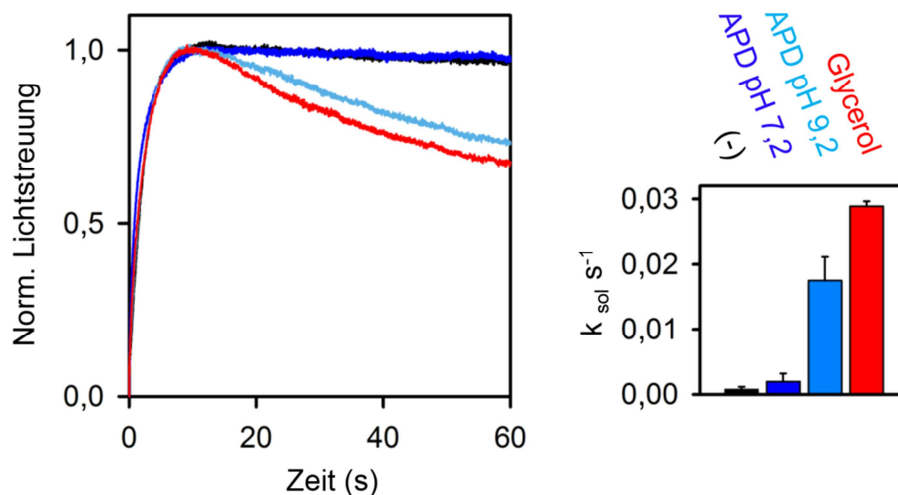
### Leitfähigkeit von TbAQP2 für 3-Amino-1,2-propandiol

Als erstes Testsubstrat wurde 3-Amino-1,2-propandiol herangezogen. Dieses Molekül ist in seiner Struktur nahezu deckungsgleich mit Glycerol, für welches eine gute Leitfähigkeit bekannt ist (1.2.1). Den entscheidenden Unterschied macht eine endständige Aminogruppe. 3-Amino-1,2-propandiol hat einen  $pK_s$ -Wert von 9,2 und liegt unter physiologischen Bedingungen nahezu vollständig protoniert vor (**Abb. 4.1**).



**Abb. 4.1:** Strukturformel von Glycerol (links) im Vergleich zu 3-Amino-1,2-propandiol bei pH 7,2 (Mitte) und pH 9,2 (rechts).

Auf eine Exposition der Protoplasten mit dem hyperosmotischen Messpuffer schrumpften diese zunächst aufgrund eines initialen auswärtsgerichteten Wasserstromes entlang des osmotischen Gradienten. Dies führt zu einer Zunahme des Streulichtsignals und markiert den ersten Abschnitt der biphasischen Kurve (**Abb. 4.2**).



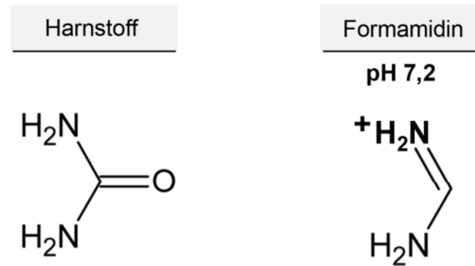
**Abb. 4.2:** Mittelwertkurven aus 6-9 Einzelmessungen aus drei unabhängigen Experimenten (links). Der Einstrom von Glycerol (rot) ist gegen die Leitfähigkeit von TbAQP2 für 3-Amino-1,2-propandiol (APD) bei pH 7,2 (dunkelblau) und 9,2 (hellblau) aufgetragen. Als Vergleich dienen Hefeprotoplasten, die kein Protein exprimieren (schwarz). Rechts sind die Ratenkonstanten des Soluteinstroms aufgetragen. Der S.E.M. wurde aus drei unabhängigen Experimenten berechnet.

## Ergebnisse

Der Kurvenverlauf im zweiten Abschnitt beschreibt den Einstrom von Solut in die Hefeprotoplasten aufgrund des chemischen Gradienten. Unter physiologischen Bedingungen von pH 7,2 konnte für 3-Amino-1,2-propandiol kein Einstrom in die Protoplasten detektiert werden (**Abb. 4.2**, dunkelblaue Kurve). Die Kurve verläuft im zweiten Abschnitt deckungsgleich mit der von Hefeprotoplasten, die kein TbAQP2 bilden (**Abb. 4.2**, schwarze Kurve). Eine Vergleichsmessung mit Glycerol als Solut zeigte, dass TbAQP2 in die Plasmamembran der Hefe integriert wurde und ein funktionsfähiges Protein liefert. Nach einem initialen Wasserausstrom kam es zu einem Einstrom von Glycerol, welcher in der Folge Wasser mit sich zieht und zu einem Schwellen der Protoplasten führt. Dies zeigte sich in einer Abnahme des Streulichtsignals im zweiten Kurvenabschnitt (**Abb. 4.2**, rote Kurve). Zusätzlich wurde die Leitfähigkeit von TbAQP2 für 3-Amino-1,2-propandiol bei pH 9,2 getestet. Dieser pH-Wert entspricht dem pKs-Wert des Solutes. Bei diesen Bedingungen liegen 50 % des Moleküls deprotoniert und damit ungeladen vor. Es zeigte sich ein Einstrom, der zwei Drittel der für Glycerol erhaltenen Rate erreicht (**Abb. 4.2**, hellblaue Kurve). Während das bei pH 7,2 positiv geladene 3-Amino-1,2-propandiol die Kanalpore von TbAQP2 nicht durchqueren konnte, näherte sich die Rate für den Einstrom von 3-Amino-1,2-propandiol im alkalischen Medium bei pH 9,2 dem für Glycerol ermittelten Wert an und korrelierte näherungsweise mit dem Anteil der ungeladenen Form (**Abb. 4.2**, Balkendiagramm). Dieses Ergebnis ist ein erster Hinweis darauf, dass der unkonventionelle Selektivitätsfilter von TbAQP2 dennoch den strengen Ausschluss positiver Ladung gewährleistet. Dieses Ergebnis sollte mit einer weiteren Verbindung abgesichert werden.

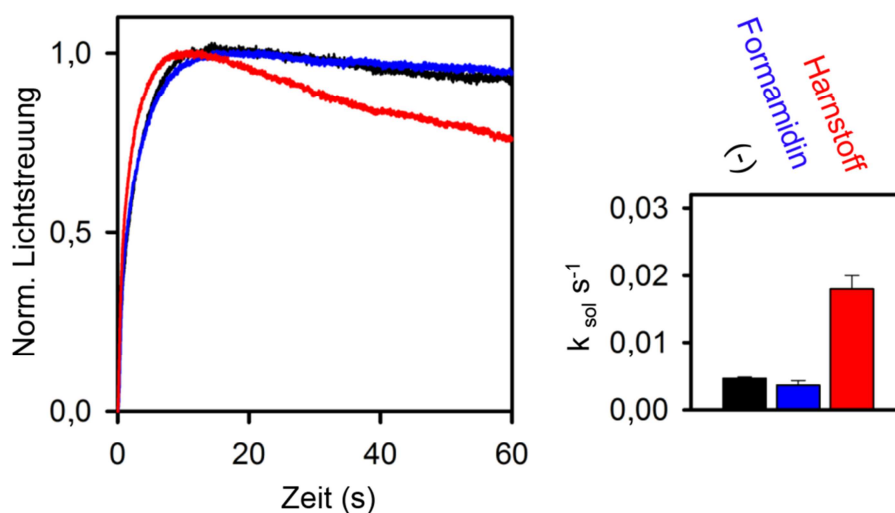
### Leitfähigkeit von TbAQP2 für Formamidin

Als weiteres Testsubstrat wurde Formamidin getestet, welches als eine auf die essentiellen Amidin-Gruppen reduzierte Variante des Pentamidins betrachtet werden kann. Es hat einen berechneten  $pK_s$ -Wert von 13 (MarvinSketch) und liegt unter den Testbedingungen ausschließlich positiv geladen vor. Formamidin ähnelt in seiner Struktur dem Harnstoff, welcher zu einer Passage von TbAQP2 befähigt ist (**Abb. 4.3**).



**Abb. 4.3:** Strukturformel Harnstoff (links) und Formamidin (rechts).

TbAQP2 zeigte bei pH 7,2 keine Leitfähigkeit für Formamidin (**Abb. 4.4**, dunkelblaue Kurve). Die Kurve verlief deckungsgleich mit der Kurve für Protoplasten von Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin herstellen (**Abb. 4.4**, schwarze Kurve). Für Harnstoff ergab sich ein Einstrom (**Abb. 4.4**, rote Kurve). Eine ergänzende Messung beim  $pK_s$ -Wert des Formamidins war nicht möglich, da Protoplasten ein alkalisches Milieu von pH 13 nicht tolerieren. Dieses Messergebnis bestätigt im Einklang mit den für 3-Amino-1,2-propandiol ermittelten Daten, dass der Ausschluss positiver Ladung durch TbAQP2 gewährleistet ist.

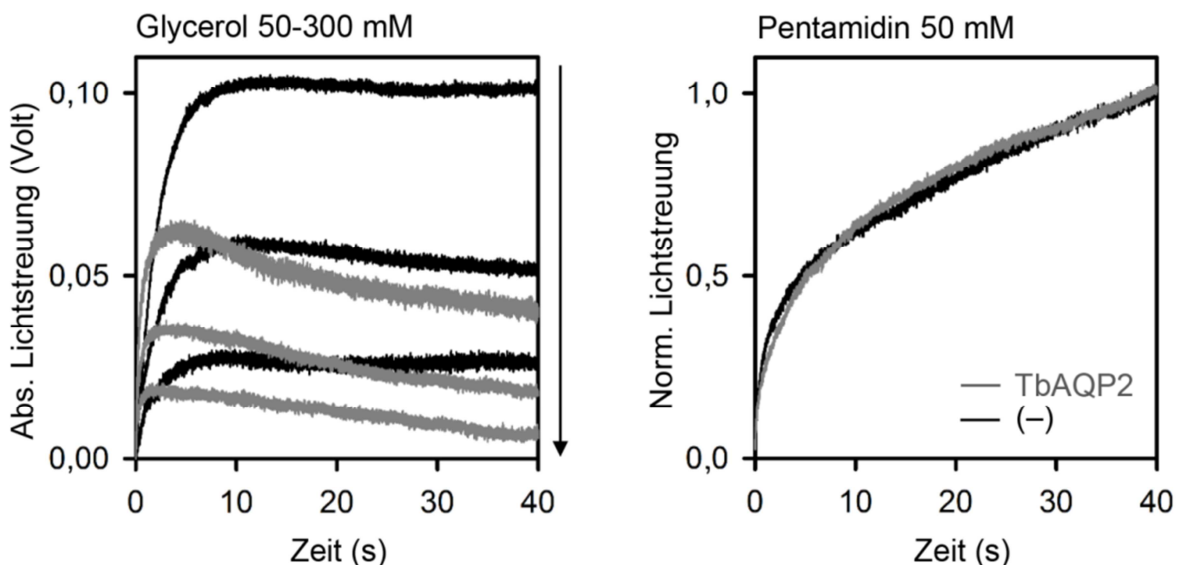


**Abb. 4.4:** Mittelwertkurven aus 6-9 Einzelmessungen aus drei unabhängigen Experimenten (links). Der Einstrom von Harnstoff (rot) ist gegen die Leitfähigkeit von TbAQP2 für Formamidin bei pH 7,2 (dunkelblau) aufgetragen. Als Vergleich dienen Protoplasten von Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin bilden (schwarz). Rechts sind die Ratenkonstanten des Soluteinstroms aufgetragen. Der S.E.M. wurde aus drei unabhängigen Experimenten berechnet.

### Leitfähigkeit von TbAQP2 für Pentamidin

Die Ergebnisse werfen die Frage auf, wie das 340 Da große und mit einem  $pK_s$  von 12,1 bei physiologischen Bedingungen durchweg positiv geladene Pentamidin TbAQP2 passieren kann, wenn zwei kleine Solute wie 3-Amino-1,2-propandiol und Formamidin allein an ihrer Ladung scheitern. Im nächsten Schritt sollte eine direkte Messung der Leitfähigkeit von TbAQP2 für Pentamidin durchgeführt werden. Die Löslichkeit des für die Messung verwendeten Pentamidin isethionat Salzes in Wasser liegt bei 100 mM. In dieser Konzentration als Solut zum Messpuffer zugesetzt erlaubt es im Experiment die Generierung eines 50 mM chemischen Gradienten.

Da in vorherigen Messungen stets mit einem 300 mM Solutgradienten gearbeitet wurde, wurde zunächst überprüft, ob auch bei kleineren Gradienten eine ausreichende Auflösung der Messkurven gewährleistet ist. Dazu wurde die Leitfähigkeit von TbAQP2 für Glycerol bei Gradienten von 300 mM, 150 mM und 50 mM überprüft (**Abb. 4.5**, links). Die absolute Lichtstreuung, und damit die Amplituden, verringerten sich mit kleinerem Gradienten. Ein 50 mM Glycerolgradient generierte gerade noch ausreichend aufgelöste Kurven. Die Messung mit einem 50 mM Pentamidingradienten führte hingegen zu nicht auswertbaren Kurven. Diese zeigten einen stetig aufsteigenden Trend, der während einer Messperiode von 40 s nicht in einer Plateauphase endete (**Abb. 4.5**, rechts). Der Grund für den Verlauf ist nicht geklärt.



**Abb. 4.5:** Gestaffelte Darstellung absoluter Kurvenverläufe von TbAQP2 bildenden Hefeprotoplasten (grau) und Hefeprotoplasten, die kein Aquaglyceroporin bilden (schwarz) bei einem 300 mM, 150 mM und 50 mM Glycerolgradienten (links). Normierter Kurvenverlauf bei einem 50 mM Pentamidingradienten. Es handelt sich um Mittelwertkurven aus 6-9 Einzelmessungen.

## Ergebnisse

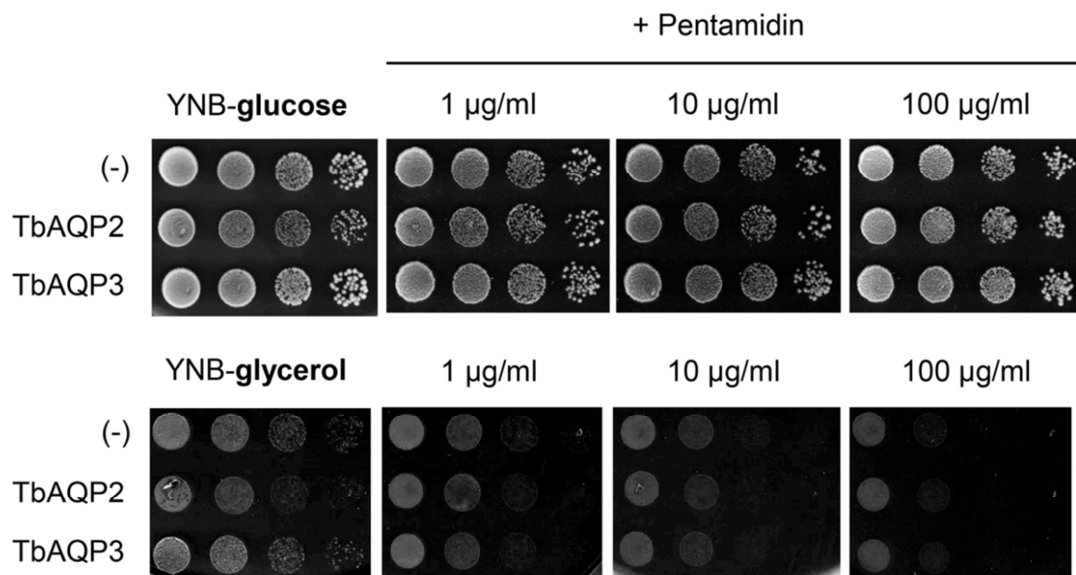
Somit blieb der direkte Nachweis der Leitfähigkeit mit Pentamidin leider aus. Dennoch ist zu erwähnen, dass der Kurvenverlauf der Protoplasten von Hefezellen, die TbAQP2 bilden (graue Kurven) und solcher, die kein Aquaglyceroporin bilden (schwarze Kurven), deckt. Dies kann als weiteres Indiz dafür interpretiert werden, dass Pentamidin nicht zu einer Passage von TbAQP2 befähigt ist.

### **Einfluss von TbAQP2 auf das Wachstum von Hefezellen unter Pentamidinexposition**

Direkte Messungen der Leitfähigkeit von TbAQP2 mit Pentamidin als Solut erwiesen sich im Stopped-Flow Experiment als nicht praktikabel. Aus diesem Grund sollte die Fragestellung in einem phänotypischen Wachstumsassay indirekt adressiert werden.

Für Pentamidin ist neben der Wirksamkeit gegen Protozoen auch ein zytostatischer Effekt in *Fungi* wie *S. cerevisiae* beschrieben (97). Auf Medium mit einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle wie Glycerol hemmt Pentamidin das Wachstum von *S. cerevisiae* schon in geringen Konzentrationen mit einem  $IC_{50}$  von  $1,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Auf Medium mit Glucose als fermentierbarer Kohlenstoffquelle liegt der  $IC_{50}$ -Wert mit  $> 250 \mu\text{g ml}^{-1}$  deutlich höher (97).

Diese literaturbeschriebene Erkenntnis wurde für folgenden Versuch ausgenutzt. Über den Einfluss von TbAQP2 auf das Wachstum von Hefezellen auf pentamidinhaltigem Nährmedium sollten aus diesem Experiment Aussagen über eine Aufnahme von Pentamidin gezogen werden. Als Kontrolle dienten Hefezellen, die kein funktionelles Aquaglyceroporin bilden (–) und solche, die TbAQP3 bilden. Auf glucose-haltigem Medium tolerierten alle Zellen Pentamidin bis zu einer Konzentration von  $100 \mu\text{g/ml}$  ( $168 \mu\text{M}$ ) ohne Auffälligkeiten im Wachstum (**Abb. 4.6**, oben). Auf Medium mit Glycerol als einziger nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung des Wachstums durch Pentamidin schon ab Konzentrationen von  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Die Hefezellen erreichten auch nach 5 Tagen Inkubation nicht die visuelle Dichte der Zellen auf dem Glucose-haltigen Medium (**Abb. 4.6**, unten). Dieses Ergebnis deckt sich mit der Literatur. Als Wachstumskontrolle diente zusätzlich pentamidinfreies YNB-Medium mit Glycerol bzw. Glucose als Kohlenstoffquelle. Hier zeigte sich auf dem glycerolhaltigen Medium ein prinzipiell schlechteres Wachstum im Vergleich zum glucosehaltigen Medium für alle Hefezellen (**Abb. 4.6**, links). Entscheidend ist die Beobachtung, dass die Anwesenheit von TbAQP2 in Hefezellen, im Vergleich zu Hefezellen, die TbAQP3 oder kein Aquaglyceroporin bilden, keine erhöhte Pentamidinsensitivität vermittelt. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass TbAQP2 keine Passage des Pentamidins erlaubt.



**Abb. 4.6:** Vergleich des Wachstumsverhaltens von TbAQP2, TbAQP3 und kein Aquaglyceroporphin bildender *S. cerevisiae* BY4742 $\Delta$ fps1-Zellen auf Selektionsmedium (YNB) mit Glucose als fermentierbarer (oben) und mit Glycerol als nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle (unten) mit aufsteigenden Pentamidinkonzentrationen von 1-100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (rechts).

#### 4.1.2 Inhibitionsstudien mit Pentamidin und Strukturvarianten

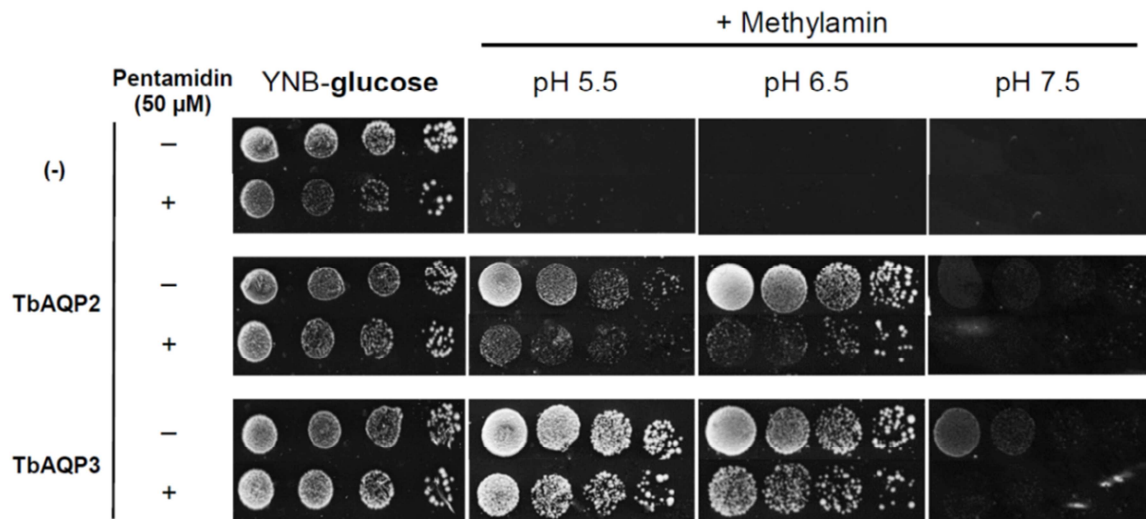
Wie unter 4.1.1 beschrieben, ist trotz der ungewöhnlichen Architektur des TbAQP2-Selektivitätsfilters ein Ausschluss von Kationen gewährleistet. Eine direkte Passage des Pentamidin-Kations in die Trypanosomen ist unwahrscheinlich. Pentamidin weist in Trypanosomen einen  $EC_{50}$ -Wert im einstelligen nanomolaren Bereich auf. Der *knockout* von TbAQP2 zeigt eine Pentamidinresistenz mit einer 15fachen Erhöhung des  $EC_{50}$ -Wertes (1.2). Wenn Pentamidin aber nicht als Solut TbAQP2 durchquert, könnte der Arzneistoff möglicherweise als Inhibitor des Kanalproteins fungieren. Diese Hypothese sollte in weiteren Experimenten überprüft werden.

#### Methylamin-Entgiftungsfähigkeit TbAQP2-bildender Hefezellen bei Pentamidinexposition

Methylamin ist toxisch für Hefezellen. Es hat einen  $pK_s$  von 10,64 und die Aufnahme seines überwiegend vorliegenden Salzes Methylammonium erfolgt aus dem Nährmedium über spezialisierte hefeeigene Ammoniumtransporter (90). Intrazellulär herrscht ein pH-Milieu von 7,2 und das aufgenommene Methylammonium dissoziiert zu 0,036 % toxischem Methylamin. In Zellen, die kein funktionsfähiges Aquaglyceroporin bilden akkumuliert Methylamin und führt zum Zelltod. Zellen, die hingegen ein funktionsfähiges Aquaglyceroporin herstellen, sind in der Lage Methylamin entlang des Gradienten auszuschleusen und zu überleben (90).

Der Methylamin-Wachstums-Assay wurde herangezogen, um den Einfluss von 50  $\mu$ M Pentamidin auf die Entgiftungsfähigkeit von Hefezellen, die TbAQP2 bilden, im Vergleich zu Hefezellen, die TbAQP3 bilden, zu untersuchen. Als Kontrolle dienten Hefezellen, die kein funktionelles Aquaglyceroporin herstellen. Vor Gabe der Zellen auf das Medium wurden diese für 20 min mit Pentamidin inkubiert. Zur generellen Wachstumskontrolle dienten Platten mit YNB-Selektionsmedium. Auf diesem Medium wurde für alle Hefezellen vergleichbar gutes Wachstum beobachtet (**Abb. 4.7**, links). Auf Methylamin-haltigem Medium waren Zellen, die kein funktionsfähiges Protein bilden, bei allen pH-Bedingungen und unabhängig von Pentamidin nicht in der Lage zu wachsen (**Abb. 4.7**, oben). Hefezellen, die funktionsfähiges TbAQP2 und TbAQP3 bilden und nicht mit Pentamidin behandelt wurden, konnten entgiften und zeigten bei pH 5,5 und pH 6,5 Wachstum (**Abb. 4.7**, Mitte und unten, jeweils obere Zeile). Bei pH 7,5 zeigt sich für alle Zellen, aufgrund ähnlicher intra- und extrazellulärer Methylamin Konzentrationen und einem damit fehlenden Gradienten, kein Wachstum. In Hefezellen, die TbAQP2 bildeten, deutete sich nach Inkubation mit Pentamidin eine stärkere Hemmung des Wachstums im Vergleich zu Zellen, die TbAQP3 bilden, an (**Abb. 4.7**, Mitte und unten, jeweils untere Zeile).





**Abb. 4.7:** Vergleich des Wachstumsverhaltens von TbAQP2, TbAQP3 und kein Aquaglyceroporin bildenden *S. cerevisiae* BY4742Δfps1-Zellen auf Methylaminhaltigem Medium bei pH 5,5/6,5/7,5 vor und nach Inkubation mit 50 μM Pentamidin.

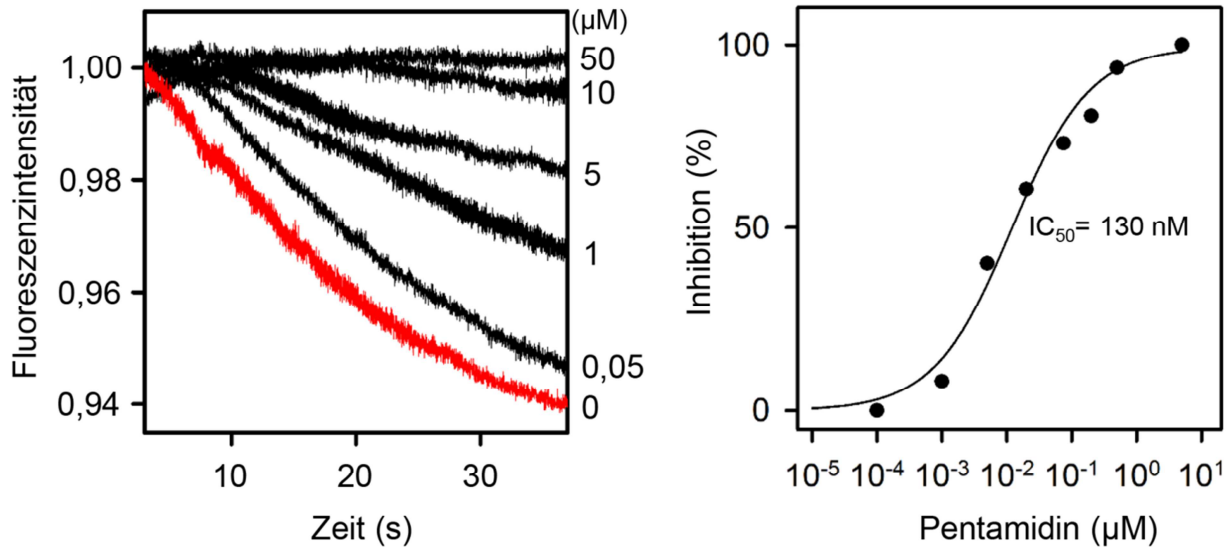
Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass Pentamidin die Kanalpore von TbAQP2 blockiert und die Fähigkeit von Hefezellen einschränkt toxisches Methylamin auszuschleusen, was sich in vermindertem Wachstum zeigt. Phänotypische Assays lassen jedoch nur qualitative Aussagen zu, weshalb ergänzend Funktionsmessungen durchgeführt wurden.

### **Einfluss von Pentamidin auf die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 und TbAQP3**

In Stopped-Flow Messungen wurde die Interaktion von Pentamidin mit TbAQP2 näher untersucht. Als Funktionsparameter wurde die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 herangezogen. Um den Glyceroleinstrom isoliert betrachten zu können, wurde der initiale Wasserausstrom durch isoosmotische Pufferbedingungen eliminiert (98). Wenn nicht anders beschrieben herrschten in allen aufgeführten isoosmotischen Messungen ein chemischer Glycerolgradient von 300 mM und ein pH-Wert von 7,2. Die Hefeprotoplasten wurden 10 min vor der Messung mit ansteigenden Konzentrationen von Pentamidin inkubiert. Für die später aufgeführten Pentamidinderivate wurde analog verfahren.

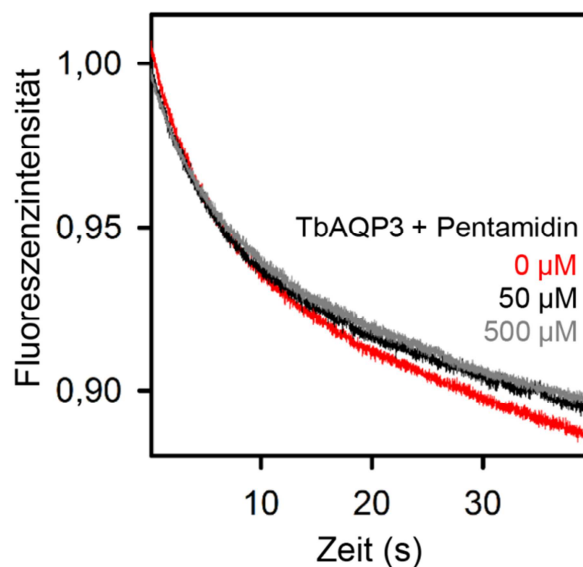
Unbehandelte Protoplasten von TbAQP2-bildenden Hefezellen zeigten ein typisches Schwellverhalten aufgrund eines ungehinderten Glyceroleinstroms, was sich in einer Abnahme des Streulichtsignals zeigte (**Abb. 4.8**, links, rote Kurve). Die Behandlung der Hefeprotoplasten mit Pentamidin resultierte in einer dosisabhängigen Minderung der Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 bereits im nanomolaren Bereich und einer vollständigen Inhibition bei 50 μM (**Abb. 4.8**, links, schwarze Kurven). Eine Auftragung der relativen Glycerolleitfähigkeiten gegen die Pentamidinkonzentration ergab einen IC<sub>50</sub>-Wert von 130 nM (**Abb. 4.8**, rechts).

## Ergebnisse



**Abb. 4.8:** Mittelwertkurven aus 6-9 Einzelmessungen (links) zeigen die dosiabhängige Minderung des Glyceroleinstroms durch TbAQP2 nach Zugabe von 0 µM (rote Kurve) und 0,05-50 µM Pentamidin (schwarze Kurven). Die relative Reduktion der Glycerolleitfähigkeit wurde gegen die Pentamidinkonzentration aufgetragen (rechts).

Pentamidin zeigt damit Eigenschaften eines nanomolaren Inhibitors der Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 in Hefen mit einer bei Aquaglyceroporinen noch nie zuvor gesehener Affinität (39). Die Glycerolleitfähigkeit von Protoplasten TbAQP3-bildender Hefezellen wurde hingegen auch nach Inkubation mit 500 µM Pentamidin nicht gemindert (**Abb. 4.9**). Daraus lässt sich schließen, dass die Affinität von Pentamidin für TbAQP2 spezifisch ist. Beide Messungen wurden von Dr. Jie Song durchgeführt.

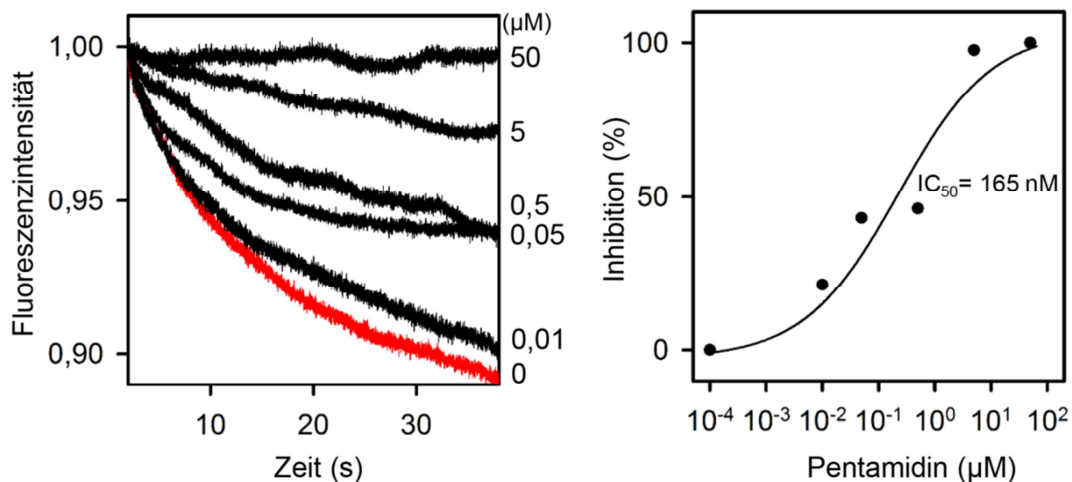


**Abb. 4.9:** Mittelwertkurven aus 6-9 Einzelmessungen zeigen den Glyceroleinstrom durch TbAQP3 in Hefeprotoplasten nach Inkubation mit 0 µM (rot), 50 µM (schwarz) und 500 µM Pentamidin (grau).

### Einfluss des Glycerolgradienten auf die Inhibition von TbAQP2 durch Pentamidin

Pentamidin erreicht bereits in einer Konzentration von 130 nM eine halbmaximale Inhibition des Glyceroleinstromes durch TbAQP2 bei einem vergleichsweise harschen Gradienten von 300 mM.

Es wurde folgend geklärt, ob eine Reduktion des Glycerolgradienten auch zu einer Verringerung der mittleren inhibitorischen Konzentration von Pentamidin für TbAQP2 führt. Die Hefeprotoplasten wurden dazu einem 100 mM Glycerolgradienten ausgesetzt. Auch hier zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion des Glyceroleinstromes in die Hefeprotoplasten nach Inkubation mit Pentamidin (**Abb. 4.10**, schwarze Kurven, links) im Vergleich zu unbehandelten Protoplasten (rote Kurve, links). Es ergab sich ein  $IC_{50}$ -Wert von  $165 \text{ nM} \pm 15 \text{ nM}$ . Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung, wie der von Dr. Jie Song bei einem Glycerolgradienten von 300 mM gemessene Wert von 130 nM. Mit diesem Experiment zeigte sich, dass die mittlere inhibitorische Konzentration von Pentamidin für TbAQP2 in einem Intervall von 100-300 mM vom Glycerolgradienten unabhängig ist.



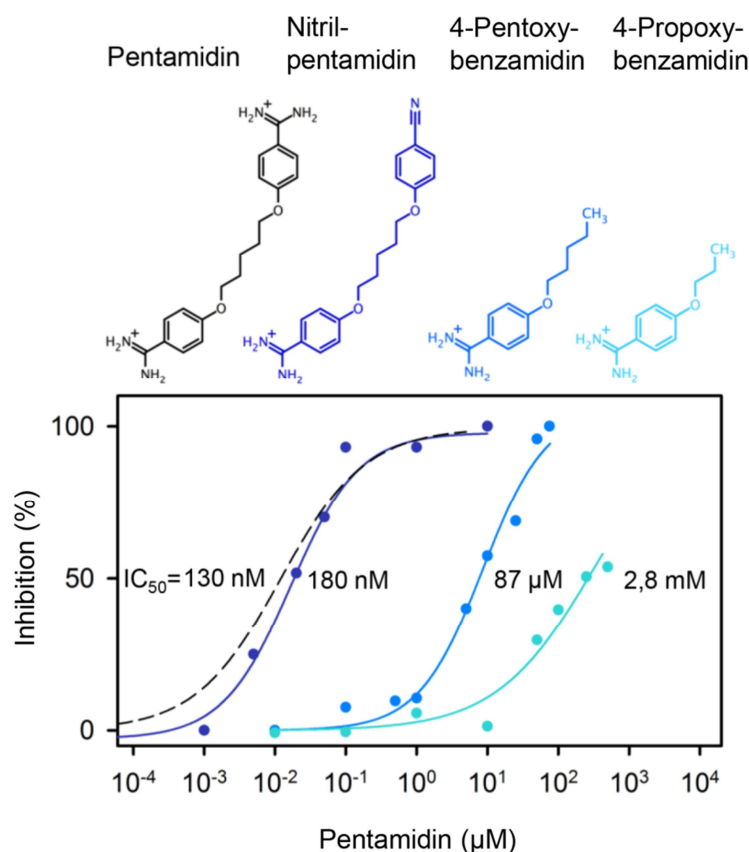
**Abb. 4.10:** Mittelwertkurven aus 6-9 Einzelmessungen (links). Der Verlauf der roten Kurve beschreibt den ungehemmten Einstrom. Die dosisabhängige Minderung der Glycerolleitfähigkeit durch Inkubation mit 0,01-50  $\mu\text{M}$  Pentamidin ist in schwarz dargestellt. Die relative Reduktion der Glycerolleitfähigkeit ist gegen die Pentamidinkonzentration aufgetragen (rechts).

Dieses Ergebnis kann so interpretiert werden, dass Pentamidin mit einer millionenfach höheren Affinität als der natürliche Solut Glycerol bindet. Glycerol weist eine so schwache Affinität zu TbAQP2 auf, dass der Gradient im Sinne einer Verdrängung des Pentamidins keine Rolle spielt.

### Einfluss einfach positiver Pentamidinderivate auf die Glyceroleitfähigkeit von TbAQP2

Um die für die hohe Affinität essentiellen Strukturen des Pentamidins herauszuarbeiten, wurden Strukturvarianten des Arzneistoffes von Dr. Ellen Mak (Dissertation 2014) und Björn Henke synthetisiert (3.5.2). Die Testung auf die inhibitorische Wirkung dieser Substanzen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Jie Song durchgeführt.

Eine leichte Variation stellt die Substitution einer Amidin-Gruppe gegen eine Nitrilfunktion im Nitril-pentamidin dar. Damit wurde die Größe des Pentamidins erhalten und die grundlegende Änderung lag in der Eliminierung einer positiven Ladung. Das Derivat erreichte mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 180 nM (Abb. 4.11, dunkelblau) eine mit der Ausgangsverbindung Pentamidin (gestrichelt) vergleichbare Hemmwirkung auf den Glyceroleinstrom in Hefeprotoplasten durch TbAQP2. Die Anwesenheit von nur einer Amidinfunktion reichte demnach für eine vollständige Inhibition aus. Asymmetrische Varianten mit nur einer Benzamidinfunktion und sukzessiven Kettenverkürzung resultierten in einer geringeren Affinität zu TbAQP2.



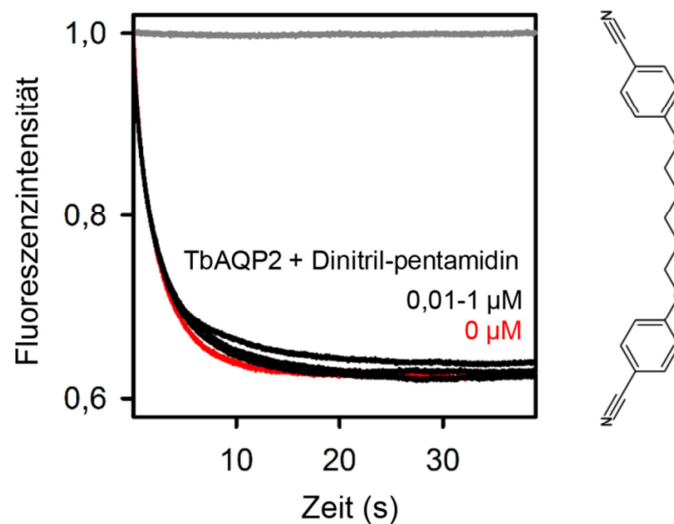
**Abb. 4.11:** Struktur-Funktions-Evaluierung von Pentamidin auf die Inhibition von TbAQP2 mit resultierenden  $IC_{50}$ -Werten. Die Struktur der getesteten Pentamidin-Derivate ist oben abgebildet. Die Testung der Varianten 4-Pentoxy-benzamidin (mittelblau) und 4-Propoxy-benzamidin (türkis) wurde von Dr. Jie Song durchgeführt und sind bereits in der Dissertation von Dr. Ellen Mak (2014) veröffentlicht. Der Verlauf der  $IC_{50}$ -Kurve von Pentamidin ist als Vergleich mit abgebildet (schwarz, gestrichelt).

## Ergebnisse

Für das 4-Pentoxy-benzamide (Abb. 4.11, mittelblau) zeigte sich mit einem  $IC_{50} = 87 \mu\text{M}$  eine 670fache und für das 4-Propoxy-benzamidin (Abb. 4.11, türkis) mit  $IC_{50} = 2,8 \text{ mM}$  eine 22.000fache Minderung der Affinität zu TbAQP2. Zudem konnte 4-Propoxy-benzamidin nur 60 % der maximalen Inhibition entfalten. Für die 4-Methoxy-Variante konnte keine Hemmung der Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 beobachtet werden. Sowohl die lipophile aliphatische Kette als auch die Phenylgruppen scheinen maßgeblich zur Affinität des von Pentamidin zu TbAQP2 beizutragen.

### **Einfluss eines ungeladenen Pentamidinderivates auf die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2**

Eine Benzamidinfunktion im Pentamidin reichte bereits aus, um eine vollständige Inhibition des Glyceroleinstroms durch TbAQP2 zu entfalten. Es wurde im Folgenden ein Pentamidinderivat getestet, in dem beide Amidin-Funktionen durch Nitril-Gruppen substituiert sind und welches demzufolge neutral vorliegt. Das Dinitril-pentamidin zeigte trotz seiner hohen Strukturähnlichkeit zu Pentamidin bis zu einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  keinen Einfluss auf die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 (Abb. 4.12). Konzentrationen von  $> 1 \mu\text{M}$  konnten mit dieser Substanz leider nicht getestet werden, da die Messkurven Störsignale und unrealistische Verläufe im Sinne von Drifts zeigten.



**Abb. 4.12:** Mittelwertkurven aus 6-9 Einzelmessungen. Der Verlauf der roten Kurve beschreibt den ungehemmten Einstrom durch TbAQP2. Die schwarzen Kurven resultieren nach Zugabe von  $0,01-1 \mu\text{M}$  Dinitril-Pentamidin. Die graue Kurve zeigt den Verlauf von Hefeprotoplasten, die kein Protein bilden.

Dennoch lässt sich eine entscheidende Aussage aus diesem Ergebnis ziehen. Sowohl Pentamidin als auch das einfach positive Dinitril-pentamidin hemmten bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 um  $> 70 \%$ , während beim neutralen Dinitril-pentamidin die Hemmung ausblieb. Damit zeigte sich die Relevanz von mindestens einer Amidinfunktion.

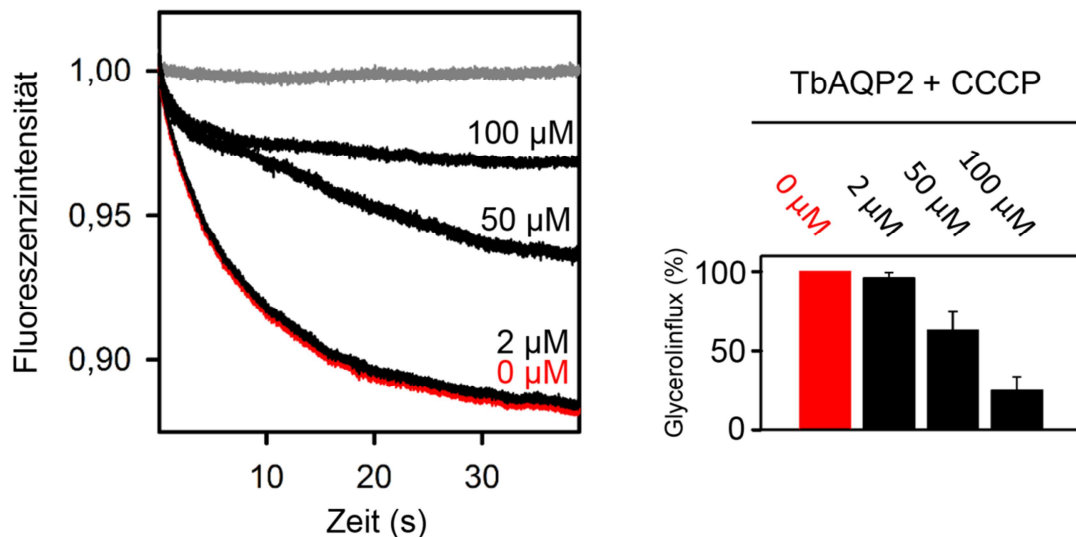
### 4.1.3 Effekt von Protonophoren auf die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2

Die Erhöhung des  $EC_{50}$ -Wertes von Pentamidin durch einen *knockdown* trypanosomaler  $H^+$ -ATPasen und durch Protonophore wie Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazon (CCCP), Gramicidin und Nigericin verminderte Aufnahmeraten von Pentamidin in Trypanosomen, führten in der Literatur zu der These eine protonengesteuerte Aufnahme des Pentamidins über TbAQP2 in der Funktion eines Protonen-Symporters (56, 57, 99).

Um zu erfahren, inwieweit Protonophore die Funktion von TbAQP2 beeinflussen, wurde der Effekt der ausgewählten Substanzen CCCP und Gramicidin auf dessen Glycerolleitfähigkeit unter isoosmotischen Bedingungen an der Stopped-Flow Apparatur getestet. Die Protonophore wurden 20 min vor der Messung zu den Hefeprotoplasten gegeben.

#### Einfluss von CCCP auf die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2

In einem ersten Schritt wurde die Glycerolleitfähigkeit von unbehandelten Protoplasten von Hefezellen, die TbAQP2 bilden, aufgezeichnet und die ermittelte Rate des Einstroms als 100 % Glyceroleinstrom definiert (Abb. 4.13, rote Kurve, links; roter Balken, rechts). Die Behandlung der Hefeprotoplasten mit 2  $\mu$ M CCCP beeinflusste den Glyceroleinstrom nicht. Eine Steigerung der Konzentration zeigte hingegen deutliche Effekte. 50  $\mu$ M CCCP führten zu einer Reduktion des Einstroms auf 63 % und 100  $\mu$ M CCCP sogar zu einer Reduktion auf 25 %.

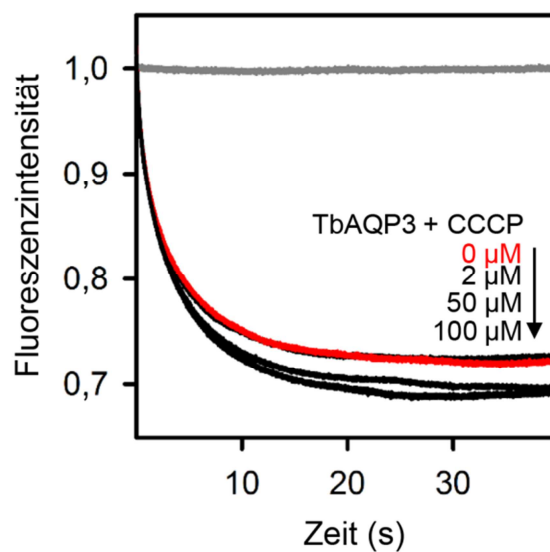


**Abb. 4.13:** Einfluss von CCCP auf die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 vor (rot) und nach Behandlung mit 2-100  $\mu$ M CCCP (schwarz). Dargestellt sind Mittelwertkurven aus 6-9 Einzelmessungen. Die graue Kurve zeigt den Verlauf von Protoplasten, die kein Aquaglyceroporin bilden (links). Das Balkendiagramm zeigt den prozentualen Anteil am maximalen Glycerolinflux nach Zusatz aufsteigender CCCP-Konzentrationen 2-100  $\mu$ M. Als Bezugswert wurde der nicht inhibierte Glyceroleinstrom mit 100 % angenommen (0  $\mu$ M CCCP). Die Fehlerbalken zeigen den S.E.M. aus drei unabhängigen Experimenten (rechts).

## Ergebnisse

Damit erreicht CCCP einen in der Größenordnung vergleichbaren inhibitorischen Effekt auf die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 wie das asymmetrische 4-Pentoxy-benzamidin (4.1.2). Es handelt sich mit CCCP also um einen schwachen Inhibitor des TbAQP2, jedoch mit 300-400fach geringerer Affinität als Pentamidin.

Aus der Literatur ist bekannt, dass bei einem 100 nM Pentamidingradienten bereits 5  $\mu\text{M}$  CCCP zu einer 50%igen Reduktion der Aufnahme rate über TbAQP2 in die Trypanosomen führen (99). Damit lag CCCP im Vergleich zum Pentamidin in einem 50fachen Überschuss vor, der trotz deutlich geringerer Affinität zu einer teilweisen Verdrängung des Pentamidins vom TbAQP2 geführt haben könnte.



**Abb. 4.14:** Glycerolleitfähigkeit von TbAQP3 nach Inkubation mit 0  $\mu\text{M}$  (rote Kurve) oder 2-100 $\mu\text{M}$  CCCP (schwarze Kurven). Dargestellt sind Mittelwertkurven aus 6-9 aus Einzelmessungen. Die graue Kurve zeigt den Verlauf von Protoplasten, die kein Aquaglyceroporin bilden.

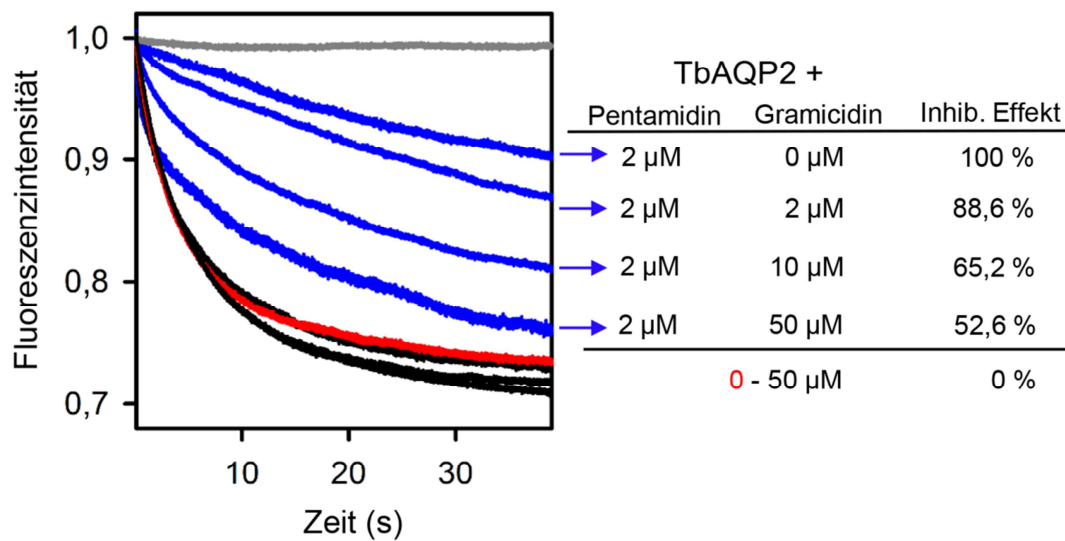
Um zu überprüfen, ob die Hemmung durch CCCP für TbAQP2 spezifisch ist, wurde die Messung analog mit Protoplasten von Hefezellen durchgeführt, die TbAQP3 bilden. Für TbAQP3 zeigte sich bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  CCCP keine Verminderung des Glyceroleinstroms (**Abb. 4.14**, schwarze Kurven) im Vergleich zu unbehandelten Hefeprotoplasten (rote Kurve).

### **Einfluss von Gramacidin auf die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2**

Die Zugabe von Gramacidin in einem Bereich von 2-50  $\mu\text{M}$  beeinflusste die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 nicht (**Abb. 4.15**, schwarze Kurven). Der Verlauf der Kurven deckte sich mit dem unbehandelten Hefeprotoplasten (**Abb. 4.15**, rote Kurve). Damit konnte anders als für CCCP eine Hemmwirkung von Gramacidin auf die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 ausgeschlossen

## Ergebnisse

werden. Eine simultane Inkubation der Protoplasten mit Gramacidin und Pentamidin zeigte überraschend eine dosisabhängige Minderung des inhibitorischen Effektes von Pentamidin (**Abb. 4.15**, blaue Kurven). Die Zugabe von Pentamidin in einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  reduzierte in diesem Experiment die Glycerolleitfähigkeit um 93,7 %. Diese Spanne wurde als 100 % inhibitorischer Effekt definiert und die erhaltenen Ratenkonstanten nach Gramacidinzugabe dazu ins Verhältnis gesetzt (**Abb. 4.15**, Tab. rechts). Die Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  Gramacidin reduzierte den inhibitorischen Effekt von Pentamidin auf 88,6 %, die Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  auf 65,2 % und die Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  auf 52,6 %.



**Abb. 4.15:** Einfluss von Gramacidin A auf die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2. Dargestellt sind Mittelwertkurven aus 6-9 Einzelmessungen. Die graue Kurve zeigt den Verlauf von Protoplasten, die kein Aquaglyceroporin bilden. Die rote und die schwarzen Kurven zeigen den Verlauf nach Zusatz aufsteigender Gramacidin A Konzentrationen von 0-50  $\mu\text{M}$ . Der Einfluss von Gramacidin A auf die inhibitorische Wirkung von Pentamidin zeigt sich im Verlauf der blauen Kurven. Die zugesetzten Konzentrationen sind der Tab. zu entnehmen (rechts).

Das heißt, dass ein 25facher Gramacidinüberschuss die hemmende Wirkung von Pentamidin auf den Glyceroleinstrom durch TbAQP2 in Hefeprotoplasten halbierte. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei einem 100 nM Pentamidingradienten der Zusatz von 1  $\mu\text{M}$  Gramacidin, d.h. ein 10facher Überschuss, ausreicht, die Aufnahme von Pentamidin in Trypanosomen um mehr als 80 % zu reduzieren (99). Damit ähneln sich die Ergebnisse aus Literatur und dieser Arbeit in der Größenordnung.

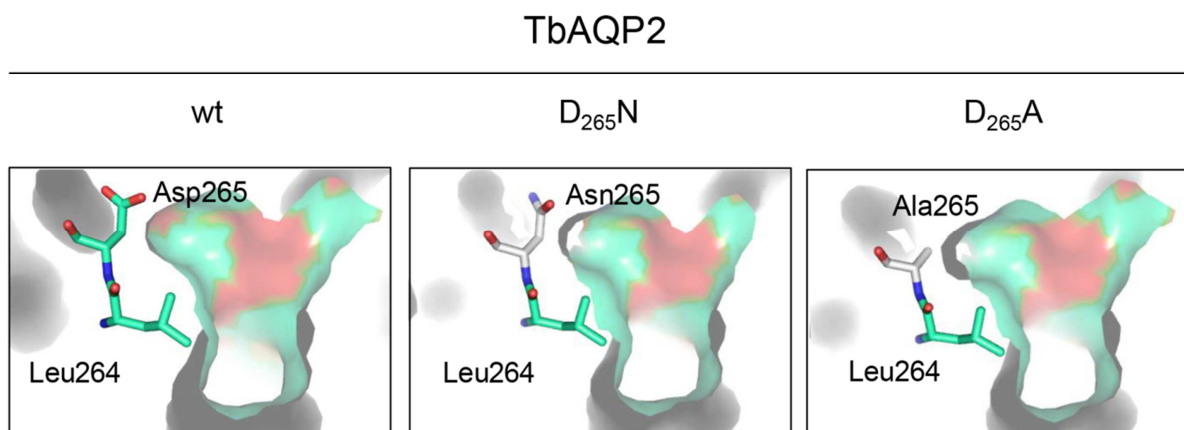
Eine mögliche Erklärung der Beobachtung ist eine Wechselwirkung zwischen Gramacidin und Pentamidin. Das heißt, bevor Pentamidin mit TbAQP2 interagieren konnte wurde es eventuell von Gramacidin gebunden und war dem System nicht mehr zugänglich. Die Wechselwirkung von Pentamidin und Gramacidin wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht.



#### 4.1.4 Untersuchungen der Punktmutationen TbAQP2-D<sub>265</sub>A und D<sub>265</sub>N

Die Evaluierung von Struktur-Funktions-Beziehungen zeigte die Wichtigkeit der Kettenlänge und positiven Ladung für die Affinität von Pentamidin zu TbAQP2. So ist die höchste Affinität an das Vorhandensein der vollständigen Mittelkette beider Phenylether, sowie eine Amidinfunktion gebunden. Die Erforderlichkeit mindestens einer positiven Ladung weist auf eine elektrostatische Interaktion mit TbAQP2 hin (4.1.2).

Die Länge der Pentoxykette entspricht mit 7-8 Å der Tiefe des ar/R-Selektivitätsfilters im Poreninneren (21). Dies deutet auf eine elektrostatische Wechselwirkung im Bereich der Filterebene hin. TbAQP2 hat anstelle des hochkonservierten Arginin an Position 264 ein neutrales Leucin im ar/R-Selektivitätsfilter (1.2.1). Ein benachbartes Aspartat<sub>265</sub> könnte damit seine negative Säurefunktion für eine elektrostatische Interaktion an der Porenoberfläche zur Verfügung stellen (**Abb. 4.16**, links). Der Einfluss eines Aminosäureaustausches des potenziell wichtigen Aspartates<sub>265</sub> auf die Wirkung von Pentamidin wurde im Folgenden untersucht.



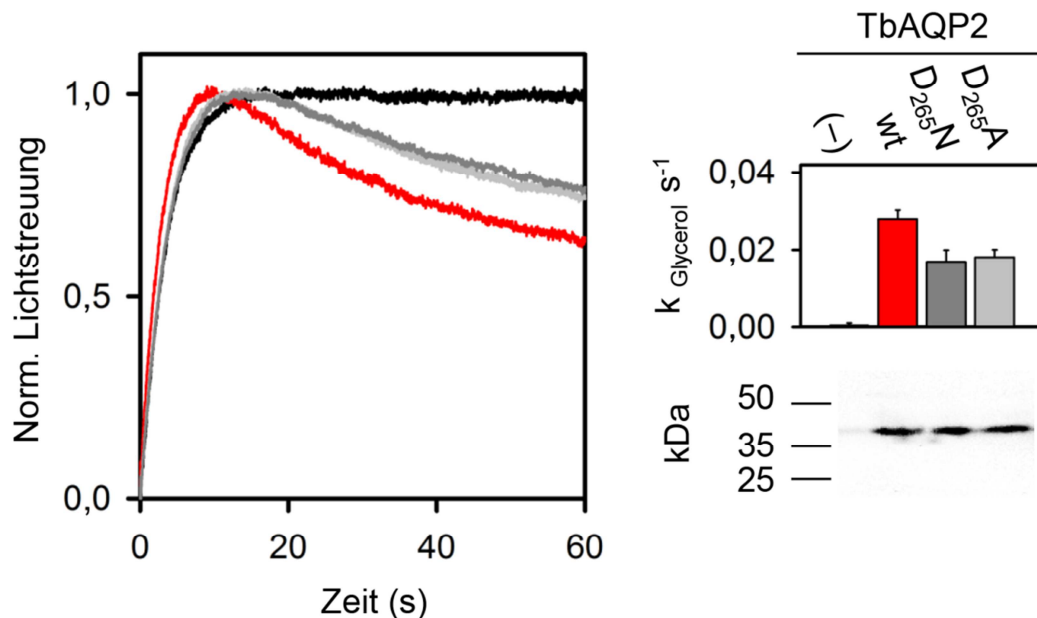
**Abb. 4.16:** Pymoldarstellung von Wildtyp-TbAQP2 (links) und der Mutante TbAQP2-D<sub>265</sub>N (Mitte) und TbAQP2-D<sub>265</sub>A. Sauerstoffatome sind in rot, Stickstoffatome in blau und Kohlenstoffatome in türkis dargestellt. Die Kohlenstoffe des Aminosäureaustausches sind in weiß abgebildet. Die Modellstruktur wurde mit SWISS-MODEL auf Grundlage der Kristallstruktur von *E. coli* GlpF (PDB#1FX8) erstellt.

Durch eine Mutagenese-PCR (3.1.10) wurde die Basensequenz von TbAQP2 dahingehend verändert, dass sie anstelle des Aspartat<sub>265</sub> für ein neutrales Alanin (TbAQP2-D<sub>265</sub>A) bzw. Asparagin (TbAQP2-D<sub>265</sub>N) codierte. Der Aminosäureaustausch des Aspartats gegen ein Asparagin stellt einen bioisosterischen Ersatz dar und bedeutet wahrscheinlich den mildesten Eingriff in die Proteinstruktur (**Abb. 4.16**, Mitte). Die Substitution des Aspartats gegen ein kleineres Alanin stellt hingegen einen stärkeren Eingriff dar (**Abb. 4.16**, rechts).

### Einfluss des Aminosäureaustauschs von Aspartat<sub>265</sub> auf die Funktion von TbAQP2

Zunächst wurden *S. cerevisiae* BY4742 $\Delta$ fps1 Hefezellen transformiert und die erfolgreiche Herstellung der Proteine in einem Western Blot bestätigt (Abb. 4.17, unten rechts). Durch den Aminosäureaustausch kam es zum einen zu einer Eliminierung der positiven Ladung und zum anderen zu einer Verkürzung der Seitenkette im Fall von TbAQP2-D<sub>265</sub>A. Dies kann einen Einfluss auf die Proteinstruktur in der Porenregion haben. Aus diesem Grund wurde als Funktionsparameter zunächst die Glycerolleitfähigkeit der Proteine TbAQP2-D<sub>265</sub>A und TbAQP2-D<sub>265</sub>N im Vergleich zum Wildtyp unter hyperosmotischen Bedingungen in der Stopped-Flow Apparatur getestet.

Protoplasten von Hefezellen, die TbAQP2 bilden, zeigten einen typischen Kurvenverlauf. Nach einem initialen Wasserausstrom im aufsteigenden Ast kam es zu einem langsamen Einstrom von Glycerol im absteigenden Ast (Abb. 4.17, rote Kurve). TbAQP2-D<sub>265</sub>A und TbAQP2-D<sub>265</sub>N zeigten einen analogen Verlauf mit einem langsameren Glyceroleinstrom im zweiten Kurvenabschnitt (Abb. 4.17, hellgraue Kurve bzw. dunkelgraue Kurve). Die Proteine waren funktionell und erreichten 64 % der für TbAQP2 ermittelten Ratenkonstante (Abb. 4.17, Balkendiagramm rechts oben).



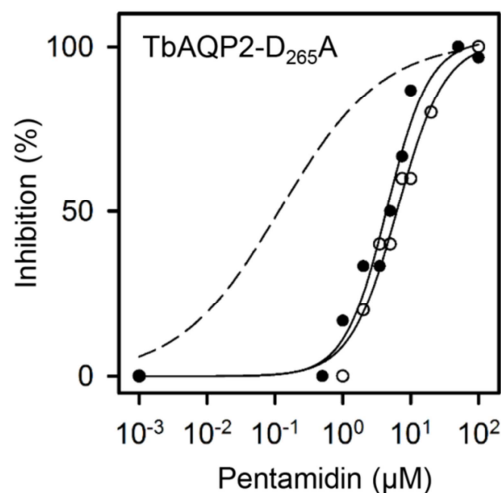
**Abb. 4.17:** Mittelwertkurven aus jeweils 6-9 Einzelmessungen aus drei unabhängigen Experimenten (links). Es ist Einstrom von Glycerol durch Wildtyp-TbAQP2 (rot), TbAQP2-D<sub>265</sub>A (hellgrau) und TbAQP2-D<sub>265</sub>N (dunkelgrau) aufgetragen. Als Vergleich dienten Protoplasten, die kein Aquaglyceroporin bilden (schwarz). Die Balkendiagramme zeigen die Ratenkonstanten des Glyceroleinstroms. Die Fehlerbalken indizieren den S.E.M.(rechts, oben). Der Western Blot zeigt die erfolgreiche Herstellung der Proteine in der Membranfraktion von *S. cerevisiae* BY4742 $\Delta$ fps1. Pro Spur wurden 100  $\mu$ g Gesamtprotein aufgetragen (rechts, unten).

## Ergebnisse

Da es sich bei den im folgenden gezeigten isoosmotischen Inhibitionsstudien mit Pentamidin um Messungen innerhalb einer Proteinvariante geht, spielt der leichte Funktionsverlust von TbAQP2-D<sub>265</sub>A und TbAQP2-D<sub>265</sub>N gegenüber dem Wildtyp-TbAQP2 keine Rolle.

### Einfluss von Pentamidin auf die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2-D<sub>265</sub>A

Der Einfluss von Pentamidin auf die Glycerolleitfähigkeit von Protoplasten TbAQP2-D<sub>265</sub>A bildender Hefezellen wurde analog zum Wildtyp-TbAQP2 (4.1.2) getestet. Es zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion des Glyceroleinstromes, allerdings ergab die resultierende Inhibitionskurve bei pH 7,2 eine deutliche Verschiebung zu höheren Pentamidinkonzentrationen (**Abb. 4.18**, gefüllte Kreise) im Vergleich zum Wildtyp (gestrichelte Linie). Es ergab sich durch den Aminosäureaustausch ein IC<sub>50</sub> = 4,5 µM, was einer 35fachen Verringerung der Affinität von Pentamidin entspricht. Um die Rolle anderer negativ geladener Aminosäuren bei der Interaktion mit Pentamidin auszuschließen, wurde das gleiche Experiment bei pH 2,5 durchgeführt. Unter diesen Bedingungen liegen Aspartate (pK<sub>s</sub> = 3,7) und Glutamate (pK<sub>s</sub> = 4,3) größtenteils protoniert und damit ungeladen vor. Die resultierende Inhibitionskurve verlief deckungsgleich mit der bei pH 7,2 erhaltenen Kurve (**Abb. 4.18**, leere Kreise). Der IC<sub>50</sub>-Wert von 5,8 µM lag ebenfalls in der gleichen Größenordnung

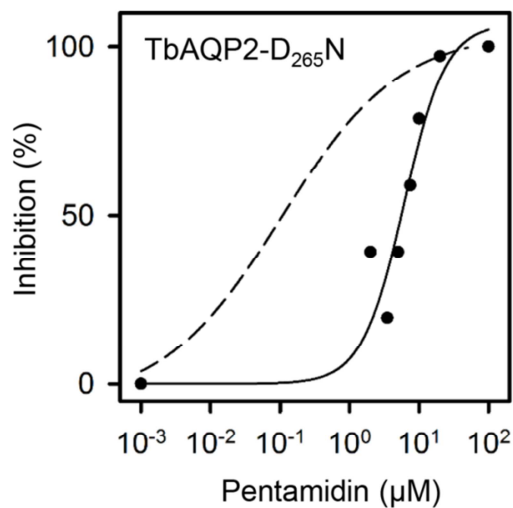


**Abb. 4.18:** Inhibitorische Wirkung von Pentamidin auf die Leitfähigkeit von TbAQP2-D<sub>265</sub>A bei pH 7,2 (leere Kreise) und bei pH 2,5 (gefüllte Kreise). Jeder Punkt wurde aus Mittelwertkurven aus jeweils 6-9 Einzelmessungen erhalten. Die gestrichelte Kurve zeigt den Verlauf von Wildtyp-TbAQP2.

Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die inhibitorische Wirkung von Pentamidin vom pH-Wert unabhängig ist und ausschließlich das Aspartat<sub>265</sub> für die elektrostatische Wechselwirkung von TbAQP2 mit Pentamidin verantwortlich ist.

### Einfluss von Pentamidin auf die Glyceroleitfähigkeit von TbAQP2-D<sub>265</sub>N

Analog wurde der Einfluss von Pentamidin auch auf die Mutante TbAQP2-D<sub>265</sub>N untersucht. Es zeigte sich äquivalent zum TbAQP2-D<sub>265</sub>A eine dosisabhängige Reduktion des Glyceroleinstromes mit einer deutlichen Verschiebung der resultierenden Inhibitionskurve hin zu höheren Pentamidinkonzentrationen. Es ergab sich bei neutralen Bedingungen von pH 7,2 eine mittlere inhibitorische Konzentration von  $IC_{50} = 5,1 \mu\text{M}$  (Abb. 4.19).



**Abb. 4.19:** Inhibitorische Wirkung von Pentamidin auf die Leitfähigkeit von TbAQP2-D<sub>265</sub>A bei pH 7,2 (gefüllte Kreise). Jeder Punkt wurde aus Mittelwertkurven aus jeweils 6-9 Einzelmessungen erhalten. Die gestrichelte Kurve zeigt den Verlauf von Wildtyp-TbAQP2.

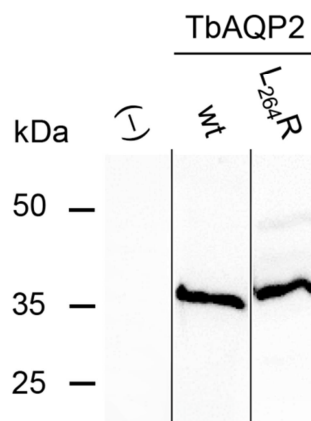
Damit konnte auch bei dieser Mutante die Affinität von Pentamidin um ein 39faches reduziert werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem für TbAQP2-D<sub>265</sub>A ermittelten Ergebnis.

#### 4.1.5 Untersuchungen der Punktmutation TbAQP2-L<sub>264</sub>R

Durch Aminosäureaustausch des Aspartat265 durch ein neutrales Alanin bzw. Asparagin war es möglich die Affinität von Pentamidin zu TbAQP2 drastisch zu senken (4.1.4).

Die Kombination aus einem Leucin264 anstelle des hochkonservierten Arginins im ar/R-Selektivitätsfilter und dem Aspartat265 in Nachbarschaft ist einzigartig im Porenlayout von TbAQP2 (1.2.1). In konventionellen Aquaporinen und Aquaglyceroporinen wie TbAQP3 steht das positive Arginin des ar/R-Selektivitätsfilters in direkter Nachbarschaft zu einem negativen Aspartat. Das ermöglicht eine intramolekulare Salzbrücke und könnte verhindern, dass die Carboxylfunktion des Aspartates mit der Amidinfunktion des Pentamidins in Wechselwirkung tritt und somit der Grund sein, warum TbAQP3 nicht pentamidinsensitiv ist. Diese These sollte durch einen Aminosäureaustausch überprüft werden, der in TbAQP2 zu einer Nachahmung der Situation führen sollte, wie sie in konventionellen Aquaglyceroporinen vorzufinden ist.

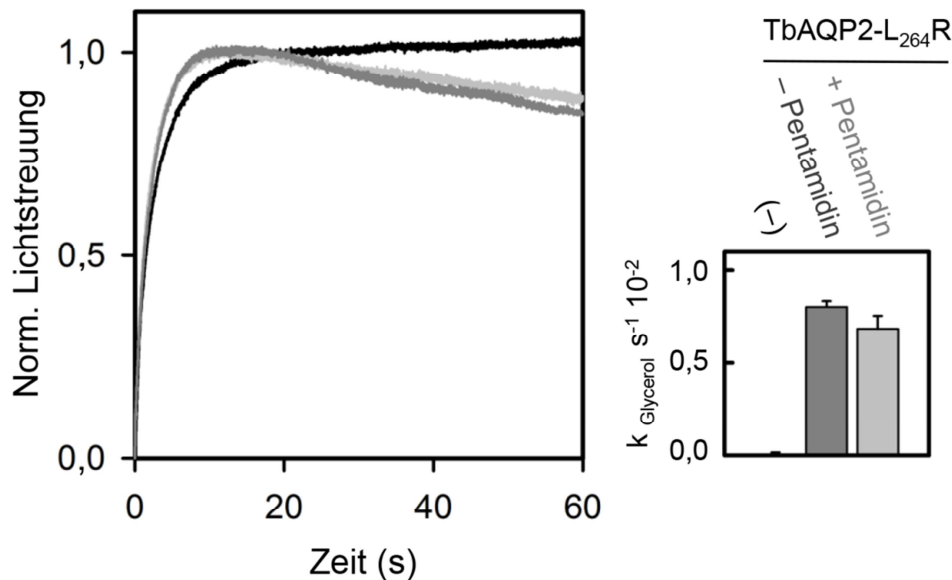
Durch eine Mutagenese-PCR wurde die Basensequenz von TbAQP2 dahingehend verändert, dass sie anstelle des neutralen Leucin264 für das familientypische Arginin codierte. *S. cerevisiae* BY4742Δfps1 Hefezellen wurden mit TbAQP2-L<sub>264</sub>R transformiert. Die erfolgreiche Herstellung des Proteins wurde in einem Western Blot nachgewiesen (3.2.5). Der Western Blot zeigte Banden bei 36 kDa was ungefähr der rechnerischen Größe von 34 kDa von TbAQP2 mit Hämagglutinin-Epitoptag entspricht. (Abb. 4.20).



**Abb. 4.20:** Western Blot der Wildtyp-TbAQP2 und TbAQP2-L<sub>264</sub>R aus der Membranfraktion von *S. cerevisiae* BY4742Δfps1. Pro Spur wurden 100 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Banden entspringen demselben Western Blot.

### Einfluss von Pentamidin auf die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2-L<sub>264</sub>R

Die Substitution eines kleinen neutralen Leucins gegen ein deutlich größeres positives Alanin kann einen Einfluss auf die Proteinarchitektur in der Filterregion und die Leitfähigkeit nehmen. Unter hyperosmotischen Testbedingungen konnte die Funktionalität der Mutante nachgewiesen werden. Nach einem initialen Wasserausstrom, kam es in Protoplasten von TbAQP2-L<sub>264</sub>R bildenden Hefezellen zu einem deutlichen Einstrom von Glycerol (Abb. 4.21, dunkelgraue Kurve, linkss). Im Vergleich zum Wildtyp-TbAQP2 wurden 30 % der Funktion erreicht. Eine Inkubation mit 50  $\mu$ M Pentamidin zeigte keine Minderung der Glycerolleitfähigkeit von Protoplasten TbAQP2-L<sub>264</sub>R bildender Hefezellen im Vergleich zu unbehandelten Hefeprotoplasten (Abb. 4.21, hellgraue Kurve, links). Die Ratenkonstanten unterschieden sich im t-Test innerhalb eines 95%igen Konfidenzintervalls nicht signifikant voneinander.



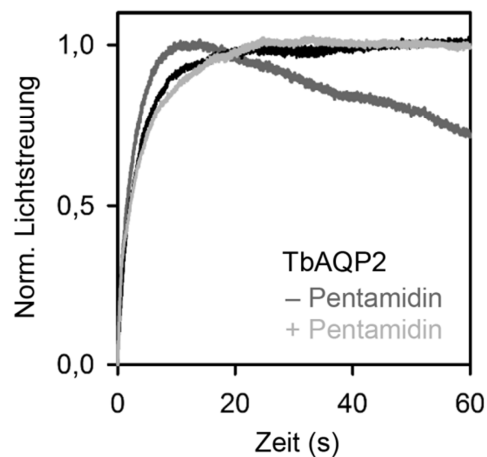
**Abb. 4.21:** Einfluss von 50  $\mu$ M Pentamidin auf die Glycerolleitfähigkeit von Protoplasten TbAQP2-L<sub>264</sub>R bildender Hefezellen. Dargestellt sind Mittelwertkurven von je 6-9 Einzelmessungen aus 3 unabhängigen Experimenten (linkss). Das Balkendiagramm zeigt die Ratenkonstanten des Glyceroleinstroms. Die Fehlerbalken indizieren den S.E.M.

Somit führte die partielle Imitation des Filterlayouts konventioneller Aquaglyceroporine, durch Substitution des ungewöhnlichen Leucin264 gegen ein übliches Arginin, in hefebasierten Funktionsmessungen zu einer Resistenz von TbAQP2 gegenüber Pentamidin.

### Einfluss von Pentamidin auf die Wasserleitfähigkeit von TbAQP2

Für das bifunktionale PfAQP1 ist eine Hemmwirkung von Sorbitol auf dessen Wasserleitfähigkeit bekannt, allerdings beim Einsatz im dreistelligen millimolarem Bereich. Die Glycerolleitfähigkeit hingegen wird in deutlich geringerem Maße beeinträchtigt (98). Die Autoren gehen von einer Interaktion an der Oberfläche der äußeren Porenregion aus und nicht von einer Blockade des Kanals (98).

Im Rahmen von Vorversuchen an der Stopped-Flow Apparatur wurde gezeigt, dass die Inkubation von Protoplasten TbAQP2 bildender Hefezellen mit 50  $\mu\text{M}$  Pentamidin nicht nur zu einer vollständigen Hemmung des Glyceroleinstroms, sondern auch zur Hemmung des Wasserausstroms in der initialen Phase führt (Abb. 4.22, hellgraue Kurve). Es wurde mit einem hyperosmotischen Puffer bei pH 7,2 und einem Glycerolgradienten von 300 mM gearbeitet. Durch Ablesen des zum Ordinatenwert von 0,632 ( $1-1/e$ ) der normierten Schrumpfungskurve gehörigen Abzissenwertes wurden näherungsweise die  $\tau$ -Werte bestimmt. Der Wasserausstrom durch Protoplasten TbAQP2 bildender Hefezellen unterschied sich mit  $\tau = 2,42$  s (Abb. 4.22, dunkelgraue Kurve) deutlich von Protoplasten, die kein Aquaglyceroporin bildeten mit  $\tau = 3,31$  s (schwarze Kurve). Nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Pentamidin zu Protoplasten TbAQP2 bildender Hefezellen, deckte sich der Wasserausstrom ( $\tau = 3,60$  s) mit der Negativkontrolle.

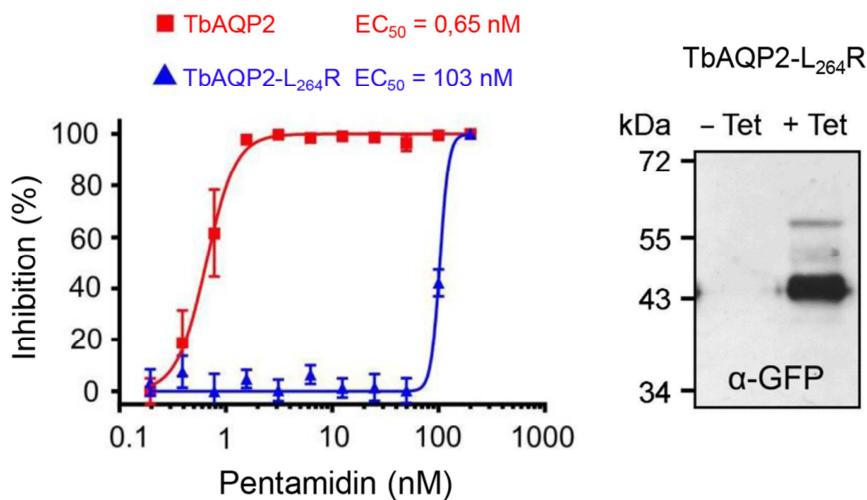


**Abb. 4.22:** Glycerolleitfähigkeiten von TbAQP2 (dunkelgrau), mit 50  $\mu\text{M}$  Pentamidin inkubierten TbAQP2 (hellgrau) im Vergleich zu kein Aquaglyceroporin-bildenden Hefeprotoplasten (schwarz). Dargestellt Mittelwertkurven aus 6-9 Einzelmessungen.

Es ist zu betonen, dass die Wasserleitfähigkeit im Rahmen dieser Arbeit nicht isoliert evaluiert und dieses Experiment als Vorversuch nur einmal durchgeführt wurde. Es veranschaulicht aber sehr eindrucksvoll, wie Pentamidin die Pore von TbAQP2 blockiert und, im Gegensatz zum Sorbitol beim PfAQP, nur in geringen Mengen benötigt wird, um seine Hemmwirkung zu entfalten.

### Einfluss von TbAQP2-L<sub>264</sub>R auf die Pentamidinsensitivität von Trypanosomen

In einer Kooperation testete die Arbeitsgruppe von Prof. D. Horn der University of Dundee den Einfluss des Aminosäureaustausches in TbAQP2-L<sub>264</sub>R auf die Anfälligkeit von Trypanosomen gegenüber dem Pentamidin. In einem Western Blot konnte die Gruppe die erfolgreiche, mit Tetracyclin induzierbare Bildung von TbAQP2-L<sub>264</sub>R in Trypanosomen detektieren (Abb. 4.23, rechts). Die Dosis-Wirkungskurve von TbAQP2-L<sub>264</sub>R bildenden Trypanosomen zeigte eine starke Verschiebung zu höheren Pentamidinkonzentrationen im Vergleich zu Trypanosomen, die Wildtyp-TbAQP2 bildeten. Insgesamt kam es zu einer 160fachen Erhöhung des EC<sub>50</sub>-Wertes (Abb. 4.23, links). Somit konnte die durch den Aminosäureaustausch des Leucins<sub>264</sub> gegen ein Arginin in Funktionsmessungen mit Hefezellen beobachtete Pentamidinresistenz auch in Trypanosomen bestätigt werden.



**Abb. 4.23:** Die Western Blot Analyse zeigt die mit Tetracyclin (Tet) induzierbare Bildung von GFP-TbAQP2-L<sub>264</sub>R in Trypanosomen (rechts). Die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt den Einfluss von Pentamidin auf eine GFP-TbAQP2 (rot) oder GFP-TbAQP2-L<sub>264</sub>R (blau) exprimierende aqp2-null-Zelllinie von Trypanosomen. Die resultierenden EC<sub>50</sub>-Werte sind angegeben. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von unabhängigen Klonen aus 3 Assays (links).

Die unmittelbare Folge eines Aspartats auf das Arginin des ar/R-Selektivitätsfilters in der Aminosäuresequenz ist ein Leitmotiv von Aquaglyceroporinen (100). Die Ergebnisse zeigen, dass eine interne Salzbrücke zwischen dem Arginin des Selektivitätsfilters und dem benachbarten Aspartat ein entscheidender Faktor ist, warum ein konventionelles Aquaglyceroporin wie TbAQP3 der hemmenden Wirkung von Pentamidin nicht zugänglich ist, während im TbAQP2 die Carboxylgruppe des Aspartat<sub>265</sub> für ein Interaktion mit Pentamidin zur Verfügung steht.



## 4.2 Untersuchungen zum humanen AQP9

Zu den in diesem Abschnitt gezeigten Daten hat Deike Rönfeld im Rahmen ihrer Masterarbeit (2014) wichtige Vorarbeiten geleistet. Die für die gezeigten Messungen verwendeten AQP9-Mutanten wurden von ihr generiert.

### 4.2.1 Leitfähigkeitsmessungen von Monocarbonsäuren/Monocarboxylaten

Monocarboxylate sind die Anionen schwacher organischer Säuren. Das Dissoziationsgleichgewicht der in diesem Abschnitt untersuchten Substrate Milchsäure ( $pK_s = 3,9$ ),  $\beta$ -Hydroxybuttersäure ( $pK_s = 4,4$ ) und Essigsäure ( $pK_s = 4,7$ ) variiert im physiologischen Bereich stark mit dem vorherrschenden pH-Wert (1,3). Eine exakte Kontrolle des Puffer-pH, als auch gleiche Temperaturbedingungen bei Einstellung dessen und bei der Messung sind unabdinglich.

#### Milchsäure/Laktat

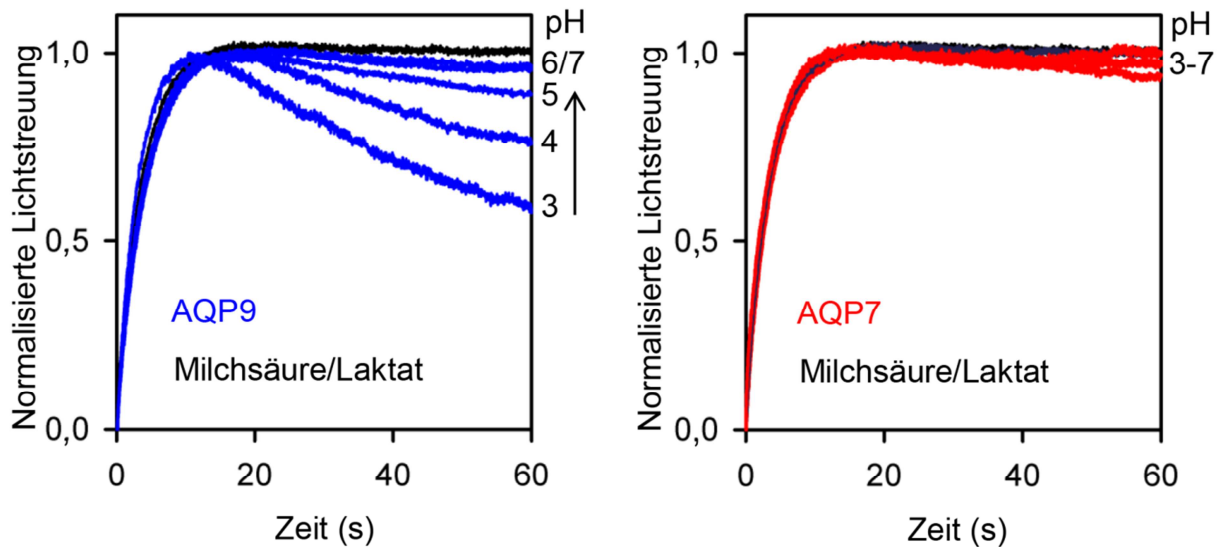
In einer ersten Messung wurde das pH-Profil der Milchsäure/Laktat-Leitfähigkeit von dem humanen Aquaglyceroporin AQP9 (82) bestimmt. Als Vergleich wurde das murine Aquaglyceroporin AQP7 herangezogen, für welches bisher keine Leitfähigkeit für Monocarbonsäuren/Monocarboxylate beschrieben wurde (77). Im Folgenden wird aus Gründen der Übersichtlichkeit von AQP9 und AQP7 gesprochen ohne die Herkunftsspezies gesondert aufzuführen.

Für die Leitfähigkeitsmessungen wurde der Hefestamm *S. cerevisiae* W3031A $\Delta$ jen1 $\Delta$ ady2 verwendet, der eine Deletion endogener Laktattransporter aufweist (101). Als Shuttle für die codierende DNA des in den nächsten Abschnitten aufgeführten AQP9, sowie Mutanten, und des AQP7 in die Hefezelle wurde der *high-copy vector* pDRTXa verwendet (102). Die Hefezellen wurden transformiert (3.1.13), osmosensitive Protoplasten präpariert (3.3.3) und diese mit einem hyperosmotischen Milchsäure/Laktat-haltigen Puffer in der Stopped-Flow Apparatur gemischt. Es herrschte ein einwärtsgerichteter 50 mM Solutgradient. Mit den Messungen wurde ein Spektrum von pH 3-7 abgedeckt. Diese Bedingungen galten für alle in den nächsten Abschnitten aufgeführten Messungen. Resultierende Änderungen des Protoplastenvolumens wurden als Änderungen des Streulichtsignals detektiert.

Die erhaltenen Kurven zeigen einen charakteristischen biphasischen Verlauf. In einer initialen Phase kam es zu einem Wasserausstrom und einer damit einhergehenden Erhöhung des

## Ergebnisse

Streulichtsignals. Darauf folgte bei Funktionalität für den entsprechenden Solute ein Einstrom aufgrund des chemischen Gradienten, welcher als abfallendes Streulichtsignal detektiert wurde.



**Abb. 4.24:** pH-Abhängige Milchsäure/Laktat-Leitfähigkeit von AQP9 (blau) und AQP7 (rot). Der Verlauf von Zellen, die kein Protein bilden ist schwarz dargestellt. Gezeigt sind Mittelwertkurven aus 6-9 Einzelmessungen aus 3 unabhängigen Experimenten.

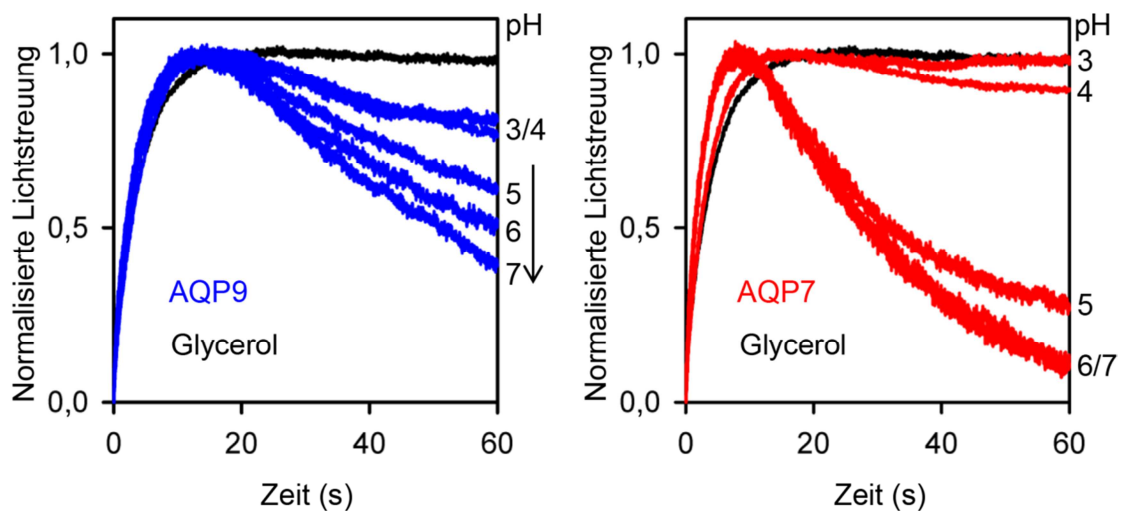
Die Leitfähigkeit von Protoplasten von AQP9-bildenden Hefezellen für Milchsäure/Laktat erhöhte sich stetig mit sinkendem pH (**Abb. 4.24**, blaue Kurven, links). Im Gegensatz dazu wurde für Protoplasten von AQP7-bildenden Hefezellen über das gesamte Spektrum von pH 3-7 kaum eine Leitfähigkeit gefunden (**Abb. 4.24**, rote Kurven, rechts).

## Glycerol

Änderungen des Puffer-pH-Wertes beeinflussen nicht nur das Dissoziationsgleichgewicht von Milchsäure/Laktat im Speziellen und Monocarbonsäure/Monocarboxylat im Allgemeinen, sondern können auch einen Einfluss auf die Integrität von Proteinen haben (103).

Um einen möglichen pH-Einfluss einschätzen zu können, wurden analoge Messung mit Glycerol durchgeführt. Mit einem  $pK_s$ -Wert von 14,2 liegt Glycerol in wässriger Lösung unabhängig vom pH immer ungeladen vor und ist somit ein guter Parameter, um die Funktionalität der Proteine unabhängig vom Solut zu untersuchen. Die molaren Massen von Glycerol mit  $92 \text{ g mol}^{-1}$  und Milchsäure mit  $90 \text{ g mol}^{-1}$  unterscheiden sich kaum und auch die van der Waals Volumina liegen mit  $88,0 \text{ \AA}^3$  und  $81,6 \text{ \AA}^3$  in der gleichen Größenordnung (**Tab. 5.1**).

AQP9 war über das gesamte pH-Spektrum funktionell, wies aber eine stetige Abnahme der Leitfähigkeit zu saureren pH-Werten hin auf (**Abb. 4.25**, blaue Kurven, links). Damit zeigte sich eine zum Milchsäure/Laktat-Profil gegenläufige Auffächerung der Kurven. Bei pH 3 wurden 65 % der bei pH 7 gemessenen Leitfähigkeit erreicht. AQP7 zeigte eine hohe Leitfähigkeit für Glycerol in einem Bereich von pH 5-7. Unterhalb kam es zum Funktionsverlust (**Abb. 4.25**, rote Kurven, rechts).

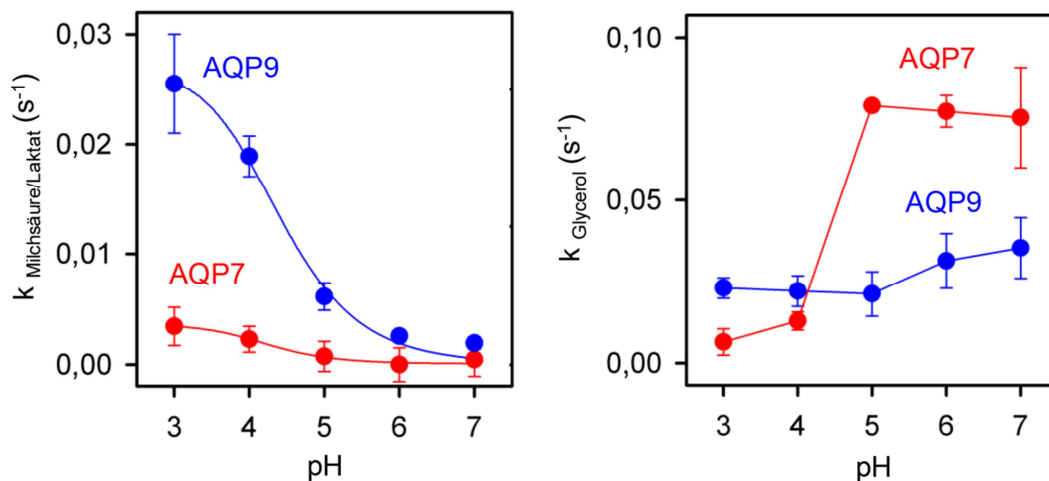


**Abb. 4.25:** pH-abhängige Glycerol-Leitfähigkeit von AQP9 (blau) und AQP7 (rot). Der Verlauf von Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin bilden, ist schwarz dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwertkurven aus 6-9 Einzelmessungen aus 3 unabhängigen Experimenten.

### Vergleich der Leitfähigkeiten von AQP9 und AQP7 für Milchsäure/Laktat und Glycerol

Um die Leitfähigkeiten von AQP9 und AQP7 für Milchsäure/Laktat bzw. Glycerol genauer beurteilen zu können, wurden die Ratenkonstanten des Soluteinstroms gegen den pH-Wert aufgetragen.

Für AQP9 ergab sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf mit einem Maximum bei pH 3. Das heißt im sauren Milieu, wo der Anteil an Milchsäure im Versuchssetting maximal ist, zeigte sich die höchste Leitfähigkeit mit einer Ratenkonstante von  $k = 0,026 \text{ s}^{-1} \pm 0,004 \text{ s}^{-1}$ , welche der Ratenkonstante für die Glycerolleitfähigkeit bei pH 3 mit  $k = 0,023 \text{ s}^{-1} \pm 0,003 \text{ s}^{-1}$  entspricht (**Abb. 4.26**, blaue Kurve). Das pH-Profil weist auf eine Passage der neutralen Milchsäure hin, deren Anteil von 0,9 bei pH 3 deutlich den der Anionen überwiegt. Im Falle einer Passage des Anions hätte ein spiegelbildliches pH-Profil mit einem Maximum bei pH 7 resultieren müssen, wo das Dissoziationsgleichgewicht fast vollständig auf der Seite des Laktats liegt.

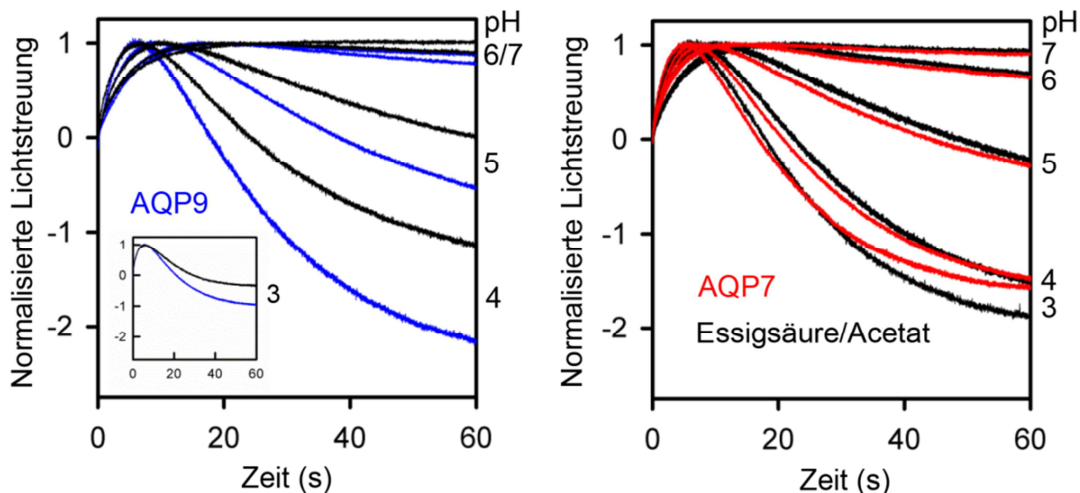


**Abb. 4.26:** pH-Abhängigkeit der Ratenkonstanten des Milchsäure/Laktat-Einstromes (links) und des Glyceroleinstromes (rechts) für AQP9-bildende (blau) und AQP7-bildende (rot) Hefezellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ratenkonstanten aus drei unabhängigen Experimenten mit je 6-9 Kurven. Der Hintergrund wurde subtrahiert. Die Fehlerbalken markieren den S.E.M.

Für AQP7 ergab sich ein nur sehr flach verlaufendes pH-Profil. Es deutete sich ein leichter Anstieg der Milchsäureleitfähigkeit zum Säuren hin an (**Abb. 4.26**, links, rote Kurve). Allerdings zeigte sich im pH-abhängigen Verlauf der Glycerolleitfähigkeit Funktionsverlust unterhalb von pH 5, weshalb für AQP7 nur eine Betrachtung im Bereich von pH 5-7 sinnvoll ist. (**Abb. 4.26**, rechts, rote Kurve). In diesem Bereich ergab sich eine 2-4-mal höhere Glycerolleitfähigkeit als für AQP9. Es wurden für AQP7 hingegen nur ein Achtel der Milchsäureleitfähigkeit von AQP9 erreicht wurde.

### Essigsäure/Acetat

Für den Einstrom von Essigsäure/Acetat zeigte sich ein ungewöhnlicher Kurvenverlauf. Nach einer initialen Phase des Wasserausstroms mit einem Schrumpfen der Protoplasten und einem Anstieg des Streulichtsignals kam es zu einem schnellen Einstrom von Essigsäure/Acetat sowohl für Protoplasten AQP9 und AQP7 produzierender Hefezellen als auch für Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin enthielten. Besonders deutlich wird dies im Bereich  $< \text{pH } 6$ . Im zweiten Kurvenabschnitt fiel das Streulichtsignal sogar unter den Nullpunkt ab (**Abb. 4.27**).

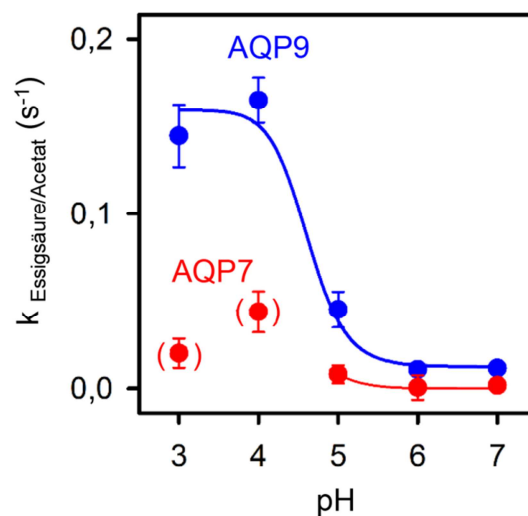


**Abb. 4.27:** pH-abhängige Essigsäure/Acetat-Leitfähigkeit von AQP9 (blau) und AQP7 (rot). Der Verlauf von Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin bilden ist schwarz dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwertkurven aus 6-9 Einzelmessungen aus 3 unabhängigen Experimenten.

Essigsäure ist mit einer molaren Masse von  $60,1 \text{ g mol}^{-1}$  deutlich kleiner als Milchsäure und Glycerol und liegt mit einem  $\text{pK}_s$  von 4,7 im Messbereich  $< \text{pH } 5$  größtenteils protoniert und damit ungeladen vor. Wie der Kurvenverlauf von Protoplasten, die kein Aquaglyceroporin enthalten, zeigt, diffundiert Essigsäure passiv durch die Biomembrane der Hefezellen hindurch (**Abb. 4.27**, schwarze Kurven). Dieses Phänomen ist auch in der Literatur beschrieben (104). Eine Überlagerung des initialen Wasserausstroms durch schnell diffundierende Essigsäure, die einen Wiedereinstrom von Wasser nach sich zieht, ist denkbar. Die Zellen können nicht auf ihr Minimum schrumpfen, bevor der Schwellvorgang einsetzt und im zweiten Abschnitt zu einem Kurvenverlauf führt, der die Nulllinie schneidet. Für AQP9 ergibt sich ein im Vergleich zu Zellen, die kein Aquaglyceroporin bilden, stärkerer Einstrom von Essigsäure/Acetat (**Abb. 4.27**, blaue Kurven). Der Verlauf für pH 3 ist aus Gründen der Übersichtlichkeit separat dargestellt (Insert, links). Die Leitfähigkeit von Protoplasten AQP7 bildender Hefezellen unterscheidet sich hingegen kaum von solchen, die kein Aquaglyceroporin bilden (**Abb. 4.27**, rote Kurven, rechts).

## Ergebnisse

Das pH-Profil zeigte einen sigmoidalen Kurvenverlauf mit einer Zunahme der Leitfähigkeit für AQP9 im sauren pH-Milieu, mit einem Plateau bei pH 3 und pH 4 (**Abb. 4.28**, blaue Kurve). Das heißt, die Leitfähigkeit in dem Bereich am höchsten, wo die ungeladene Essigsäure die vorherrschende Spezies ist. Diese Beobachtung deckt sich mit dem für Milchsäure gemessenen pH-Profil und unterstützt die These, dass die ungeladene Monocarbonsäure geleitet wird. Das Profil von AQP7 verläuft wieder deutlich flacher (**Abb. 4.28**, rote Kurve). Die Werte für pH 3 und pH 4 wurden wegen des Funktionsverlustes von AQP7 in diesem Bereich nicht berücksichtigt. Im auswertbaren Intervall von pH 5-7 leitet AQP9 Essigsäure mindestens um ein 5faches schneller als AQP7.



**Abb. 4.28:** pH-Abhängigkeit der Ratenkonstanten des Essigsäure/Acetat-Einstromes (links) und des Glyceroleinstromes (rechts) für AQP9-bildende (blau) und AQP7-bildende (rot) Hefezellen. Dargestellt sind Mittelwerte der Ratenkonstanten aus drei unabhängigen Experimenten. Die Ratenkonstanten von Hefezellen, die kein Aqauglyceroporin enthalten, wurden subtrahiert. Die Fehlerbalken markieren den S.E.M.

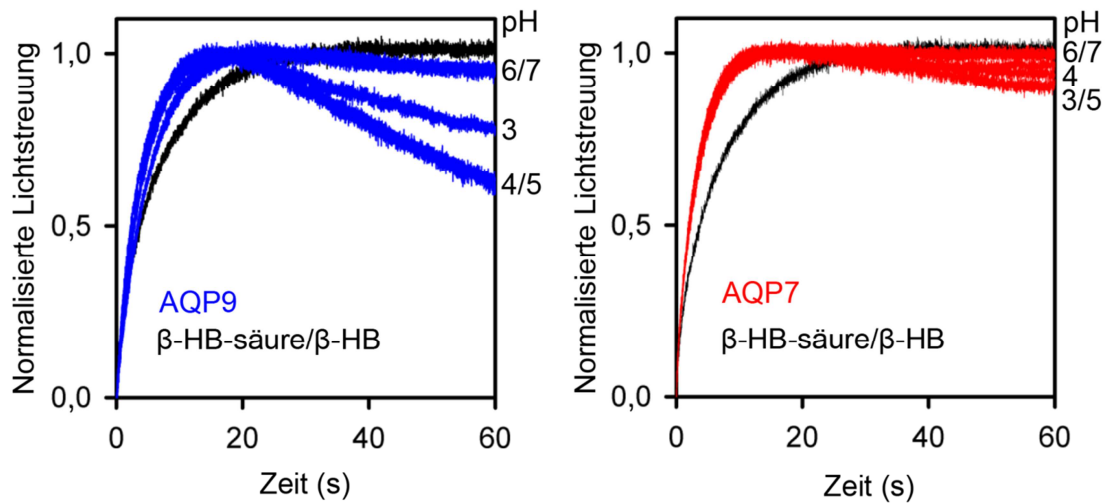
### **β-Hydroxybuttersäure/β-Hydroxybutyrat**

Für die Messung der β-Hydroxybuttersäure /β-Hydroxybutyrat Leitfähigkeit von AQP9 wurde das Racemat eingesetzt, während bei den Messungen der Milchsäure/Laktat-Leitfähigkeit mit dem physiologisch vorliegenden L-Isomer gearbeitet wurde. Es ist nicht auszuschließen, dass eine Messung der physiologisch relevanten β-D-Hydroxybuttersäure in Anbetracht einer bedingten Stereoselektivität von AQPs (1.1.2) möglicherweise zu einer höheren Leitfähigkeit geführt hätte.

Für AQP9 zeigte sich zunächst eine Zunahme der Leitfähigkeit mit sinkenden pH-Werten, wie bereits für Milchsäure/Laktat und Essigsäure/Acetat gezeigt. Allerdings wird im Unterschied der maximale Einstrom bei pH 4 und pH 5 erreicht und fällt bei pH 3 wieder ab (**Abb. 4.29**, blaue

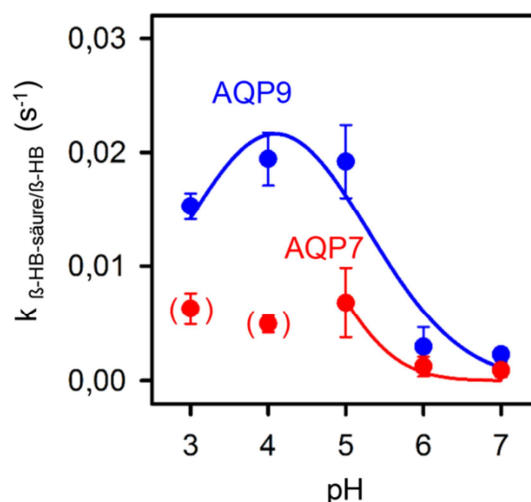
## Ergebnisse

Kurven, links). Für AQP7 ergibt sich kaum eine Leitfähigkeit im kompletten pH Intervall (**Abb. 4.29**, rote Kurven, rechts)



**Abb. 4.29:** pH-abhängige  $\beta$ -Hydroxybuttersäure/ $\beta$ -Hydroxybutyrat-Leitfähigkeit von AQP9 (blau) und AQP7 (rot). Der Verlauf von Hefezellen, die kein Protein bilden, ist schwarz dargestellt. Mittelwertkurven aus 6-9 Einzelmessungen aus 3 unabhängigen Experimenten.

Eine Auftragung der Ratenkonstanten des  $\beta$ -Hydroxybuttersäure/ $\beta$ -Hydroxybutyrat-Einstromes gegen den pH-Wert ergab für AQP9 eher einen glockenförmigen Verlauf (**Abb. 4.30**, blaue Kurve). Für AQP7 ergab sich wieder ein deutlich flacherer Verlauf (**Abb. 4.30**, rote Kurven). Die Werte bei pH 3 und pH 4 wurden aufgrund des Funktionsverlustes von AQP7 nicht berücksichtigt. In einem Bereich von pH 5-7 leitete AQP9 um ein 2-3faches besser  $\beta$ -Hydroxybuttersäure/ $\beta$ -Hydroxybutyrat als AQP7.

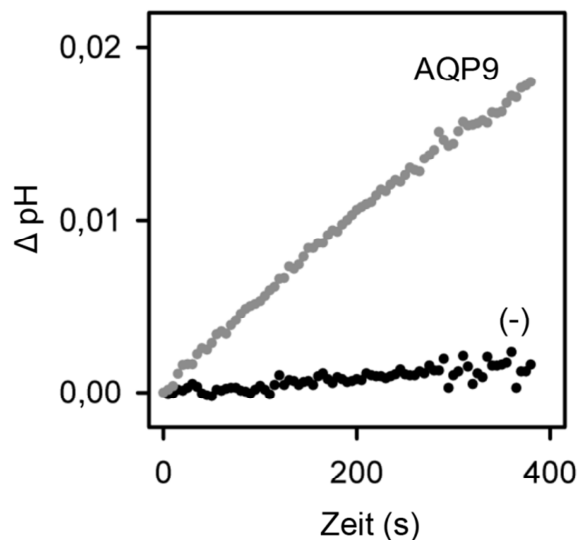


**Abb. 4.30:** pH-Abhängigkeit der Ratenkonstanten des  $\beta$ -Hydroxybuttersäure/ $\beta$ -Hydroxybutyrat-Einstromes für AQP9-bildende (blau) und AQP7-bildende (rot) Hefezellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ratenkonstanten aus drei unabhängigen Experimenten mit je 6-9 Kurven. Der Hintergrund wurde subtrahiert. Die Fehlerbalken markieren den S.E.M.

### Aufnahme der neutralen Säure

Die steigende Leitfähigkeit von AQP9 für Essigsäure, Milchsäure und  $\beta$ -Hydroxybuttersäure mit sinkendem pH-Wert gab einen starken Hinweis auf die Passage der neutralen Säure. Um dieses Szenario abzuklären, wurde zusätzlich die pH-Wert-Änderung des Mediums durch AQP9 bildende Hefezellen im Vergleich zu Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin herstellen, nach Zugabe von 20 mM Milchsäure/Laktat bei pH 5 untersucht (3.3.2).

Um kleine pH-Änderungen detektieren zu können, war das Medium schwach mit 4 mM Zitronensäure gepuffert. Der gewählte pH 5 ist ein Kompromiss zwischen einer möglichst großen Differenz zum  $pK_s$ -Wert der Milchsäure, um eine Pufferung durch diese zu vermeiden, und einer maximalen Leitfähigkeit von AQP9.



**Abb. 4.31:** pH-Wert-Änderung des Mediums durch AQP9 bildende Hefezellen (graue Kurve) und Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin bilden (schwarze Kurve), nach Zugabe von 20 mM Milchsäure/Laktat.

Für Zellen, die AQP9 produzieren, kam es im Vergleich zu Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin bilden (**Abb. 4.31**, schwarze Kurve), zu einer stetigen Alkalisierung des Mediums (**Abb. 4.31**, graue Kurve). Dies sprach für einen Durchtritt der protonierten Säure. Wäre es zu einer Passage des Anions gekommen, hätten die zurückbleibenden Protonen für eine Azidifizierung des Milieus gesorgt (105). In den folgenden Kapiteln wird aus Gründen der Übersichtlichkeit ab jetzt nur noch von der Monocarbonsäure als geleiteter Spezies gesprochen.

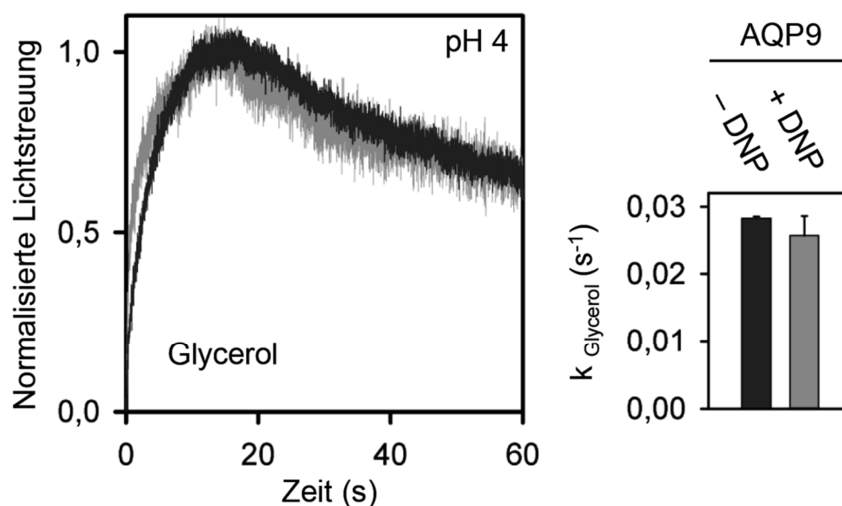


#### 4.2.2 Einfluss von Protonophoren auf die Milchsäureleitfähigkeit von AQP9

Für die Passage der jeweiligen Monocarbonsäure durch AQP9 sind theoretisch zwei Szenarien denkbar. Entweder wandert die Säure in ihrer protonierten, ungeladenen Form oder es kommt zu einer Leitung von Anion und Proton nebeneinander im Sinne eines Co-Transports. Im Folgenden sollte die Frage geklärt werden, ob AQP9 Eigenschaften eines Sekundärtransporters erworben hat, dessen Aktivität über den Protonengradienten gesteuert wird (106). Zu diesem Zwecke wurde das 2,4-Dinitrophenol (DNP) eingesetzt. DNP fungiert als Protonophor, eine Substanz, die den Protonengradienten zerstört.

#### Einfluss von DNP auf die Integrität von Hefeprotoplasten

In einem ersten Versuch wurde der Einfluss von DNP auf die Integrität der Hefeprotoplasten getestet. Unter hyperosmotischen Testbedingungen bei pH 4 wurde dazu in der Stopped-Flow Apparatur die Leitfähigkeit von Protoplasten AQP9 bildender Hefezellen für Glycerol vor und nach Behandlung mit DNP gemessen. Glycerol ist ein neutrales Molekül, welches mit geringem Energieaufwand von  $\sim 5 \text{ kcal mol}^{-1}$  durch die Kanalpore von AQP9 diffundiert und ein guter Parameter für eine Evaluierung des vom Protonengradienten losgelösten DNP-Effekts auf die Proteinfunktion ist. Der Glyceroleinstrom von unbehandelten Protoplasten AQP9-bildender Hefezellen (**Abb. 4.32**, schwarze Kurve) mit einer Ratenkonstante von  $k = 0,0283 \text{ s}^{-1} \pm 0,0003 \text{ s}^{-1}$  unterschied sich im t-Test in einem 95%igen Konfidenzintervall nicht signifikant von der mit DNP behandelten Protoplasten mit  $k = 0,0258 \text{ s}^{-1} \pm 0,0029 \text{ s}^{-1}$  (**Abb. 4.32**, schwarze Kurve).

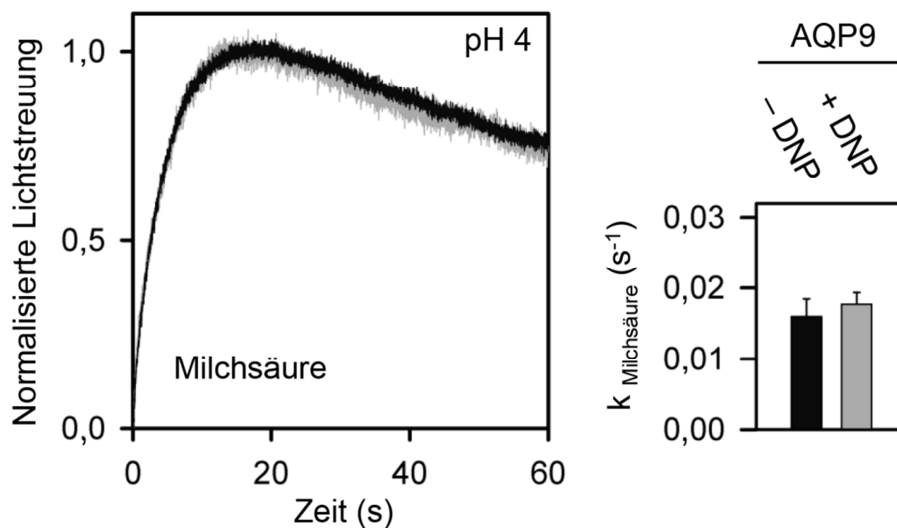


**Abb. 4.32:** Einfluss von 1 mM 2,4-Dinitrophenol (DNP) auf die Glycerolleitfähigkeit von AQP9. Dargestellt sind Mittelwertkurven aus je 6-9 Aufzeichnungen aus 3 unabhängigen Experimenten (links). Die schwarze Kurve zeigt die Leitfähigkeit unbehandelter und die graue Kurve mit DNP behandelte Protoplasten. Im Balkendiagramm sind Ratenkonstanten des Glyceroleinstroms gezeigt. Die Fehlerbalken geben den S.E.M. an (rechts).

### Einfluss von DNP auf die Milchsäureleitfähigkeit von AQP9

Unter Annahme eines zytosolischen pH-Wertes von 7 herrschte bei den Messbedingungen von pH 4 ein 1.000:1 einwärts gerichteter Protonengradient. Würde AQP9 als ein sekundär aktiver Symporter für Laktat-Anion und Proton agieren, hätte die Zerstörung des Protonengradienten durch DNP einen erheblichen Einfluss auf dessen Milchsäureleitfähigkeit.

Unter hyperosmotischen Testbedingungen bei pH 4 wurde dazu in der Stopped-Flow Apparatur die Leitfähigkeit von Protoplasten AQP9-bildender Hefezellen für Milchsäure vor und nach Behandlung mit DNP gemessen. Protoplasten AQP9-bildender Hefezellen zeigten auch nach Behandlung mit DNP einen Einstrom von Milchsäure, der sich mit dem Einstrom von Milchsäure in unbehandelte Protoplasten deckte (Abb. 4.33, links). Die ermittelten Ratenkonstanten für den Milchsäureeinstrom zeigten im t-Test in einem 95%igen Konfidenzintervall keinen signifikanten Unterschied zwischen mit DNP unbehandelten ( $k = 0,0160 \text{ s}^{-1} \pm 0,0025 \text{ s}^{-1}$ ) und behandelten ( $k = 0,0177 \text{ s}^{-1} \pm 0,0016 \text{ s}^{-1}$ ) Protoplasten AQP9-bildender Hefezellen (Abb. 4.33, rechts, Balkendiagramm).



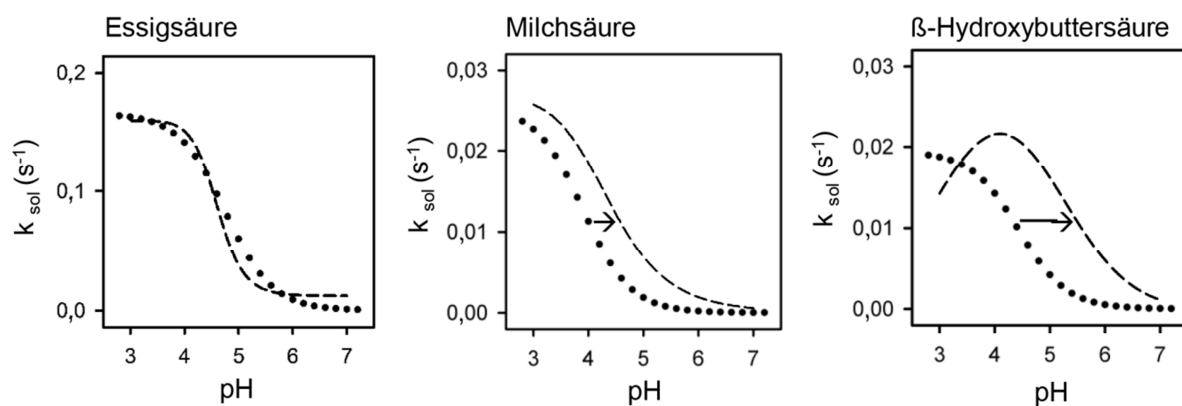
**Abb. 4.33:** Einfluss von 1 mM 2,4-Dinitrophenol (DNP) auf die Milchsäure/Laktat-Leitfähigkeit von AQP9 bei einem Gradienten von 50 mM und pH 4. Dargestellt sind die Mittelwertkurven aus je 6-9 Aufzeichnungen aus 3 unabhängigen Experimenten (rechts). Die schwarze Kurve zeigt die Leitfähigkeit unbehandelter und die graue Kurve mit DNP behandelter Protoplasten. Die im Balkendiagramm gezeigten Ratenkonstanten sind Mittelwerte aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken geben die S.E.M.s an (links).

Aus diesem Ergebnis ließ sich schlussfolgern, dass die Leitung der neutralen Milchsäure unabhängig vom Protonengradienten geschieht und gab einen starken Hinweis darauf, dass AQP9 im Sinne eines Kanalproteins fungiert und protonierte Milchsäure leitet.

### 4.2.3 Theoretische versus reale Monocarbonsäureleitfähigkeit von AQP9

AQP9 zeigte keine Eigenschaften eines sekundär-aktiven Symporters. Die protonierte Monocarbonsäure passiert die Kanalpore wahrscheinlich als ungeladener Solut. Ungewöhnlich erscheint in diesem Zusammenhang jedoch die deutlich schwächer ausgeprägte Leitfähigkeit von AQP7 für Monocarbonsäuren im Vergleich zu AQP9, während Glycerol hingegen mit 2-4facher Rate geleitet wird (4.2.1).

Im nächsten Schritt wurde in einer theoretischen Betrachtung geprüft, ob die experimentell ermittelten Ratenkonstanten sich mit dem durch das Dissoziationsgleichgewicht vorliegenden Anteil an Säure decken. Dazu wurde das Plateau des über Henderson-Hasselbalch berechneten Säureanteils auf den höchsten Wert des experimentell ermittelten pH-Profiles für die jeweiligen Substrate normiert und beide Kurven in einem Graphen zusammengebracht. Der Vergleich des über Henderson-Hasselbalch berechneten Anteils der jeweiligen Säure (**Abb. 4.34**, gepunktete Kurve) mit dem tatsächlich erhaltenen pH-Profil (gestrichelte Kurve), zeigte für alle untersuchten Solute, wie die Leitfähigkeit mit steigendem Anteil der protonierten Spezies korreliert. Während sich für Essigsäure die Leitfähigkeit mit der Fraktion vorliegender Säure deckte (**Abb. 4.34**, links), ergab sich für Milchsäure eine Verschiebung um 0,6 log Einheiten (Mitte) und für  $\beta$ -Hydroxybuttersäure sogar eine Verschiebung um 1 log Einheiten zu höheren pH-Werten (rechts). Anders ausgedrückt leitete AQP9 Milchsäure mit 4-mal und  $\beta$ -Hydroxybuttersäure mit 10-mal höherer Wahrscheinlichkeit die entsprechende Monocarbonsäure, als dem Anteil neutraler Säure bei gegebenem pH entspricht. Diese Beobachtung legte einen Mechanismus nahe, der AQP9 von AQP7 abhebt und eine Spezialisierung auf die Leitung von Monocarbonsäuren erlaubt.

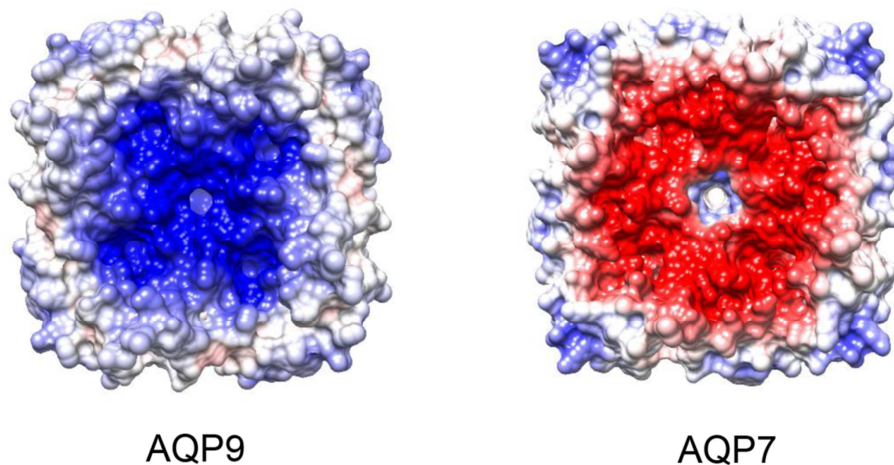


**Abb. 4.34:** Vergleich der theoretischen (gepunktet) mit den experimentell ermittelten (gestrichelt) Leitfähigkeiten für Essigsäure (links), Milchsäure (Mitte) und  $\beta$ -Hydroxybuttersäure (rechts)

#### 4.2.4 Berechnungen der Poisson-Boltzmann Elektrostatik

Die Elektrostatik von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen beeinflusst die Auswahl von Soluten. So führt die positive Barriere durch den ar/R-Selektivitätsfilter zu einem Ausschluss positiver Ladung (1.1.2). Die getesteten Monocarbonsäuren/Monocarboxylate liegen in einem physiologisch relevanten pH-Milieu  $> 5$  zum Großteil deprotoniert und damit als Anionen vor. Positive Ladung, die in der Lage ist Kationen von einer Passage auszuschließen, könnte im Gegenzug zu einer Anziehung von Anionen führen. Leitfähigkeitsunterschiede zwischen AQP9 und AQP7, sowie die ermittelte pH-Verschiebung, könnten auf eine unterschiedliche elektrostatische Architektur der zwei Proteine zurückzuführen sein.

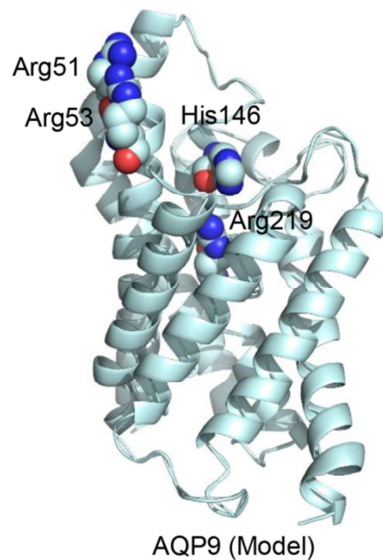
Um diese Hypothese prüfen, wurde die Poisson-Boltzmann Elektrostatik für Strukturmodelle der beiden Proteine berechnet (107, 92). Für AQP9 ergab sich auf extrazellulärer Seite eine stark positive Ladung der Oberfläche, während AQP7 eine negative Ladung aufwies (**Abb. 4.35**).



**Abb. 4.35:** Poisson-Boltzmann Elektrostatik von AQP9 (links) und AQP7 (rechts) in der Aufsicht auf das Tetramer. Bereiche positiver Ladung sind blau, solche mit negativer Ladung rot dargestellt. Die Modelle für die Berechnung wurden basierend auf der *E. coli* GlpF Kristallstruktur (PDB#1FX8) erstellt.

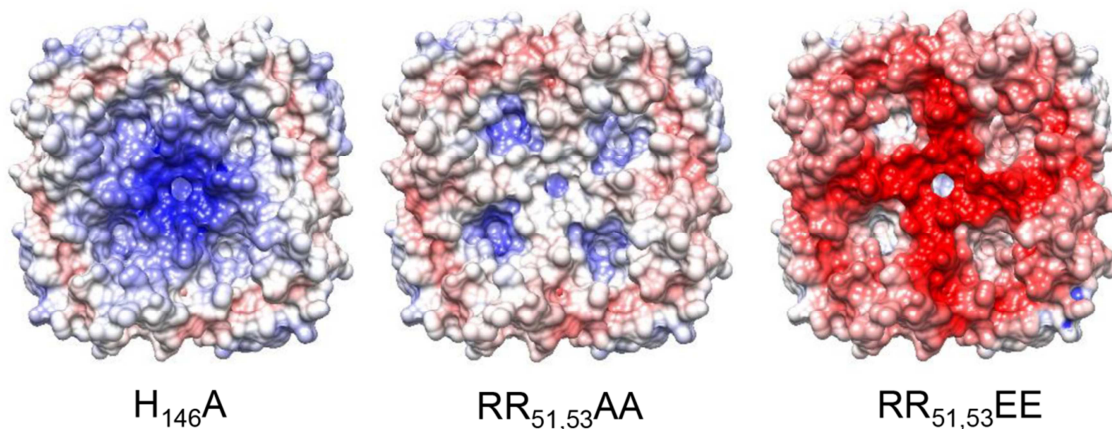
Um die für die entgegengesetzten elektrostatischen Oberflächenprofile relevanten Aminosäuren zu identifizieren, wurden Sequenzvergleiche durchgeführt. Gesucht wurden positiv geladene Aminosäuren an der Oberfläche und in der Porenregion, die in anderen Aquaglyceroporinen, für die keine Leitfähigkeit für Monocarbonsäuren beschrieben wurde, abwesend waren.

So wurden ein Histidin an Position 146 des AQP9 unmittelbar über dem Arginin219 des ar/R-Selektivitätsfilter und zwei Arginine an Position 51 und 53 an der Oberfläche der Poreneingangsregion ermittelt (**Abb. 4.36**).



**Abb. 4.36:** Seitenansicht des AQP9-Monomers. Die relevanten Aminosäuren sind in Sphären dargestellt. Das Modell wurde mit Swissmodel basierend auf den Koordinaten der *E. coli* GlpF Kristallstruktur (PDB#F1X8) erstellt und mit Pymol visualisiert.

Um einen Einfluss dieser Kandidaten auf die Elektrostatik zu evaluieren, wurde für die *in silico* Mutanten AQP9-H<sub>146</sub>A, AQP9-RR<sub>51,53</sub>AA und AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE ebenfalls die Poisson-Boltzmann Elektrostatik berechnet (**Abb. 4.37**). Für die Mutante AQP9-H<sub>146</sub>A kam es zu einer Verringerung, für AQP9-RR<sub>51,53</sub>AA zu einer Neutralisation und für AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE zu einer Umkehrung der positiven Ladung.

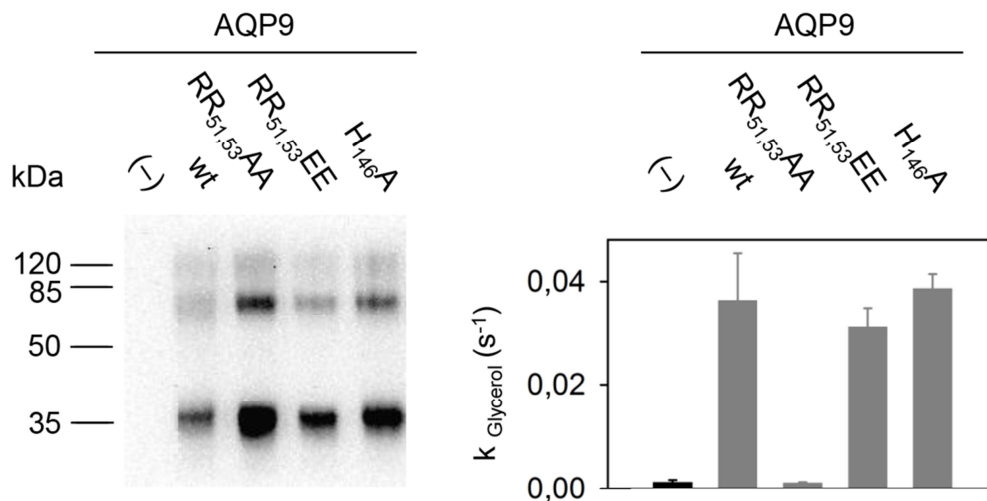


**Abb. 4.37:** Poisson-Boltzmann Elektrostatik ausgewählter Mutanten von AQP9 in der Aufsicht auf das Tetramer. Bereiche positiver Ladung sind blau, solche mit negativer Ladung rot dargestellt. Die Modelle für die Berechnung wurden basierend auf der *E. coli* GlpF Kristallstruktur (PDB#F1X8) erstellt.

#### 4.2.5 Funktionskontrolle verschiedener Aminosäureaustausche in AQP9

Die *in silico* generierten Mutanten AQP9-H<sub>146</sub>A, AQP9-RR<sub>51,53</sub>AA und AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE zeigten eine abweichende Poisson-Boltzmann Elektrostatik ihrer Oberfläche (4.2.4.)

Um den Einfluss ihrer Elektrostatik auf die Monocarbonsäure-Leitfähigkeit experimentell zu testen, wurden W3031AΔjen1Δady2 Hefezellen transformiert und die erfolgreiche Herstellung der mutierten Proteine mittels Western Blot geprüft. Die berechnete Größe von AQP9 mit N-terminalem HA-tag und C-terminalem His-tag lag bei 35 kDa. Bei den zusätzlichen Banden handelte es sich vermutlich um Dimere und Tetramere von Wildtyp-AQP9 und Mutanten (**Abb. 4.38**, links). Die Funktion der Proteine wurde in der Stopped-Flow Apparatur bei pH 7 unter hyperosmotischen Bedingungen getestet. AQP9-H<sub>146</sub>A und AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE zeigten gleiche Glycerolleitfähigkeiten wie Wildtyp-AQP9, während AQP9-RR<sub>51,53</sub>AA mit einem Funktionsverlust einherging und von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurde.



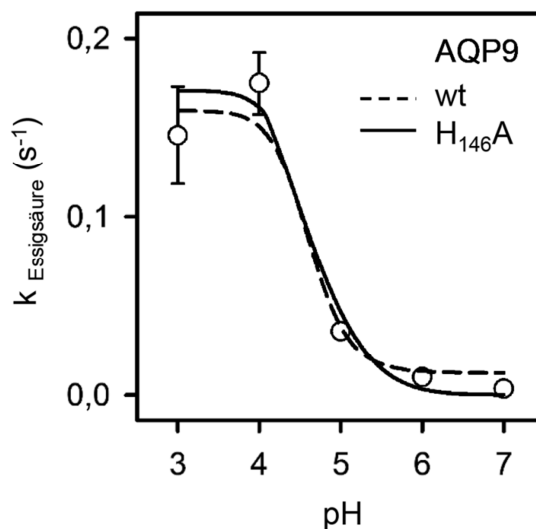
**Abb. 4.38:** Herstellung (links) und Funktionskontrolle (rechts) von Wildtyp-AQP9 und Mutanten. Es handelt sich um Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten aus je 6-9 Einzelmessungen. Die Fehlerbalken geben den S.E.M. an. Im Western Blot wurden pro Spur 75 µg Gesamtprotein aufgetragen.

#### 4.2.6 Leitfähigkeit von AQP9-H<sub>146</sub>A für Monocarbonsäuren

Das Histidin an Position 146 in AQP9 ist einzigartig im Sequenzvergleich mit anderen Aquaglyceroporinen, die keine Leitfähigkeit für Monocarbonsäuren aufweisen. Es befindet sich direkt über dem ar/R-Selektivitätsfilter und trägt als basische Aminosäure zu einer Positivierung des elektrostatischen Feldes bei. Im Computermodell ergab sich entsprechend für die Mutante AQP9-H<sub>146</sub>A eine Abschwächung der positiven Ladung (4.2.4). Eine Rolle des Histidin146 bei der Anziehung von Anionen ist daher denkbar. Im Folgenden wurde die Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Monocarbonsäureleitfähigkeit getestet.

#### Essigsäure

Zunächst wurde in der Stopped-Flow Apparatur die Leitfähigkeit von AQP9-H<sub>146</sub>A für Essigsäure unter hypertonen Bedingungen gemessen. Die aus den Stopped-Flow Kurven ermittelten Ratenkonstanten wurden gegen den pH-Wert aufgetragen. Es ergab sich für AQP9-H<sub>146</sub>A eine sigmoidale Kurve mit einem Plateau bei pH 3 und pH 4 (Abb. 4.39, durchgezogene Linie, offene Kreise), die nahezu deckungsgleich mit dem pH-Profil von Wildtyp-AQP9 verlief (gestrichelte Linie).

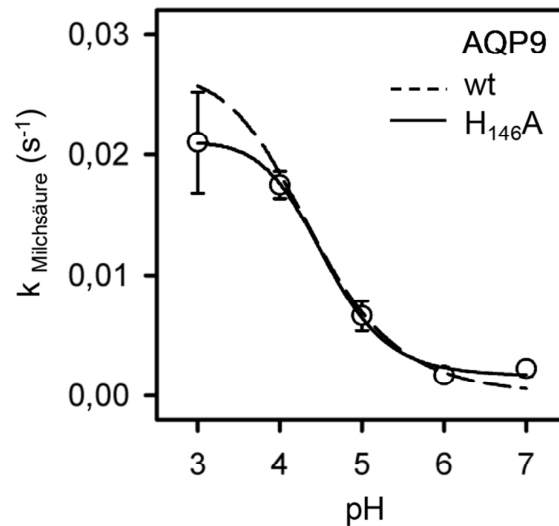


**Abb. 4.39:** pH-Abhängigkeit der Ratenkonstanten des Essigsäure -Einstromes für AQP9-H<sub>146</sub>A-bildende Hefezellen (durchgezogene Linie, offene Kreise) im Vergleich zum Wildtyp (gestrichelte Linie). Dargestellt sind die Mittelwerte der Ratenkonstanten aus drei unabhängigen Experimenten mit je 6-9 Kurven. Die Ratenkonstanten von Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin enthalten, wurden subtrahiert. Die Fehlerbalken markieren den S.E.M.

## Ergebnisse

### Milchsäure

Analog wurde auch die Leitfähigkeit von AQP9-H<sub>146</sub>A für Milchsäure gemessen. Es ergab sich auch für dieses Substrat eine sigmoidale Kurve mit einem Maximum im sauren Milieu bei pH 3 (Abb. 4.40, durchgezogene Linie, offene Kreise). Der Verlauf verhielt sich beinahe deckungsgleich mit dem von Wildtyp-AQP9 (gestrichelte Linie).



**Abb. 4.40:** pH-Abhängigkeit der Ratenkonstanten des Milchsäure -Einstromes für AQP9-H<sub>146</sub>A-bildende Hefezellen (durchgezogene Linie, offene Kreise) im Vergleich zum Wildtyp (gestrichelte Linie). Dargestellt sind die Mittelwerte der Ratenkonstanten aus drei unabhängigen Experimenten mit je 6-9 Kurven. Die Ratenkonstanten von Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin enthalten, wurden subtrahiert. Die Fehlerbalken markieren die S.E.M.s.

Der Aminosäureaustausch des Histidin146 gegen ein neutrales Alanin führte zu keiner Veränderung der Leitfähigkeit von AQP9 für die Monocarbonsäuren Essigsäure und Milchsäure. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass das Histidin an Position 146 keine relevante Rolle bei der Spezialisierung von AQP9 auf Monocarbonsäuren spielt.

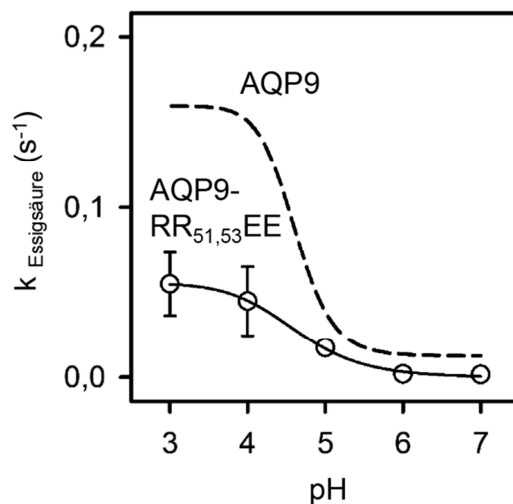


#### 4.2.7 Leitfähigkeit von AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE für Monocarbonsäuren

In AQP9 befinden sich in der extrazellulären Schleife a an Position 51 und 53 zwei Arginine, die aus der Poreneingangsregion herausragen und in der theoretischen Berechnung von Poisson-Boltzmann Potenzialen ein stark positives Feld an der Proteinoberfläche generieren (4.2.4). Eine Substitution der Arginine durch ein unpolares Alanin kam einer Neutralisation gleich (vgl. Elektrostatik RR<sub>51,53</sub>AA, **Abb. 4.37**), die durch Austausch des Histidin146 in so starkem Ausmaß nicht erreicht werden konnte (vgl. Elektrostatik H<sub>146</sub>A, **Abb. 4.37**). Die Mutante AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE führte zu einem stark negativen Feld ähnlich dem von AQP7. Der Effekt der Ladungsumkehrung auf die Leitfähigkeit von AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE für Monocarbonsäuren wurde in weiteren Stopped-Flow Experimenten getestet.

#### Essigsäure

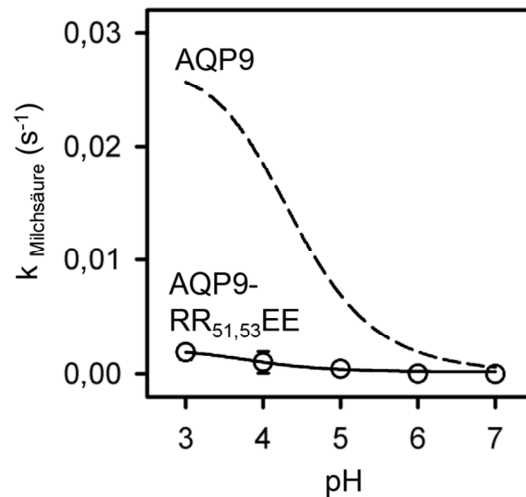
Das pH-Profil der Essigsäureleitfähigkeit von AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE zeigte eine sigmoidale Kurve mit einem Maximum bei pH 3 (**Abb. 4.41**, durchgezogene Kurve, offene Kreise), verlief jedoch deutlich flacher als das von Wildtyp-AQP9 (gestrichelte Linie). Bei pH 3 erreichte AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE 38 % der Leitfähigkeit von Wildtyp-AQP9; bei pH 4 waren es 27 %. Im Bereich von pH 5-7 zeigte Wildtyp-AQP9 2,5-8-mal höhere Raten als AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE.



**Abb. 4.41:** pH-Abhängigkeit des Essigsäure/Acetat-Einstromes für Protoplasten von AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE-bildenden Hefezellen (durchgezogene Linie, offene Kreise) im Vergleich zum Wildtyp (gestrichelte Linie). Dargestellt sind die Mittelwerte der Ratenkonstanten aus drei unabhängigen Experimenten mit je 6-9 Kurven. Die Ratenkonstanten von Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin enthalten, wurden subtrahiert. Die Fehlerbalken markieren den S.E.M.

## Milchsäure

Eine stärkere Reduktion ergab sich für die Leitfähigkeit von AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE für Milchsäure. Ein sigmoidaler Kurvenverlauf deutet sich nur an (**Abb. 4.42**, durchgezogene Linie, offene Kreise). Es wurden maximal 7 % der Leitfähigkeit von Wildtyp-AQP9 erreicht.

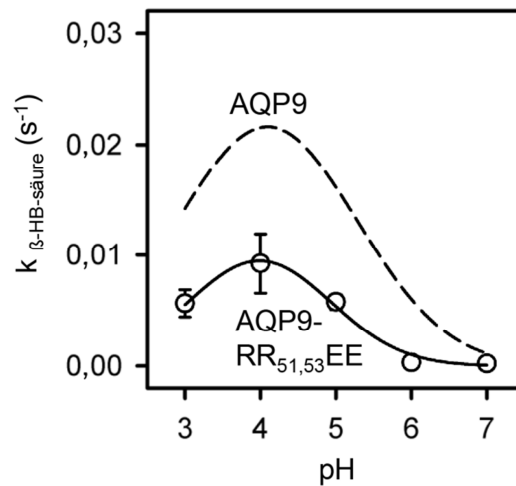


**Abb. 4.42:** pH-Abhängigkeit des Milchsäure-Einstromes für Protoplasten AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE bildender Hefezellen (durchgezogene Linie, offene Kreise) im Vergleich zum Wildtyp-AQP9 (gestrichelte Linie). Dargestellt sind die Mittelwerte der Ratenkonstanten aus drei unabhängigen Experimenten mit je 6-9 Kurven. Die Ratenkonstanten von Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin enthalten, wurden subtrahiert. Die Fehlerbalken markieren den S.E.M.

## β-Hydroxybuttersäure

Die Leitfähigkeit von AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE für β-Hydroxybuttersäure ergab wie für Wildtyp-AQP9 einen glockenförmigen Verlauf mit einem Maximum bei pH 4 (**Abb. 4.43**, durchgezogene Linie, offene Kreise). Bei pH 3 wurden 37 % der Leitfähigkeit von Wildtyp-AQP 9 erreicht. Im Bereich von pH 5-7 waren es höchstens 30 %.

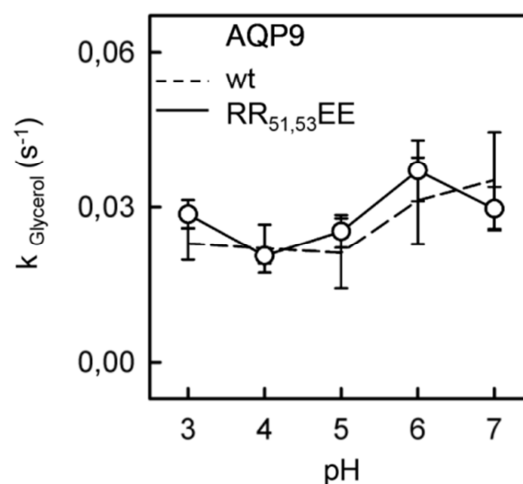
AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE zeigte somit für alle getesteten Monocarbonsäuren eine reduzierte Leitfähigkeit im Vergleich zu Wildtyp-AQP9. Im Bereich von pH 5-7 ist dieser Effekt mit AQP7 vergleichbar. Beide Proteine haben ein negatives Oberflächenlayout und eine Abstoßung von Monocarboxylaten wäre denkbar. Es ist auffällig, dass die Leitfähigkeit von AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE im sauren Milieu, in dem die Glutamate an E51 und E53 protoniert vorliegen und die Elektrostatik keinen Einfluss haben sollte, trotzdem nicht die Werte von Wildtyp-AQP9 erreichte.



**Abb. 4.43:** pH-Abhängigkeit des  $\beta$ -Hydroxybutyrat-Einstromes für Protoplasten von AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE bildenden Hefezellen (durchgezogene Linie, offene Kreise) im Vergleich zum Wildtyp-AQP9 (gestrichelte Linie). Dargestellt sind die Mittelwerte der Ratenkonstanten aus drei unabhängigen Experimenten mit je 6-9 Kurven. Die Ratenkonstanten von Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin enthalten, wurden subtrahiert. Die Fehlerbalken markieren den S.E.M.

### Glycerol

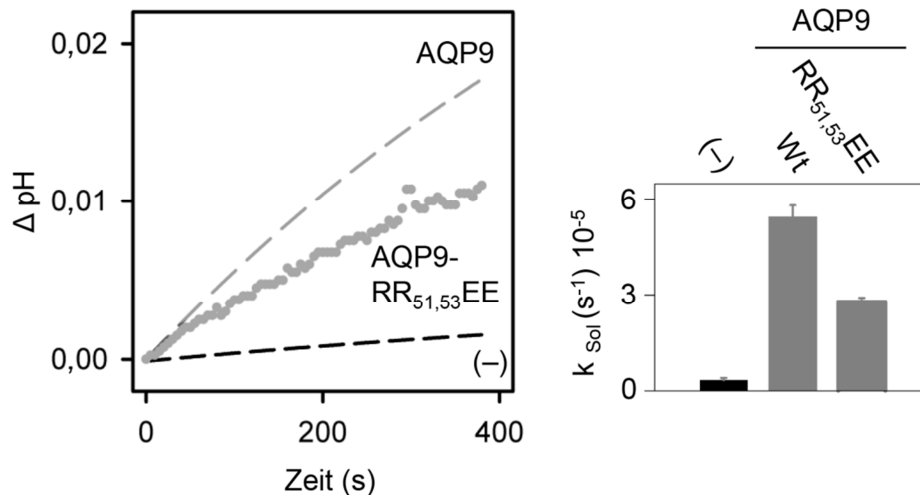
Um auszuschließen, dass die geringe Leitfähigkeit auf einen Funktionsverlust des Proteins zurückzuführen ist, wurde ebenfalls die Glycerolleitfähigkeit von AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE über das gesamte pH-Spektrum getestet. Das pH-Profil der Glycerolleitfähigkeit von AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE (Abb. 4.44, durchgezogene Linie, offene Kreise) deckte sich mit dem von Wildtyp-AQP9 (gestrichelte Linie). Somit konnte Funktion über den gesamten pH-Bereich der Messung angenommen werden und die verminderten Leitfähigkeiten für Monocarbonsäuren sind wahrscheinlich auf die elektrostatische Architektur der Mutante zurückzuführen.



**Abb. 4.44:** pH-Abhängigkeit des Glycerol-Einstromes für Protoplasten AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE bildender Hefezellen (durchgezogene Linie, offene Kreise) im Vergleich zum Wildtyp-AQP9 (gestrichelte Linie). Dargestellt sind die Mittelwerte der Ratenkonstanten aus drei unabhängigen Experimenten mit je 6-9 Kurven. Die Ratenkonstanten von Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin enthalten, wurden subtrahiert. Die Fehlerbalken markieren den S.E.M.

### Aufnahme der neutralen Milchsäure

Für die Mutante AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE wurde in einem weiteren Experiment ebenfalls die pH-Änderung des Mediums nach Zugabe von 20 mM Milchsäure/Laktat bei pH 5, wie unter 3.3.2 beschrieben, untersucht. Auch hier wurde, wie schon zuvor für Wildtyp-AQP9, eine Alkalisierung des Mediums beobachtet, was die Aufnahme der neutralen Milchsäure indiziert (Abb. 4.45). Die Alkalisierung verlief halb so schnell wie durch den Wildtyp vermittelt.



**Abb. 4.45:** pH-Änderung des Mediums über die Zeit für AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE (graue Punkte). Zum Vergleich sind in gestrichelter Form die Kurven für Wildtyp-AQP9 (grau) und von Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin bilden (schwarz) dargestellt (links). Im Balkendiagramm sind Mittelwerte der Ratenkonstanten aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten dargestellt. Die Fehlerbalken indizieren den S.E.M.

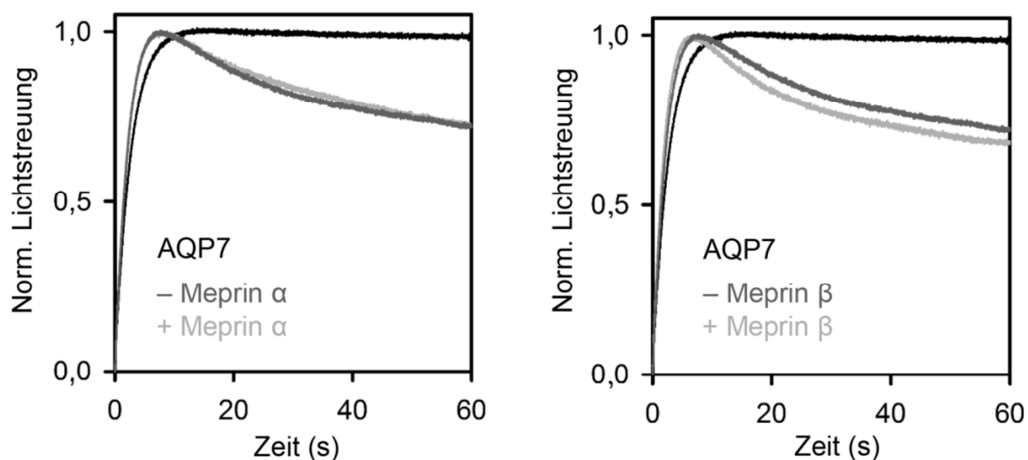
Damit konnte mit einem zweiten unabhängigen Experiment gezeigt werden, dass auch in der Mutante AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE eine Aufnahme der neutralen Säure erfolgt, aber mit niedrigerer Wahrscheinlichkeit als für Wildtyp-AQP9, was vermutlich auf die negative Elektrostatik der Oberfläche von AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE zurückgeführt werden kann. Diese Beobachtung korreliert mit dem Ergebnis der vorangegangenen Stopped-Flow Messungen.

## 4.2.8 Weitere Ergebnisse aus einem Kooperationsprojekt

### Einfluss von Meprinen auf die Glycerolleitfähigkeit von AQP7

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly wurde der Einfluss von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  auf die Glycerolleitfähigkeit von AQP7 untersucht. Meprine sind membrangebundene Metalloproteinasen, die an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt sind (108). Dazu gehören unter anderem eine Beteiligung am extrazellulären Membranturnover, an der Neurodegeneration und an Entzündungsreaktionen (109, 110). Auf der Suche nach möglichen Interaktionspartnern von Meprinen fand Prof. Becker-Pauly in einem *split-ubiquitin yeast-two-hybrid screen* (111, 112) unter den Treffern das murine AQP7.

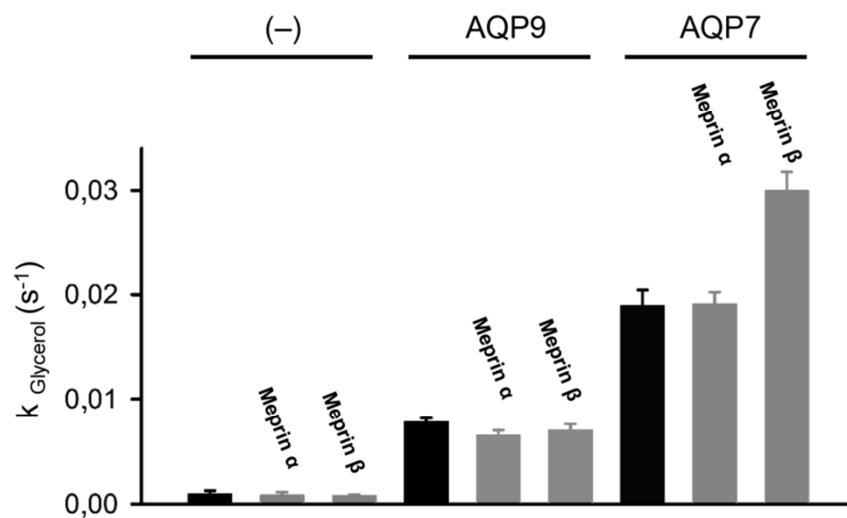
Effekte der Protease auf AQP7 wurden in Stopped-Flow Experimenten weiter untersucht. Die Messungen wurden unter hypertonschen Bedingungen bei pH 7,2 und einem 300 mM Glycerolgradienten durchgeführt. Protoplasten von AQP7-bildenden *S. cerevisiae* BY4742 $\Delta$ fps1 Hefezellen wurden mit 15 nM Meprin  $\alpha$  oder Meprin  $\beta$  versetzt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Vergleich dienten Protoplasten von AQP7-bildenden Hefezellen, die nicht mit Meprinen behandelt wurden. Die Glycerolleitfähigkeit von mit Meprin  $\alpha$  behandelten Hefeprotoplasten (Abb. 4.46, hellgraue Kurve, links) war im Vergleich zu nicht behandelten Protoplasten (dunkelgraue Kurve, links) unverändert. Eine Behandlung mit Meprin  $\beta$  führte hingegen zu einer leichten Erhöhung der Glycerolleitfähigkeit von Protoplasten AQP7 bildender Hefezellen (Abb. 4.46, hellgraue Kurve, rechts) im Vergleich zu nicht behandelten Protoplasten (dunkelgraue Kurve, rechts).



**Abb. 4.46:** Einfluss von Meprin  $\alpha$  (links) und Meprin  $\beta$  (rechts) auf die Glycerolleitfähigkeit von Protoplasten AQP7 bildender Hefezellen (hellgrau) im Vergleich zu nicht behandelten Protoplasten AQP7 bildender Hefezellen (dunkelgrau). Die schwarze Kurve zeigt den Verlauf von Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin bilden.

## Ergebnisse

Um einen Aquaglyceroporin-unabhängigen Effekt auf die Durchlässigkeit der Protoplasten und eine unspezifische Interaktion mit Aquaglyceroporinen im Allgemeinen auszuschließen, wurde der Einfluss von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  auf die Glycerolleitfähigkeit von Protoplasten AQP9-bildender Hefezellen und auf Protoplasten von Hefezellen, die kein Aquaglyceroporin bilden (Negativkontrolle) getestet. Während die Glycerolleitfähigkeit AQP9 (Abb. 4.47, Mitte) und der Negativkontrolle (links) durch Meprine unbeeinflusst blieb, kam es für AQP7 nach Inkubation mit Meprin  $\beta$  zu einem 1,6fachen Anstieg der Ratenkonstante des Glyceroleinstroms (rechts).

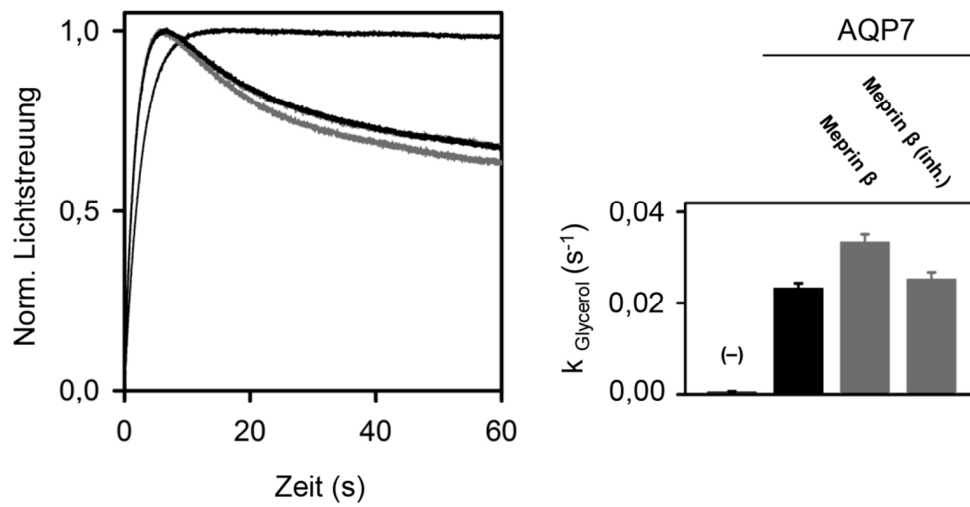


**Abb. 4.47:** Einfluss von Meprin  $\alpha$  und Meprin  $\beta$  auf die Glycerolleitfähigkeit von Protoplasten AQP9, AQP7 und kein Aquaglyceroporin herstellender Hefezellen (graue Balken) im Vergleich zu unbehandelten Protoplasten (schwarze Balken). Es wurden 4 unabhängige Experimente mit jeweils 6-9 Einzelmessungen durchgeführt. Die Fehlerbalken indizieren den S.E.M.

Im nächsten Schritt wurde evaluiert, ob der Effekt des Meprin  $\beta$  den Glyceroleinstromes durch AQP7 zu erhöhen auf dessen Protease-Aktivität oder auf eine reine Bindung an das Proteinmolekül zurückzuführen ist. Dazu wurde Meprin  $\beta$  mit 20  $\mu\text{M}$  des Inhibitors Actinonin 30 min vorbehandelt, bevor die Inkubation der Protoplasten gestartet wurde. Es kam es zu einem Glyceroleinstrom, der sich mit dem von Protoplasten AQP7-bildender Hefezellen deckte, die unbehandelt waren (Abb. 4.48).

Das Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass die Erhöhung der Glycerolleitfähigkeit von AQP7 nach Behandlung mit Meprin  $\beta$  mit dessen enzymatischer Aktivität verknüpft ist und das Aquaglyceroporin AQP7 vermutlich ein Substrat dieser Protease ist. Die Ratenkonstanten von sowohl unbehandeltem AQP7, als auch mit inhibiertem Meprin  $\beta$  behandeltem AQP7 unterscheiden sich im t-Test innerhalb eines 95%igen Konfidenzintervalls von der Ratenkonstante von mit Meprin  $\beta$  inkubiertem AQP7.

## Ergebnisse



**Abb. 4.48:** Einfluss von aktiven und inaktiven Meprin  $\beta$  (graue Kurven links, graue Balken rechts) auf die Glycerolleitfähigkeit von Protoplasten AQP7 bildender Hefezellen im Vergleich zu unbehandelten Protoplasten (schwarze Kurven links, schwarze Balken rechts). Es handelt sich um Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten aus jeweils 6-9 Einzelmessungen. Die Fehlerbalken indizieren den S.E.M.

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die ausgewählten Aquaglyceroporine TbAQP2 und AQP9 auf ihre Leitfähigkeit für geladene Solute, unter Berücksichtigung von Besonderheiten im ar/R-Selektivitätsfilterlayout und ihrer elektrostatischen Architektur, zu untersuchen. Für TbAQP2 sollte eine mögliche Passage des di-kationischen Arzneistoffes Pentamidin evaluiert und das AQP9 auf seine Leitfähigkeit für organische Anionen hin getestet werden.

### 5.1 Fungiert TbAQP2 als Transporter für das Pentamidin-Kation?

In dieser Arbeit konnte in Stopped-Flow Messungen gezeigt werden, dass der Selektivitätsfilter von TbAQP2 trotz seines besonderen Layouts uneingeschränkt in der Lage ist, organische Kationen auszuschließen und eine Passage des 340 Da großen zweifach positiv geladenen Pentamidins unwahrscheinlich ist (4.1.1).

Kationenleitfähigkeit der Protomerpore von natürlich vorkommenden Aquaporinen und Aquaglyceroporinen ist bisher in der Literatur nicht beschrieben und würde auch stark von den bisherigen Erkenntnissen zum Selektionsmechanismus divergieren. Eine unkontrollierte Passage durch die rigide Kanalpore von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen würde zu einem Einbruch des Membranpotentials und zur Zerstörung der Lebensfähigkeit von Zellen führen. Die Aufrechterhaltung des Kationenhaushaltes ist streng reguliert und spezialisierten Transportern überlassen (113). Es gibt jedoch Berichte über den Transport monovalenter Kationen über die Zentralpore des humanen AQP1 (114). Die *in vitro* erzeugte Doppelmutante AQP1-NN<sub>76,192</sub>DD, in der die NPA-Motive zu DPA mutiert und damit die Helixdipole neutralisiert wurden, gewann ebenfalls die Fähigkeit Natriumionen zu leiten (34). Ein natürlich vorkommendes Aquaporin bzw. Aquaglyceroporin mit einer solchen Mutation ist allerdings nicht bekannt (10). Veränderungen der NPA-Region betreffen häufig die zweite oder dritte Aminosäure (10). So ist das NSA/NPS-Motiv von TbAQP2 zwar unkonventionell (13), aber die kritischen Asparagine, die mit ihren Amidgruppen ins Poreninnere ragen, sind unversehrt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde experimentell gezeigt, dass die Abstoßung positiv geladener Moleküle gewährleistet ist.



## Diskussion

Zudem ist die Pore von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen 20 Å lang und mit 3-4 Å Durchmesser sehr eng (24). Schon kleinste Konformationsänderungen könnten hier zu einer Blockade des Kanals führen. Um eine durchweg offene Pore zu wahren, ist die Proteinstruktur von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen sehr rigide (24). Damit ist eine für die Passage von Pentamidin benötigte Aufweitung unwahrscheinlich. Im Allgemeinen ist die Aufnahme eines Arzneistoffes über ein Aquaglyceroporin zwar selten, aber nicht ungewöhnlich, wie eine Betrachtung der Struktur der wenigen Beispiele aufzeigt. Das für die Behandlung der akuten promyelozytischen Leukämie eingesetzte Arsenitrioxid gelangt über AQP7 als arsenige Säure ( $\text{As}(\text{OH})_3$ ) in die Zellen (18). Pentostam, bei der Behandlung der Leishmaniose eingesetzt, gelangt über das LmAQP1 als antimonige Säure ( $\text{Sb}(\text{OH})_3$ ) in den Parasiten (115). Das Zytostatikum N-Hydroxycarbamid ist sowohl zu einer Passage des PfAQP1 als auch des *Toxoplasma gondii* Aquaglyceroporins (TgAQP) befähigt (11). Diesen aufgeführten Arzneistoffen ist gemein, dass sie zum einen Strukturähnlichkeiten zu den physiologischen Substraten Glycerol und Harnstoff aufweisen und zum anderen ungeladen sind – zwei Eigenschaften, die das Pentamidin nicht erfüllt.

Eine Annahme, dass Pentamidin die Biomembran über TbAQP2 im Sinne eines protonenabhängigen Transports überquert (99, 57), widerspricht gleich drei prinzipiellen Merkmalen von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen. Zum einen dem Ausschluss durch Größe, zum anderen dem Ausschluss durch Ladung, sowie der passiven Kanalfunktion. Die begriffliche Trennung zwischen Kanal und Transporter verschwimmt. Die für Aquaporine und Aquaglyceroporine charakteristische Kanaleigenschaft, eine starre allzeit geöffnete Tür zu sein, zeigt sich in der hohen Leitfähigkeit für Wasser und/oder ungeladene Solute wie Glycerol entlang des chemischen Gradienten. Das orthodoxe AQP1 kann schätzungsweise  $3 \times 10^9$  Wassermoleküle pro Sekunde durch sein Inneres leiten (116), was der freien Diffusion in Wasser entspricht (14). Das Aquaglyceroporin *E. coli* GlpF zeigt hingegen nur eine geringe Leitfähigkeit für Wasser, aber dafür einen 100-1.000fach schnelleren Glycerolinflux als man beispielsweise für einen Transporter erwarten würde und der auch bei einer Glycerolkonzentration von  $> 200$  mM nicht sättigbar ist (38). Wie kann es dann sein, dass die literaturbeschriebene Aufnahme von  $[\text{H}^3]$ -Pentamidin in Trypanosomen sättigbar war und eine hohe Affinität mit einem  $K_m$ -Wert von 36 nM zeigt, welches eher Eigenschaften eines Transporters darstellen (99)? Substrate von Kanälen haben deutlich geringere Affinitäten mit  $K_m$ -Werten im 2-3-stelligen millimolaren Bereich. Ein klassischer Transporter durchläuft Konformationsänderungen, die dafür sorgen, Substrat auf einer Seite gebunden und auf der anderen wieder entlassen wird. Toxine oder mit Krankheiten assoziierte Mutationen können die Transporterregulation stören

(117). Beispielsweise ist das marine Palytoxin in der Lage, den koordinierten Ablauf zwischen geöffnetem und geschlossenem Zustand der Na/K-ATPase so zu stören, dass der Transporter zeitweise vollständig geöffnet ist und es zu einem unkontrollierten Ionenfluss kommt (118, 119). Es ist nicht ungewöhnlich, dass innerhalb einer Proteinfamilie sowohl Vertreter mit Transport- als auch Kanalfunktion auftreten, wie im Fall der Chloridkanäle (ClC) (120, 121). Auch eine Entwicklung eines Kanals aus einem Transporter im Zuge der Evolution ist bekannt, wie im Beispiel des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulators* (CFTR), einem intrinsischen Chloridkanal aus der Familie der ABC-Transporter (117). Es ist bisher nicht beschrieben, dass ein Protein unter physiologischen Bedingungen zwischen einer Kanal- und Transportfunktion umschalten kann (117). Dass TbAQP2 für Glycerol Kanaleigenschaften und gleichzeitig für Pentamidin Eigenschaften eines Transporter zeigt, ist unwahrscheinlich.

### **5.2 Pentamidin als nanomolarer Inhibitor der Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2**

Der Selektivitätsfilter von TbAQP2 ist intakt und schließt in Stopped-Flow Messungen mit dem Modellsystem Hefe positiv geladene Moleküle aus. Die Rolle von Pentamidin als Solut des Proteins ist deshalb unwahrscheinlich. Vielmehr konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es sich bei Pentamidin um einen hochaffinen Inhibitor der Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 bildenden Hefezellen mit einem  $IC_{50}$  von 130 nM handelt (4.1.2). Bemerkenswert ist unter diesem Gesichtspunkt die Fähigkeit von Pentamidin, schon in nanomolaren Konzentrationen den Fluss eines relativ harschen Glycerolgradienten von 300 mM zu mindern. In der Literatur wurden in Pentamidin-Sensitivitätsassays mit Trypanosomen ein noch deutlich niedrigerer  $EC_{50}$ -Wert von 2,9 nM ermittelt (58). Beim Vergleich dieser beiden Werte ist zu berücksichtigen, dass sich der in dieser Arbeit ermittelte  $IC_{50}$ -Wert auf die Hemmung der Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 in Hefe bezieht, während für die Wirkung von Pentamidin wahrscheinlich deutlich weniger Pentamidin-Moleküle nötig sind, um die Trypanosomen zu töten. Unter physiologischen Bedingungen liegen im Blut ca. 60  $\mu$ M Glycerol vor (122). In dem literaturbeschriebenen Pentamidin-Sensitivitätsmessungen in Trypanosomen wurden dem Medium 15-20 % Blutserum zugesetzt, womit der Glycerolgradient zudem um vier Größenordnungen niedriger war als in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Stopped-Flow Messungen (123). Zudem konnte gezeigt werden, dass die inhibitorische Wirkung von Pentamidin für TbAQP2 spezifisch ist. Für TbAQP3 kam es nach Inkubation selbst mit 500  $\mu$ M Pentamidin nicht zu einer Hemmung des Glyceroleinstromes in die Protoplasten (4.1.2). Damit ist Pentamidin ein spezifischer nanomolarer Inhibitor der Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 mit bei Aquaglyceroporinen noch nie zuvor gesehener Affinität (39).  $IC_{50}$ -Werte im oberen

## Diskussion

nanomolaren Bereich sind bisher nur für eher unspezifische metallorganische Verbindungen bekannt, die kovalent an Cysteine des Proteins binden und zum Kollaps des ar/R-Selektivitätsfilters führen (124). Der bisher potenteste Inhibitor ist das goldhaltige Auphen, welches mit einem  $IC_{50} = 800 \text{ nM}$  die Glycerolleitfähigkeit von AQP3 hemmt (125).

Die hohe Affinität von Pentamidin zu TbAQP2 liefert zudem einen weiteren Anhaltspunkt, weshalb eine Passage unwahrscheinlich erscheint. Transporter zeichnen sich dadurch aus, dass ein Substrat auf der einen Seite bindet, und zwar mit deutlich höherer Affinität als der Solut eines Kanals es tut (117). Dieses muss aber nach der Konformationsänderung des Transporters auch wieder in der Lage sein sich auf der anderen Seite der Membran abzulösen (117). Hochaffine Transporter zeigen  $K_m$ -Werte im mikromolaren und die Aquaporin-ähnlichen Formiat-Nitrit-Transporter PffNT und *E. coli* FocA im sogar hohen millimolaren Bereich (126, 106, 127). Mit einer Affinität im nanomolaren Bereich wäre Pentamidin als Substrat eines Transporters ungewöhnlich, da eine Dissoziation hier deutlich erschwert wäre. Die hohe Affinität könnte allerdings ein Hinweis darauf sein, dass in literaturbeschriebenen Transportassays in Trypanosomen mit radioaktivmarkiertem  $[H^3]$ -Pentamidin *on-rates*, d.h. die Bindung an TbAQP2, detektiert wurden, jedoch nicht die echte Aufnahme in die Zelle.

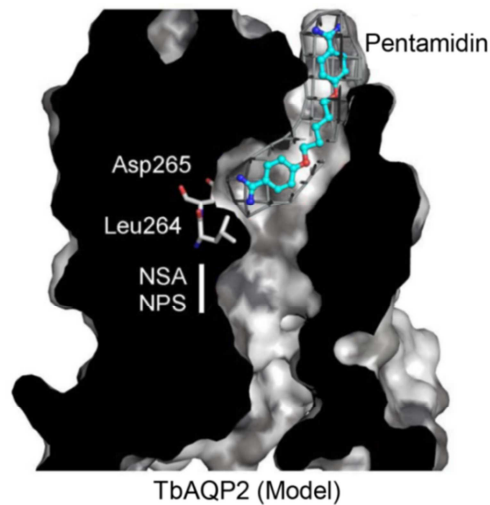
### 5.3 Der Bindemodus von Pentamidin an TbAQP2

Im Rahmen dieser Arbeit wurden strukturelle Voraussetzungen sowohl des Pentamidins als auch von TbAQP2 aufgeklärt, die die hohe Affinität bedingen. So war die Hemmwirkung von Pentamidin auf die Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 an das Vorhandensein der vollständigen aliphatischen Mittelkette und mindestens einer positiv geladenen Amidinfunktion gebunden (4.1.2). Im TbAQP2 wurde durch Inhibitionsmessungen der Aminosäureaustausche TbAQP2-D<sub>265</sub>A und TbAQP2-D<sub>265</sub>N an der Stopped-Flow Apparatur das Aspartat an Position 265 in Nachbarschaft zum ar/R-Selektivitätsfilter als für die Wechselwirkung mit dem Pentamidin essentielle Aminosäure ermittelt (4.1.4).

Ein zum Arginin des ar/R-Selektivitätsfilters nachbarständiges Aspartat ist ein typisches Motiv von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen (100). Die beiden Aminosäuren stehen mit ca. 4,5 Å Abstand so eng beieinander, dass ihre geladenen funktionellen Gruppen eine intramolekulare Salzbrücke untereinander ausbilden können (24). Dieses Szenario wurde im Rahmen dieser Arbeit durch den Aminosäureaustausch TbAQP2-L<sub>264</sub>R imitiert und so eine Pentamidinresistenz erzeugt (4.1.5). Durch ein natürlicherweise fehlendes Arginin im ar/R-Selektivitätsfilter von TbAQP2 steht dieses Aspartat an Position 265 für elektrostatische Wechselwirkungen zur Verfügung – ein Alleinstellungsmerkmal des Proteins. TbAQP2 ist bei weitem nicht das einzige Aquaglyceroporin, welches kein hochkonserviertes Arginin aufweist. In etwa 11 % der MIPs ist dieses durch eine andere Aminosäure substituiert (58). Auffällig ist in diesem Zusammenhang jedoch, dass ein Fehlen des Arginins in anderen Aquaporinen und Aquaglyceroporinen mit einem gleichzeitigen Austausch des Aspartats gegen eine neutrale Aminosäure einhergeht, wie beispielsweise im Falle des TgAQP (9, 11). Die Länge der Pentoxykette des Pentamidins von 7-8 Å entspricht dem Abstand der Poreneingangsregion zum ar/R-Selektivitätsfilter (33, 128). Dies gewährleistet vermutlich, dass die Amidinfunktion des Pentamidins weit genug in die Kanalpore von TbAQP2 hineinragt, um mit der freistehenden Carboxylfunktion des Aspartates an Position 265 in Wechselwirkung zu treten. Für orthodoxe Aquaporine ist in der Literatur beschrieben, dass ein potenzieller Inhibitor mindestens sechs Größenordnungen stärker als ein Wassermolekül binden müsste, um die 55 M Wasser von der Oberfläche zu verdrängen (129, 130). Zudem können elektrostatische Interaktionen sich am besten ausbilden, wenn sie von Wasser isoliert stattfinden (131, 132). Die Pentoxykette und Benzylgruppen des Pentamidins führen in TbAQP2 wahrscheinlich zu einer Verdrängung von Bulkwasser von der Oberfläche der Porenregion durch lipophile Abschirmung und tragen vermutlich maßgeblich zu der hohen Affinität von Pentamidin an TbAQP2 bei. Im ar/R-Selektivitätsfilter von TbAQP2 kennzeichnen

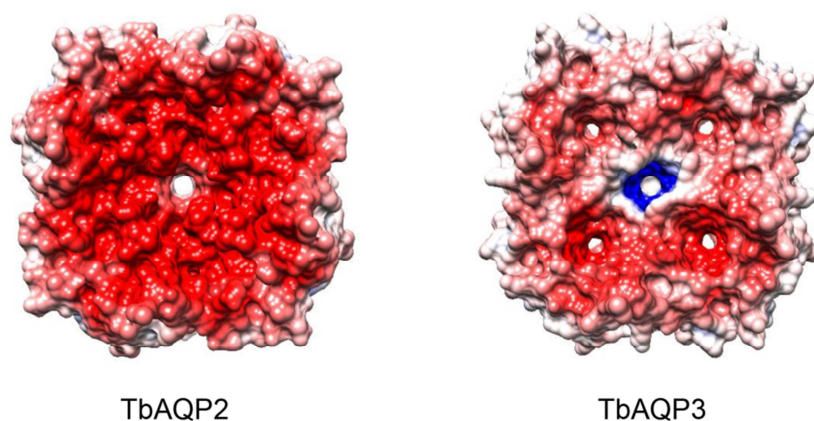
## Diskussion

hauptsächlich kleinere aliphatische Aminosäuren die Ebene der Konstriktionsstelle (1.2.1). Im Modell der Tertiärstruktur von TbAQP2 führt dies zu einer Aushöhlung, in die sich die Benzamidinfunktion des Pentamidins einschmiegen kann (**Abb. 5.1**):



**Abb. 5.1:** Bindemodus von Pentamidin an TbAQP2. Das Modell wurde mit Swissmodel basierend auf den Koordinaten der *E. coli* GlpF Kristallstruktur (PDB#F1X8) von Prof. Dr. Eric Beitz erstellt und mit Pymol visualisiert.

Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen der positiv geladenen Amidinfunktion des Pentamidins und der freistehenden Carboxylfunktion des Aspartates an Position 265 in TbAQP2 ist ein entscheidender Faktor für die hohe Affinität. Wie unter 1.1.2 beschrieben, bedingt auch die Gesamtelektrostatik von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen die Feinselektion von Soluten. Pentamidin als zweifach positiv geladenes Arzneistoffmolekül lässt prinzipiell die Vorstellung einer elektrostatischen Wechselwirkung mit negativer Ladung zu. Unter diesem Gesichtspunkt wurden für TbAQP2 und TbAQP3 Poisson-Boltzmann Potentiale der Oberfläche berechnet (**Abb. 5.2**).



**Abb. 5.2:** Poisson-Boltzmann Oberflächenelektrostatik von TbAQP2 (links) und TbAQP3 (rechts) in der Aufsicht auf das Tetramer von periplasmatischer Seite. Die Modelle für die Berechnung wurden basierend auf der *E. coli* GlpF Kristallstruktur (PDB#1FX8) erstellt.

Für TbAQP2 zeigte sich ein auffällig starkes negatives Potenzial der gesamten Oberfläche in noch stärkerer Ausprägung als bei AQP7 und AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE (4.2.4). Das nicht pentamidinsensitive TbAQP3 zeigte auch ein negatives Potenzial, jedoch in schwächerer Form als bei TbAQP2. Diese Konzentration negativer Ladung könnte dazu führen, dass die Wirkung von Pentamidin im Sinne einer erhöhten Aufenthaltswahrscheinlichkeit des positiven Moleküls in der Porenregion von TbAQP2 begünstigt wird.

### 5.4 TbAQP2 ist nicht das Target von Pentamidin

Die Ergebnisse zeigen, dass Pentamidin einige Voraussetzungen erfüllt, die ein guter Aquaporin-Inhibitor braucht. Durch lipophile Abschirmung und elektrostatische Interaktion am Aspartat<sub>265</sub> wird hohe Affinität im nanomolaren Bereich erreicht (130). Da das freistehende Aspartat an Position 265 in TbAQP2 einzigartig ist, wird zusätzlich eine hohe Selektivität erreicht – ein wichtiger Gesichtspunkt, wenn man das ubiquitäre Vorkommen von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen im menschlichen Organismus im Hinblick auf das Nebenwirkungspotential bedenkt (29, 39).

Pentamidin passiert TbAQP2 nicht, sondern wirkt als nicht-kovalenter Inhibitor. Wie bereits unter 1.2.1 beschrieben, sind die TbAQPs nicht essentiell für Trypanosomen und die Glycerolaufnahme kann auch über andere Stoffwechselwege bewerkstelligt werden, weshalb diese kein valides Target darstellen (57, 65, 133). Dieses Phänomen zeigt sich auch bei anderen Parasiten wie *Plasmodium berghei* und *Leishmania major*, deren AQP-*knockout*-Stämme nur milde Phänotypen zeigen (134, 115). So sind auch TbAQP2-*knockout*-Stämme lebensfähig und eine Hemmung von TbAQP2 somit nicht das Wirkprinzip von Pentamidin (56).

Wie wichtig TbAQP2 allerdings für die Wirkung von Pentamidin ist, zeigt die Resistenzbildung der TbAQP2-*knockout*-Trypanosomen (58). Da nach bisherigem Erkenntnisstand die Targets von Pentamidin im Zellinneren zu finden sind, bleibt es also noch offen, für das Puzzle einen Lösungsansatz zu geben, der erklärt, wie ein Arzneistoff, der TbAQP2 nicht passiert, trotzdem nur in die Zelle gelangen und wirken kann, wenn TbAQP2 anwesend ist.

## 5.5 Endozytose – ein möglicher Weg für Pentamidin in die Trypanosomen

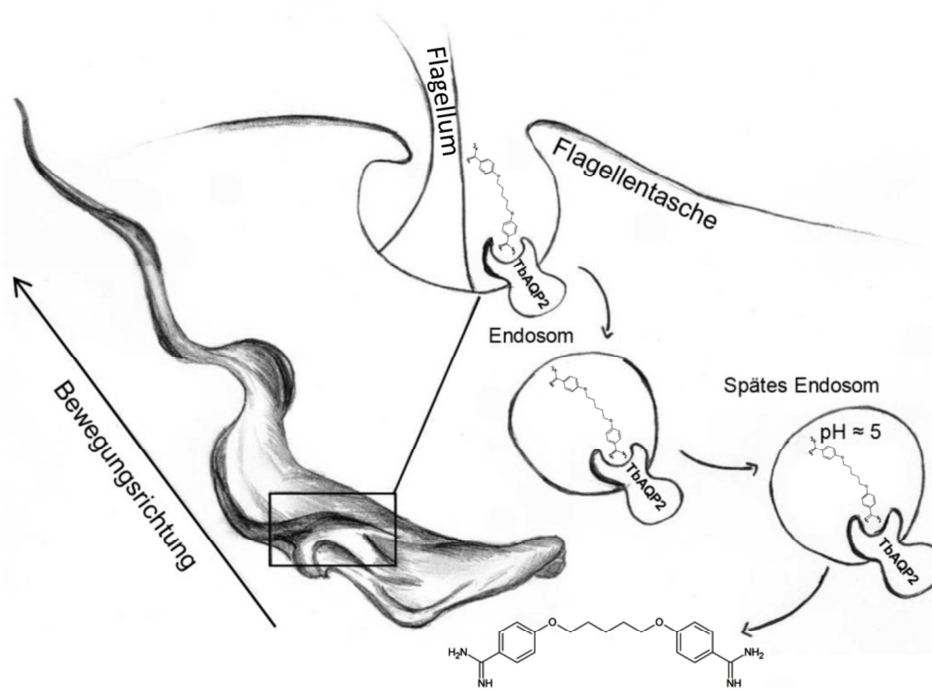
Nanomolare Affinitäten, wie Pentamidin sie für TbAQP2 zeigt, werden vor allem in Rezeptor-Ligand-Komplexen erreicht (135). Selbst der niedrigaffine  $\beta$ -adrenerge Rezeptor bindet das Katecholamin Epinephrin mit einem  $K_D$ -Wert von 2  $\mu\text{M}$  und zeigt damit niedrigere Werte als hochaffine Transporter (136). Es sind aber auch hochaffine Rezeptor-Ligand Bindungen im einstelligen femtomolaren Bereich bekannt, wie im Fall des Avidin-Biotin Komplexes (137). Auch die meisten Antikörper binden an das entsprechende Antigen mit Affinitäten im niedrigen mikromolaren bis niedrigen nanomolaren Bereich (138). Ein möglicher Aufnahmeweg von Rezeptor-Ligand-Komplexen ist die rezeptorvermittelte Endozytose; ein in Zellen physiologisch permanent ablaufender Prozess, durch den in Säugern unter anderem die Aufnahme von Makromolekülen und Peptidhormonen wie LDL, Transferrin und Insulin erfolgt (4). Wenn TbAQP2 nicht als Kanal für Pentamidin fungiert, wäre dann aber eine Bindung des Arzneistoffes im Sinne eines Rezeptors und Internalisierung des Komplexes durch Endozytose auch in diesem Beispiel ein schlüssiger Aufnahmeweg? Schon vor über 40 Jahren konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Pentamidin in Trypanosomen unidirektional erfolgt und metabolische Energie erfordert (139) – zwei Charakteristika einer Endozytose.

Der Erreger *Trypanosoma brucei* bildet während seines Entwicklungszyklus zwei morphologisch verschiedene Formen aus – die lange, schlanke Blutform im Kreislauf des Wirts und die kurze, gedrungene Insektenform, die für die Tsetsefliege infektiös ist (140). Die Blutform hat im Vergleich zur Insektenform eine drastisch erhöhte Frequenz an Membranumsatz in der Flagellenregion des Parasiten (141). Im Mittel werden dort 8 % der Oberfläche pro Minute internalisiert, was einer vollständigen Erneuerung alle 12,5 min entspricht (141, 142). Dem Erreger dient diese hohe Endozytoseaktivität vor allem dem Überleben im Immunsystem seines Wirtes. An der Oberfläche eines Trypanosomen befindet sich ein dichter Mantel von ca.  $5 \times 10^6$  *variant surface glycoproteins* (VSG), an die die Antikörper des Immunsystems binden (143). Durch Endozytose werden die VSG schnell recycelt und somit die Oberfläche von Antikörpern bereinigt (141). Für Suramin, ein Trypanblau-Analogon, welches ebenfalls für die Behandlung der Schlafkrankheit eingesetzt wird, ist als Aufnahmemechanismus die rezeptorvermittelte Endozytose beschrieben (144). Suramin ist sechsfach sulfatiert und somit stark positiv geladen. Dies bedingt die nicht nur unspezifische Bindung an Plasmaproteine, sondern vor allem eine hohe Affinität für das *invariant surface glycoprotein* (ISG) 75 der Trypanosomen, welches als Shuttle für den Arzneistoff in die Zelle dient (144).

## Diskussion

Die Verteilung von TbAQP2 variiert stark zwischen der Insektenform des Erregers, bei der es ubiquitär auf der Plasmamembran vorkommt, und der Blutform, bei der es auf die Flagellenregion konzentriert ist (58). Die Blutform zeigt *in vitro* zudem höhere Transportraten und Sättigungskonzentrationen für Pentamidin als die Insektenform (58, 145, 139, 145). Dies verdeutlicht die Schlüsselrolle der Flagellenregion bei der Pentamidinaufnahme und untermauert die Hypothese einer rezeptorvermittelten Endozytose. Könnte Pentamidin von TbAQP2 geleitet werden, würde zudem die Verteilung des Proteins auf der Oberfläche des Erregers wohl kaum eine Rolle spielen.

Eine rezeptorvermittelte Endozytose ist auf Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Ergebnisse und dem aktuellen Kenntnisstand die plausibelste Erklärung für eine Aufnahme von Pentamidin über TbAQP2. Es wurde folgendes Model entwickelt (**Abb. 5.3**):



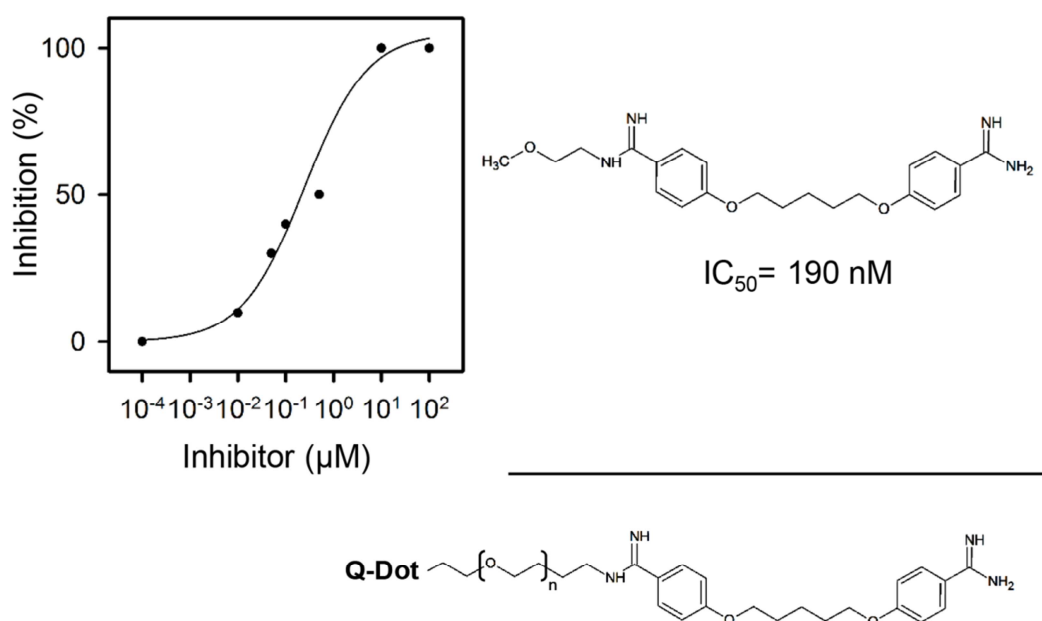
**Abb. 5.3:** Darstellung der rezeptorvermittelten Endozytose von Pentamidin über TbAQP2 in der Flagellentasche als hypothetischer Aufnahmeweg in Trypanosomen.

Demnach würde Pentamidin mit hoher Selektivität und Affinität an TbAQP2 in der Flagellenregion der Trypanosomen binden. Der Komplex würde mit der nächsten Membranstülpung aufgenommen werden und im Endosom in das Zytosol wandern. Eine allmähliche Azidifizierung im späten Endosom auf pH-Werte < 5 könnte das für die Pentamidinbindung essentielle Aspartat an Position 265 in TbAQP2 protonieren und die Affinität zwischen Rezeptor und Ligand senken. TbAQP2 und Pentamidin würden in der Folge dissoziieren und Pentamidin könnte zu seinem Wirkort diffundieren.



## Diskussion

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit Versuche unternommen, die Endozytose zu visualisieren und die vorliegende Hypothese zu bestätigen. Dazu wurden von Björn Henke verschiedene Fluoreszeinkoppelte Pentamidinvarianten synthetisiert und im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dawid Horn an der Universität von Dundee an Trypanosomen getestet. Leider waren die Fluoreszenzsignale in den eingesetzten Konzentrationen des Wirkstoffes zu schwach. Daraufhin wurde Pentamidin mit Amino-(PEG)-*Quantum-Dots* gekoppelt. Dabei handelt es sich um Halbleiternanokristalle, die deutlich größer als organische Fluoreszenzfarbstoffe sind und schon in geringen Konzentrationen starke Fluoreszenzsignale liefern (146). Die Größe hätte den Vorteil, dass eine Passage durch TbAQP2 und jedes andere Protein unmöglich wäre und zudem schon wenige Moleküle im Zellinneren ausreichen, um eine Endozytose zu detektieren. In Vorversuchen an der Stopped-Flow Apparatur konnte gezeigt werden, dass sich die Affinität des (PEG)-*Quantum-Dot*-gekoppelten Pentamidins wahrscheinlich nicht ändert. Eine Variante mit Methoxyethyl-Linker ohne Amino-(PEG)-*Quantum-Dot* lieferte einen  $IC_{50}$ -Wert von 190 nM (**Abb. 5.4**). Der Versuch wurde nicht weiterverfolgt als sich herausstellte, dass die Verbindung bereits in geringen Konzentrationen für Trypanosomen toxisch ist.



**Abb. 5.4:** A. Inhibitionskurve einer Methoxyethyl-Variante des Pentamidins (oben), die reduzierte Strukturmerkmale des (PEG)-*Quantum-Dot*-Pentamidins (rechts, unten) aufweist.

Ob (PEG)-*Quantum-Dot*-gekoppeltes Pentamidin nach diesem Ergebnis als Ehrlichs „Giftpfeil“ gesehen werden kann, der erst spezifisch bindet (Pentamidin) und dann tötet (*Quantum Dots*), steht wohl außer Frage, da auch Trypanosomen, die nicht TbAQP2 bilden das Experiment nicht überlebten (147, 148). Etwas verwunderlich ist die aufgetretene Zelltoxizität dennoch, da

## Diskussion

*Quantum Dots* ein etabliertes Instrument sind, um in lebenden Zellen endozytische Prozesse nachzuweisen (149, 150). Trotz des unbefriedigenden Ausgangs dieses Experimentes stellt es ein Beispiel dar, welche neuen Möglichkeiten eine eventuelle Endozytose für die Wirkstoffentwicklung bereithält. Denkbar wäre ein auf die essentiellen Strukturelemente reduzierter Pentamidinanker, der spezifisch an TbAQP2 bindet und mit einer parasitentoxischen Komponente gekoppelt ist, die nach der Endozytose im Zellinneren ihre Wirkung entfaltet. Dieses Targetingprinzip ist in der Onkologie schon weit verbreitet – die Verwendung und Erforschung kleiner immunotoxischer Moleküle, Peptide oder  $\beta$ -Strahler an Antikörper oder Antikörperfragmente gekoppelt, die eine gezielte Adressierung von Tumorzellen ermöglichen (151). Für die Behandlung der Schlafkrankheit gibt es auch Unternehmungen, dieses Prinzip zu übertragen. Beispielsweise wird Transferrin-gekoppeltes Azantraquinon über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und zeigt *in vitro* Wachstumsinhibition von Trypanosomen (152). Trunkiertes Apolipoprotein L-1, mit einem gegen trypanosomales VSG gerichteten Antikörper konjugiert, wird ebenfalls über Endozytose aufgenommen und zeigt im Mausmodell gute Ergebnisse (153). Die Endozytose als Arzneistoff-Aufnahmemechanismus zu nutzen hätte den Vorteil, dass diese für den Erreger zur Nährstoffaufnahme und Protektion vor Angriffen des Immunsystems ein unverzichtbarer und überlebenswichtiger Prozess ist und deshalb fortwährend abläuft (154). Ein Aquaglyceroporin als Rezeptor wäre mit TbAQP2 etwas Neues. Es ist zu bedenken, dass sich durch Mutationen des Proteins dennoch Resistenzen ausbilden können. So zeigen Feldisolate pentamidinresistenter *T. brucei*-Stämme eine Deletion von TbAQP2 oder die Bildung von TbAQP2/3-Chimären (155). Um die Resistenzbildung zu minimieren wäre eine Kombinationstherapie mit einem zweiten Wirkstoff, der ebenfalls die Endozytose durch Bindung an ein weiteres Protein als Aufnahmemechanismus nutzt, denkbar.

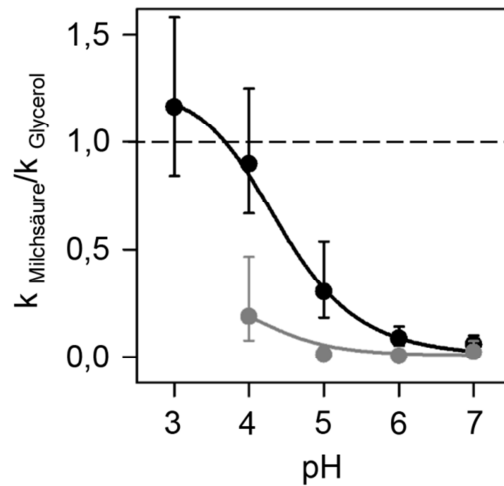
## 5.6 Kann AQP9 organische Anionen leiten?

Am Anfang der Untersuchungen stand die Frage, ob die positive Barriere, die in Aquaporinen und Aquaglyceroporinen zur Abstoßung positiver Ladung beiträgt, nicht auch im Umkehrschluss zu einer Attraktion von Anionen führen könnte – ein in der Literatur spärlich beleuchteter Aspekt. *Molecular dynamics* Analysen des *E. coli* GlpF zeigen den Einfluss negativer Dipole der Halbhelices in der Poreneingangsregion bei der Abstoßung von Anionen (156). Zusätzlich führen die Autoren an, dass die NPA-Region zu einer starken Koordination des Anions führen und eine weitere Passage verhindern würde (156). Dem gegenüber stehen wenige Beispiele für Aquaporine und Aquaglyceroporine mit potenzieller Anionenleitfähigkeit, die diese *in silico* Hypothese anfechten (1.3).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Stopped-Flow Messungen für AQP9 eine Zunahme der Leitfähigkeit mit sinkendem pH und damit eine Korrelation zum Anteil protonierter neutraler Monocarbonsäure gezeigt werden (4.2.1). Dieses Profil wurde für alle getesteten Substrate Essigsäure, Milchsäure und  $\beta$ -Hydroxybuttersäure gefunden und gibt einen starken Hinweis darauf, dass die geleitete Spezies die neutrale Säure ist. Eine Präferenz für das Anion hätte in einem spiegelbildlichen Verlauf des pH-Leitfähigkeitsprofils resultiert mit einem Maximum der Ratenkonstante bei pH 7, wo das Anion die vorherrschende Spezies ist. Am pH-Meter wurde zusätzlich eine Alkalisierung des Mediums durch AQP9 bildende Hefezellen gezeigt, die nur ablaufen kann, wenn das Monocarboxylat-Anion gemeinsam mit dem Proton die Kanalpore überquert. Durch den Einsatz des Protonenentkopplers DNP konnte in einem weiteren Stopped-Flow Experiment die Unabhängigkeit vom Protonengradienten gezeigt werden (4.2.2). Damit konnte zusätzlich ein Co-Transport ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Anteil an Säure geleitet wird, der aufgrund des Dissoziationsgleichgewichtes natürlicherweise vorliegt. Daraus lässt sich ableiten, dass der Protonierungsschritt im Lösungsmittel erfolgt und eine direkte Beteiligung von AQP9 bei der Übertragung eines Protons unwahrscheinlich ist. Erstaunlicherweise konnte für AQP7, welches sogar eine 2-4fach höhere Leitfähigkeit für Glycerol zeigt als AQP9, nur ein Bruchteil dessen Monocarbonsäureleitfähigkeit nachgewiesen werden (4.2.1). Dieses Ergebnis deckt sich auch mit der Literatur. Für AQP7 ist bisher keine Leitfähigkeit für Monocarbonsäuren/Monocarboxylate bekannt (77). Um die Monocarbonsäureleitfähigkeit der beiden Proteine besser miteinander vergleichen zu können, wurde beispielhaft die Milchsäureleitfähigkeit von AQP9 und AQP7 auf deren jeweilige Glycerolleitfähigkeit als interner Funktionsparameter bezogen und gegen den pH-Wert aufgetragen (**Abb. 5.5**). Damit

## Diskussion

wurden die Ratenkonstanten für die Milchsäureleitfähigkeit zusätzlich von pH-abhängigen Funktionsverlusten des jeweiligen Proteins bereinigt. Das Ergebnis zeigt deutlich die Überlegenheit von AQP9 bei der Leitfähigkeit für Monocarbonsäuren.



**Abb. 5.5:** Verhältnis der Milchsäureleitfähigkeit zur Glycerolleitfähigkeit in Abhängigkeit vom pH für AQP9 (schwarz) und AQP7 (grau). Die Fehlerbalken indizieren die Extremwerte. Die Glycerolleitfähigkeit von AQP7 bei pH 3 unterschied sich nicht signifikant von der Negativkontrolle, weswegen hier kein Verhältnis berechnet werden konnte.

Wenn aber nur der Teil an protonierter Monocarbonsäure geleitet wird, der aufgrund des pH-Wertes vorliegt, wie lässt sich dann die Diskrepanz zwischen AQP9 und AQP7 erklären? Ein Vergleich der real erhaltenen pH-Profile von AQP9 mit den nach Henderson-Hasselbalch vorliegenden Anteilen an Säure resultierte für Essigsäure in kongruenten Kurvenverläufen, ergab aber für Milchsäure und  $\beta$ -Hydroxybuttersäure eine pH-Verschiebung von 0,6 bzw. 1 Einheiten ins Alkalische (4.2.3). Damit war die experimentell gemessene Leitfähigkeit höher als mit dem natürlich vorliegenden Säureanteil erklärbar. Um diese Frage näher zu adressieren, wurden die Integrale unter den pH-Profilen der Substrate für AQP9 im physiologisch relevanten Intervall von pH 5,5-7 berechnet und substratspezifischen Parametern wie  $pK_s$ , Molekulargewicht und Raumerfüllung tabellarisch gegenübergestellt (**Tab. 5.1**). Glycerol ist mit einem  $pK_s$  von 14,2 von den pH-Bedingungen des Puffers unabhängig, demzufolge ungeladen und wird am stärksten geleitet. AQP9 erreicht für Essigsäure 40 % der Glycolleitfähigkeit. Das Substrat nimmt zwar nur knapp 64 % des Volumens von Glycerol ein und sollte damit agiler sein, es unterliegt mit einem  $pK_s$  von 4,8 aber auch dem Dissoziationsgleichgewicht. Im Bereich zwischen pH 5,5-7 liegen 15-0,6 % ungeladener Säure vor. Für Milchsäure erreicht AQP9 5 % und für  $\beta$ -Hydroxybuttersäure sogar 15 % der Glycerolleitfähigkeit. Ein Vergleich der Monocarbonsäuren untereinander zeigt folgendes Phänomen: Für Milchsäure ergab sich für AQP9 ein Achtel der Essigsäureleitfähigkeit, obwohl diese zum einen 10-mal azider und damit auch der verfügbare

## Diskussion

Anteil neutraler Säure um denselben Faktor minimiert ist, und zum anderen um 46 % größer als Essigsäure ist, was zusätzlich eine Passage erschweren müsste. Der Anteil an  $\beta$ -Hydroxybuttersäure ist in diesem Bereich nur halb so groß wie der Anteil an Essigsäure und die Raumerfüllung ist zusätzlich um 76 % größer. Dennoch wird ein Drittel der Essigsäureleitfähigkeit erreicht. Auch die beobachteten Verschiebungen zwischen neutraler Monocarbonsäurefraktion und wirklicher Leitfähigkeit komplettieren dieses scheinbar widersprüchliche Verhalten. Dies kann für Milchsäure als eine vierfache ( $10^{0,6}$ ) und für  $\beta$ -Hydroxybuttersäure als eine zehnfache ( $10^1$ ) Erhöhung der Durchtrittswahrscheinlichkeit verstanden werden.

Solut	pK <sub>s</sub>	Molekulargewicht (Da)	Van der Waals Vol. (Å <sup>3</sup> )	$\Delta$ pK <sub>s</sub>	$\int k_{\text{sol}}$ pH 5,5-7 (s <sup>-1</sup> pH)
Glycerol	14,2	92	88,0	–	0,0462
Essigsäure	4,8	58	55,9	0	0,0200
Milchsäure	3,9	90	81,6	0,6	0,0024
$\beta$ -HB-säure	4,4	104	98,5	1,0	0,0072

**Tab. 5.1:** Substrateigenschaften und physiologisch relevante Leitfähigkeiten für AQP9.

Kombiniert man die Tatsache, dass physiologische pH-Werte von Säugetieren, Parasiten und Pflanzen sich in einem Bereich von 5,5-7,4 einspielen, mit der Tatsache, dass pK<sub>s</sub>-Werte von physiologischen Monocarbonsäuren im Sauren zwischen pH 3-5 liegen, wird die Notwendigkeit deutlich, die vorherrschende Spezies – das Monocarboxylat-Anion – einer genaueren Betrachtung zu unterziehen. Interessant ist in diesem Zusammenhang die große Ähnlichkeit von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen (MIPs) zu der Familie der Formiat-Nitrit-Transporter (FNTs), mikrobieller Monocarboxylattransporter, die ausschließlich in niederen Organismen vorkommen und dort speziesunterschiedlich die Passage von Monocarboxylaten wie Formiat, Acetat, Pyruvat und Laktat erlauben (157). Zwischen der Familie der FNTs und MIPs gibt es keine Sequenzhomologien und die strukturelle Verwandtschaft fiel erst durch erfolgreiche Kristallisation eines *E. coli* FNT (*E. coli* FocA) auf. FNTs bilden Homopentamere, wobei analog zu den MIPs jedes Protomer aus sechs Transmembranhelices und zwei Halbhelices aufgebaut ist und jeweils eine eigene Funktionseinheit darstellt. Die Strukturen weisen nur minimale Abweichungen im niedrigen Ångstrombereich auf, wenn man sie übereinanderlegt (158). Vergleicht man zusätzlich die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse mit dem

Mechanismus von FNTs für die Leitung von Monocarboxylaten, ergeben sich auch auf funktioneller Ebene starke Parallelen. FNTs leiten ebenfalls die protonierte Säure. Je nach Substrat wurden pH-Verschiebungen um bis zu drei Einheiten gezeigt, womit die Durchtrittswahrscheinlichkeit der Substrate sogar um ein bis zu 1.000faches erhöht ist (105).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für AQP9 eine Leitfähigkeit für Monocarboxylat-Anionen ausgeschlossen werden. Dennoch scheint die Leitfähigkeit von AQP9 für Monocarbonsäuren nicht allein auf deren  $pK_s$ -Werten zu basieren. Würde nur der Anteil an Monocarbonsäure geleitet werden, der bei gegebenen pH vorliegt, hätte sich zum einen keine Verschiebung im pH-Profil und zum anderen kein so gravierender Unterschied gegenüber dem AQP7 ergeben. Dieses Phänomen lässt sich vermutlich auf eine größenabhängige Disparität zwischen der Substratazidität in Lösung sowie deren Wechselwirkung mit der Proteinoberfläche erklären.

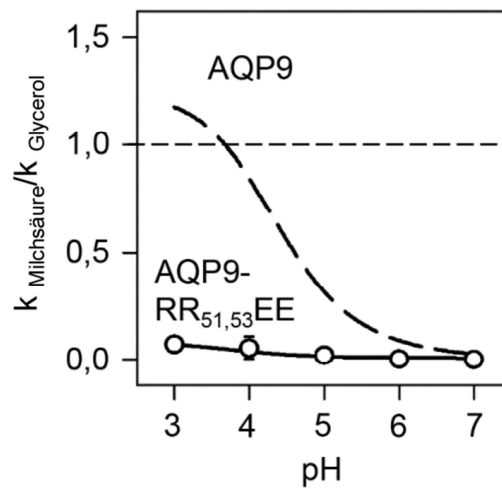
### **5.7 Die Elektrostatik von AQP9 begünstigt die Passage von Monocarbonsäuren**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Sequenzvergleiche und Berechnungen von Poisson-Boltzmann Potenzialen in der extrazellulären Schleife a von AQP9 zwei prominente Arginine an Position 51 und 53 identifiziert, die die Poreneingangsregion zieren und ein positives elektrostatisches Feld generieren (4.2.4). Die These, dass diese Arginine eine entscheidende Rolle für die Leitfähigkeit von AQP9 für Monocarbonsäuren spielen, wurde zudem experimentell untersucht.

Der Aminosäureaustausch der beiden Arginine gegen negativ geladene Glutamate in AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE führte *in silico* zu einer ähnlich negativen Elektrostatik der Oberfläche wie AQP7 und *in vitro* zu einer Reduktion der Leitfähigkeit für Essigsäure und  $\beta$ -Hydroxybuttersäure um mindestens zwei Drittel und für Milchsäure um mindestens eine Größenordnung im Vergleich zum Wildtyp-AQP9 (4.2.7). Um die Monocarbonsäureleitfähigkeit von Wildtyp-AQP9 und AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE besser miteinander vergleichen zu können, wurde beispielhaft die jeweilige Milchsäureleitfähigkeit auf deren Glycerolleitfähigkeit als interner Funktionsparameter bezogen und gegen den pH-Wert aufgetragen. Wie schon beim Vergleich mit AQP7 (5.6) zeigt sich hier die deutlich höhere Leitfähigkeit von AQP9 für Monocarbonsäuren gegenüber AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE (**Abb. 5.6.**). Die Reichweite eines elektrostatischen Feldes hängt zum einen von der Ladung und zum anderen von den dielektrischen Eigenschaften des umgebenden Mediums ab (159, 131). Unter physiologischen Bedingungen sind Proteine von wässriger Lösung umgeben. Mit einer hohen Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  von 78 hat Wasser einen feldschwächenden Effekt, sodass eine starke Ladung der Proteinoberfläche nötig ist, um das Medium zu durchdringen und mit einem

## Diskussion

Substrat in Wechselwirkung zu treten. Im AQP9-Tetramer wird diese starke Ladung vermutlich durch acht Arginine erreicht, die sich in der Poreneingangsregion konzentrieren.



**Abb. 5.6:** Verhältnis der Milchsäureleitfähigkeit zur Glycerolleitfähigkeit in Abhängigkeit vom pH für AQP9 (gestrichelte Linie) und AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE (offene Kreise, durchgezogene Linie). Die Fehlerbalken indizieren die Extremwerte.

In wieweit ein solches elektrostatisches Feld das Medium zu durchdringen vermag, darf nicht unterschätzt werden. Es gibt einige Beispiele, die die Relevanz von Oberflächenladungen zeigen. So führt bei dem Enzym Chymotrypsin C (CTRC) eine Konzentration positiver Ladung in Nähe der Bindestelle zu einer beschleunigten Rate von Zusammenstößen mit Substratmolekülen durch elektrostatische Interaktion mit deren negativen polyaziden Sequenzenabschnitten (131, 132). Die Hepatitis C Virus NS3 Protease zeigt ebenfalls eine Ansammlung positiver Ladung um die Region der Bindetasche, die die Annäherung und Assoziation des Substrates durch dessen negative Bereiche erleichtert (160). Bei der Acetylcholin-Esterase führt das durch sechs negative Carboxylgruppen von Aspartaten und Glutamaten generierte elektrostatische Feld das Substrat Acetylcholin in die Bindetasche. Eine Mutante, deren Glutamate und Aspartate in dieser Region gegen neutrale Aminosäuren ausgetauscht wurden, zeigte trotz unveränderter Konformation des katalytischen Zentrums eine 13fach reduzierte katalytische Aktivität ( $k_{cat}/k_m$ ) (161). Die Mutante AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE weist Analogien auf. Hier wurde nicht nur die positive Ladung neutralisiert, sondern in eine negative Ladung umgewandelt, die vielmehr noch zu einer Abstoßung des Substrates durch das Protein führt und dessen Leitfähigkeit senkt. Bei allen genannten Beispielpoteinen handelt es sich um Enzyme, die mit Ausnahme der Acetylcholin-Esterase in Wechselwirkung mit anderen Proteinen treten, die relativ große Interaktionsflächen präsentieren. Wie verhält es sich aber bei Kanälen, deren Solute vor allem kleine Substratmoleküle sind? Kaliumkanäle bilden ähnlich wie

## Diskussion

Aquaporine Tetramere mit vier identischen Monomeren als eigene Funktionseinheit in der Plasmamembran und die Passage von Kaliumionen durch ihre lange und enge Kanalpore erfolgt einzeln hintereinander angeordnet. Die Poreneingangsregionen sind bei Kaliumkanälen sowohl auf extrazellulärer als auch auf cytoplasmatischer Seite mit negativ geladenen Aminosäureresten gespickt, die die lokale Konzentration an Kationen erhöhen und gleichzeitig die Konzentration an Anionen senken (44). Im wasser- und ammoniakleitenden pflanzlichen *Arabidopsis thaliana* Aquaporin AtTIP2;1 in der Vakuolenmembran erzeugen die Säurefunktionen dreier Aspartate eine negative Ladung an der Oberfläche. Dadurch bedingt konnte in *molecular dynamics* Modellen eine Anreicherung von Ammoniumionen an der Oberfläche simuliert werden (162).

Eine negative Oberflächenelektrostatik ist ein konserviertes Merkmal der pflanzlichen Aquaporine der *tonoplast intrinsic protein* (TIP) Superfamilie und erlaubt wahrscheinlich eine effiziente Aufrechterhaltung des Ammoniumhaushaltes der Vakuole (162). Warum sollte dann nicht auch eine positive Oberflächenelektrostatik der gemeinsame Nenner verschiedener Aquaporinvertreter sein, die im Zusammenhang mit Monocarbonsäureleitfähigkeit beschrieben wurden? Im Rahmen dieser Arbeit wurden ergänzend Sequenzvergleiche der unter 1.3 beschriebenen LpGlpF1, LpGlpF4, SmAQP und AtNIP2;1 mit AQP9 durchgeführt. Die aufgeführten Aquaglyceroporine zeigen als gemeinsames Muster die Anwesenheit positiver Aminosäuren in der extrazellulären Schleife a an den betreffenden Positionen, die im AQP9 die Arginine51 und 53 einnehmen. In AQP7 wird diese Position hingegen durch ein negatives Glutamat eingenommen (**Abb. 5.7**). An diesem Muster zeigt sich, wie auch über verschiedene Spezies hinweg die elektrostatische Architektur von Aquaglyceroporinen deren Solutspektrum bedingen kann.

		... TM1	loop A	TM2...	
		<i>eeeeee</i>	<i>eeeeee</i>	<i>eeeeee</i>	
MmAQP7	29	LGSVA <b>H</b> ...	MVLG <b>E</b> NSGSYLGVNLG		50
AtNIP2;1	65	CAAI <b>A</b> V...	NAQ <b>H</b> N <b>H</b> VVTLVGI <b>A</b> VV		86
LpGlpF1	20	VG <b>V</b> H <b>C</b> SS.VL <b>K</b> GT <b>K</b> Y <b>R</b> G <b>S</b> G <b>H</b> I <b>F</b> A <b>I</b> T <b>T</b>			44
LpGlpF4	20	VG <b>V</b> H <b>C</b> SS.VL <b>K</b> GT <b>K</b> Y <b>R</b> G <b>S</b> G <b>H</b> I <b>F</b> A <b>I</b> T <b>T</b>			44
SmAQP	45	SGVLAQ <b>V</b> ILG <b>D</b> H <b>G</b> K <b>H</b> A <b>H</b> GTFISVSLG			70
HsAQP9	41	CGCVAQA...	ILS <b>R</b> G <b>R</b> FGGVITINVG		63
			▲ ▲		

**Abb. 5.7:** Ausschnitt aus dem Sequenzalignment von murinem AQP7, humanem AQP9 und literaturbeschriebener Aquaglyceroporine mit Milchsäureleitfähigkeit: AtNIP2;1, LpGlpF1 und 4, und SmAQP. Dargestellt ist die die Transmembranspannen 1 und 2 verbindende extrazelluläre Schleife a. Geladene Aminosäuren sind in rot (Säuren) und blau (Basen) dargestellt. AQP9-R<sub>51</sub> und R<sub>53</sub> sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Das Alignment wurde von Eric Beitz mit TeXshade (91) erstellt.



## Diskussion

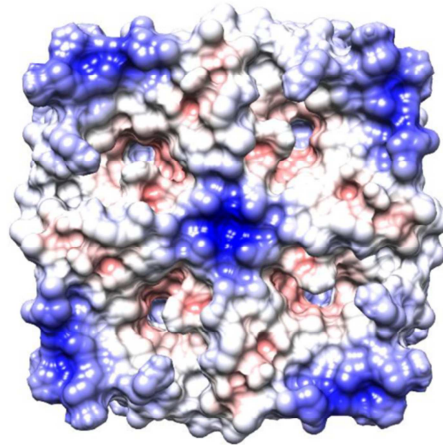
Im Zusammenhang mit der Proteinelektrostatik ist die Beobachtung passend, dass AQP7 ein Substrat der Metalloproteinase Meprin  $\beta$  darstellt und AQP9 nicht (4.2.8). Für Meprin  $\beta$  ist aus der Literatur eine Präferenz für Substrate mit negativ geladenen Aminosäuren wie Aspartat und Glutamat bekannt, die mit einer konservierten positiven Ladung im aktiven Zentrum der Protease interagieren können (163). Meprin  $\beta$  ist eine membrangebundene Protease, die von extrazellulärer Seite die Ektodomänen anderer Transmembranproteine schneidet, selbst aber auch durch andere Proteasen von der Oberfläche geschnitten werden kann und als lösliches Enzym agiert (108, 164). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Stopped-Flow Experimenten wurde bereits aktiviertes lösliches Meprin  $\beta$  zu den Protoplasten gegeben. Damit wird für die Betrachtung nur der Teil von AQP7 und AQP9 relevant, der in den Extrazellulärraum ragt. Das in AQP7 an der Oberfläche exponierte Glutamat mittig der extrazellulären Schleife a könnte eine Erklärung dafür sein, warum dieses im Gegensatz zu AQP9 – bei dem die Akkumulation positiver Ladung die Bindung des Enzyms eher verhindert könnte – von Meprin  $\beta$  geschnitten wird. Ob dies physiologische Relevanz hat oder AQP7 nur zufällig ins Substratspektrum von Meprin  $\beta$  fällt, ist nicht klar. Erstaunlich ist, dass es in den Messungen im Hefemodell nicht zu einem Funktionsverlust, sondern zu einer Zunahme des Glyceroleinstroms kam. Dies ist als letztes Aufflackern vor der endgültigen Degradation des Proteins interpretierbar. Einen größeren Erkenntnisgewinn würde eine Untersuchung im Zielgewebe bringen.

## 5.8 Der Weg von Monocarbonsäuren durch AQP9

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenladung von Aquaglyceroporinen eine entscheidende Rolle bei der Anziehung und Abstoßung von Anionen schwacher Monocarbonsäuren spielt. In AQP7 und AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE verhindert das negative Feld gleichermaßen eine Annäherung des Monocarboxylates, was sich in niedrigen Ratenkonstanten widerspiegelt. Die negative Oberflächenladung in Kombination mit der durch die NPA-Region und den ar/R-Selektivitätsfilter erzeugten positiven Barriere könnte als doppeltes Filterprinzip gegen geladene Moleküle im Allgemeinen interpretiert werden. Die Oberfläche als erste Etage des Filters verhindert eine Annäherung von Anionen, während die Konstriktionsstellen als zweite Etage die Passage von Kationen unterbindet. Im Kontrast dazu sorgen in AQP9 die positive Ladung der Oberfläche durch die Arginine an Position 51 und 53 vermutlich dafür, dass Anionen aus dem Umgebungsmedium in dem Maße angezogen werden, dass sich ihre Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Poreneingangsregion um bis zu eine Größenordnung erhöht. Die Protonierung des Monocarboxylates erfolgt durch das Lösungsmittel und das in einem solchen Ausmaß, wie es das Dissoziationsgleichgewicht zulässt. Allein die günstige Lage der neutralen Monocarbonsäure würde somit den Durchtritt derselben durch AQP9 begünstigen und zu höheren Ratenkonstanten im Vergleich zum negativ geladenen AQP7 führen. Man könnte zusätzlich spekulieren, dass die unebene Oberflächenstruktur von AQP9 mit den acht Argininen, die wie Ausläufer ins Bulkwasser ragen, potenzielle Substrate kesselartig gefangen halten. Ein Vergleich mit den strukturell verwandten FNTs offenbart starke Parallelen im Aufnahmemechanismus von Monocarbonsäuren (158). Analog zu den Argininen an Position 51 und 53 in AQP9 wird in FNTs das Substratanion durch ein positiv geladenes Lysin angezogen. Dadurch wird dieses in ein vorwiegend hydrophobes Vestibül des FNTs und damit eine Umgebung mit niedrigerer Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  geschleust (106). Folglich sinkt die Substratazidität, sodass eine Protonierung durch das Bulkwasser und damit eine Passage der neutralen Säure durch die lipophilen Konstriktionsstellen begünstigt wird (106). Es lässt sich festhalten, dass AQP9 durch die positive elektrostatische Architektur innerhalb der Aquaglyceroporine eine hervorragende Leitfähigkeit für Monocarbonsäuren aufweist, aber in schwächerer Ausprägung als die auf Monocarbonsäuren spezialisierten FNTs. Dieser Unterschied spiegelt sich in der um zwei Größenordnungen kleineren Verschiebung des pH-Profiles gegenüber den FNTs wieder (105). Der zugrunde liegende Mechanismus der Leitung von Monocarbonsäuren durch AQP9 und FNTs ist jedoch auffallend ähnlich.

## 5.9 Ist die Monocarbonsäureleitfähigkeit von AQP9 physiologisch relevant?

Die Passage von Monocarboxylaten wie Pyruvat, Laktat, Acetat und Ketonkörpern über Biomembranen spielt eine entscheidende Rolle im Kohlenhydrat-, Fett-, und Aminosäurestoffwechsel lebender Zellen (165). Es gibt drei Proteinfamilien, die den Monocarboxylattransport in verschiedenen Spezies bewerkstelligen. Zum einen die kanalähnlichen FNTs, die ausschließlich in Mikroben und niederen Organismen wie Bakterien, Archaeobakterien, Pilzen und Protozoen vorkommen (165). Des Weiteren die spezialisierten protonen-gekoppelten Monocarboxylattransporter (MCTs), die in Säugetieren mit hoher Kapazität große Mengen im Metabolismus anfallender Monocarboxylate über Membranen schleusen (165, 166). Zuletzt einige Vertreter der Aquaglyceroporine, deren Monocarboxylatleitfähigkeit kein Merkmal der ganzen Proteinfamilie darstellt, sondern als Zusatzfunktion betrachtet werden könnte. Anders als MCTs und FNTs sind Aquaglyceroporine nicht ausschließlich auf Monocarbonsäuren spezialisiert und der Passagemechanismus ist eher passiver Natur (69). Dennoch scheinen sie in Organismen, denen es an spezialisierten Monocarboxylattransportern fehlt, deren Funktion übernommen zu haben, wie im Beispiel des SmAQP aus dem Pärchenegel oder LpGlpF4 aus dem Milchsäurebakterium *Lactobacillus plantarum* (73, 72). Wie sieht es allerdings mit der Relevanz von AQP9 aus, wenn man die gleichzeitige Anwesenheit der besser spezialisierten MCTs in Säugern berücksichtigt? AQP9 befindet sich hauptsächlich in der Plasmamembran von metabolisch aktiven Hepatozyten (1.3.1), wo außerdem eine Vielzahl von Monocarboxylattransportern den Im- und Export von Monocarboxylaten gewährleistet (165). Ketonkörper wie  $\beta$ -Hydroxybutyrat werden beispielsweise exportiert, damit diese in ihren Zielgeweben wie Muskelzellen und Gehirn für den Energiemetabolismus verwendet werden können (165). An dieser Stelle stellt sich zusätzlich die Frage der Direktionalität der Monocarbonsäureleitfähigkeit von AQP9. Aquaporine fungieren als passive Kanäle, die von ihren Soluten von beiden Seiten passiert werden können – entscheidend ist einzig der vorliegende Gradient (1.1.2). Im Rahmen dieser Arbeit wurde in hypertonen Stopped-Flow Messungen der Einstrom von Monocarbonsäuren in die Zelle unter Berücksichtigung der Oberflächenelektrostatik auf periplasmatischer Seite evaluiert. Die Berechnung der Poisson-Boltzmann Elektrostatik von AQP9 auf zytosolischer Seite zeigt ein deutlich schwächeres positives Profil und eine diffuse Verteilung der Ladung über die gesamte Oberfläche. Die Poreneingangsregion ist sogar leicht negativ (**Abb. 5.8**). Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass eventuell nur der Einstrom von Monocarbonsäuren in die Zellen physiologisch relevant sein könnte. Dies müsste allerdings noch experimentell geprüft werden.



AQP9 (zytoplasmatische Seite)

**Abb. 5.8:** Darstellung des Poisson-Boltzmann Potential von AQP9 auf zytoplasmatischer Seite in der Aufsicht auf das Tetramer. Das Modell basiert auf der *E. coli* GlpF Kristallstruktur (PDB#1FX8).

Auf Grundlage dieser Annahme wäre AQP9 in Hepatozyten den MCTs in dem Sinne unterlegen, dass es nur eine Transportrichtung in ausreichender Geschwindigkeit bedienen kann. Außerdem wird die Funktion von AQP9 in der Leber hauptsächlich dafür benötigt in hohem Maße Glycerol aus dem Blut in die Zellen zu leiten und damit für die Gluconeogenese bereitzustellen und Harnstoff auszuschleusen (1.3.1). Allerdings hat die Auswertung der Integrale in einem pH-Intervall von 5,5-7 (S. 105)  $\beta$ -Hydroxybuttersäure als Substrat mit einer möglichen Relevanz ergeben. Das Gehirn verwertet  $\beta$ -Hydroxybutyrat zum Teil zur Energiegewinnung. Vor allem in Zeiten der Nahrungskarenz, wo Ketonkörper vermehrt von der Leber gebildet werden, wird  $\beta$ -Hydroxybutyrat in erhöhtem Maße als Alternative zum Hauptenergielieferanten Glucose verwertet. Eine Rolle von AQP9 im Energiemetabolismus des Gehirns wäre durchaus denkbar (80). Auch für Milchsäure – das quantitativ bedeutendste Monocarboxylat im Säuger (165) – zeigte die Auswertung der Integrale in einem pH-Intervall von 5,5-7 eine beträchtliche Leitfähigkeit (**Tab. 5.1**). Es gibt Spekulationen darüber, dass AQP9 zu einer Neuroprotektion beitragen könnte, indem es im Falle einer Gehirnschämie den Extrazellularraum von anfallendem Laktat durch Aufnahme in die Astrozyten klärt (167). In einem Stressszenario wie einer Ischämie, bei der akkumulierendes Laktat zu Einbrüchen des physiologischen Milieus im Gehirn auf pH-Werte bis 5,5 führt (167), wäre der Gradient stark genug, dass das AQP9 in einem beträchtlichen Ausmaß Milchsäure in die Zellen leiten könnte und die Funktion der MCTs ergänzt, wenn deren Kapazität erschöpft ist.

### **5.10 Aquaglyceroporine: einfache Glyceroporen? – ein Fazit**

Die Funktion von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen als Kanalproteine für Wasser und ungeladene Solute ist lange bekannt. Seit ihrer Entdeckung wurden stetig neue Substanzen gefunden, die in der Lage sind, die Kanalpore zu überwinden. Wenn man weitersucht, wird es wohl auch immer wieder neue Substanzen geben, die in die Selektionsschablone von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen passen. Denn der Ausschluss positiver Ladung steht bei dieser Familie von Kanalproteinen weit über der Feinselektion zwischen strukturell ähnlichen neutralen Verbindungen. So lag der Fokus der Forschung lange auf der Aufklärung des Selektivitätsfilters als elektrostatischer Barriere. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Elektrostatik auch an der Proteinoberfläche eine entscheidende Rolle spielt und es Aquaglyceroporine gibt, die sich nicht auf ihre Rolle als „Einfache Glyceroporen“ reduzieren lassen. So führt die positive Oberflächenelektrostatik von AQP9 dazu, dass Monocarbonsäuren trotz kleiner Gradienten in einem Ausmaß geleitet werden können, welches eine physiologische Relevanz des passiven Kanalproteins neben den spezialisierten MCTs verspricht. In TbAQP2 führt eine elektrostatische Interaktion dazu, dass Pentamidin als Inhibitor mit nanomolarer Affinität bindet und vieles spricht dafür, dass das Aquaglyceroporin als Rezeptor fungiert, der den Arzneistoff als endozytotisches Shuttle in die Zelle schleust. Und zuletzt – ob physiologische Relevanz oder Zufall – gerät AQP7 wohl durch das negative Oberflächenlayout unter das Messer der Protease Meprin  $\beta$ .

## 6 Ausblick

Auf Grundlage der Ergebnisse ergeben sich noch weitere Fragestellungen, die einer genaueren Evaluierung bedürfen:

Unter dem übergeordneten Aspekt der Elektrostatik von Aquaglyceroporinen wäre es interessant zu klären, ob die negative Oberflächenladung von TbAQP2 zusätzlich einen Einfluss auf die Anziehung von Pentamidin und damit auf die mittlere inhibitorische Konzentration hat. Dies könnte in Form von Punktmutationen an den relevanten Positionen der extrazellulären Schleife und einer biophysikalischen Evaluierung in der Stopped-Flow Apparatur erfolgen. Des Weiteren könnte ergänzend zu der pentamidinresistenten Mutante TbAQP2-L<sub>264</sub>R durch gezielte Punktmutationen an einem nicht pentamidinhemmbaren Aquaglyceroporin wie TbAQP3 der Versuch unternommen werden, Sensitivität herzustellen, um noch robustere Ergebnisse zum Bindemodus zu erhalten. TbAQP3-R<sub>256</sub>L wäre eine potenzielle Variante. Es gilt aber auch zu bedenken, dass die Restriktionsstelle in diesem Protein zusätzlich enger gestaltet ist, was auch den Austausch des Tryptophan an Position 102 und Tyrosin an Position 250 gegen kleinere aliphatische Aminosäuren notwendig machen könnte, damit Pentamidin binden kann. Um das Thema abzurunden, ist es erstrebenswert, die postulierte rezeptorvermittelte Endozytose als Aufnahmemechanismus zu beweisen. Nachdem die Trypanosomenkulturen PEG-*Quantum-Dot*-gekoppeltes Pentamidin nicht tolerierten, würde eine Kopplung mit Goldpartikeln eine Alternative darstellen, um den Prozess mit einem Rasterelektronenmikroskop zu visualisieren.

Für AQP9 wäre es sinnvoll zu zeigen, wie sich eine neutrale Proteinoberfläche auf die Leitfähigkeit von Monocarbonsäuren auswirkt, da die Mutante AQP9-RR<sub>51,53</sub>EE eher harsche Bedingungen im Sinne einer elektrostatischen Abstoßung generiert. Da die neutrale Mutante AQP9-RR<sub>51,53</sub>AA leider keine Funktionalität zeigte, könnte als Alternative über AQP9-R<sub>51</sub>A eine Abschwächung der positiven Ladung und über AQP9-R<sub>53</sub>E Neutralität erreicht werden. Interessant wäre auch durch einen gezielten Aminosäureaustausch des Glutamat<sub>39</sub> in der extrazellulären Schleife von AQP7 gegen eine positiv geladene Aminosäure die Situation von AQP9 zu imitieren und die Mutante auf ihre Leitfähigkeit für Monocarbonsäuren hin zu untersuchen. Zusätzlich könnte das gefundene Muster einer Anhäufung positiver Ladung in der extrazellulären Schleife a als Vorhersage-Tool eingesetzt werden. Durch Vergleiche einer Vielzahl in den Datenbanken gelisteter Aquaporinsequenzen wäre es möglich anhand des

## Ausblick

Musters weitere Vertreter mit potenzieller Monocarbonsäureleitfähigkeit zu identifizieren und mit diesen gezielte Funktionsuntersuchungen durchzuführen.

Zudem müsste die Rolle von AQP7 als Substrat der Protease Meprin  $\beta$  durch weitere Experimente abgeklärt werden. Hierzu würde sich der Western Blot als Methode anbieten. Könnten nach Behandlung von Protoplasten AQP7 bildender Hefezellen mit Meprin  $\beta$  Fragmente des unbehandelten AQP7 detektiert werden, wäre dies ein starker Hinweis auf enzymatische Spaltung des Aquaglyceroporins. Zuletzt bedarf es noch der Klärung, ob die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse von physiologischer Relevanz sind. Zu diesem Zweck würde sich eine Perfusionsstudie mit Mäusedarm und radioaktiv markiertem Glycerol anbieten. Unterschiede in den Aufnahmeraten von radioaktiv markiertem Glycerol des aufgespannten Darms von Wildtyp-Mäusen und Meprin- $\beta$ -*knockout*-Mäusen würde auf eine physiologische Relevanz der Enzym-Substrat-Beziehung zwischen Meprin  $\beta$  und AQP7 hinweisen.

## 7 Zusammenfassung

In Aquaporinen und Aquaglyceroporinen wird ein strenger Ausschluss von Kationen durch ein Zusammenspiel des ar/R-Selektivitätsfilters und der NPA-Region gewährleistet, die eine positive Barriere aufbauen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Leitfähigkeit des *T. brucei* AQP2 (TbAQP2) für Pentamidin als organisches Kation und des humanen AQP9 (AQP9) für Monocarboxylate als organische Anionen untersucht.

Die Filterregion in TbAQP2 ist unkonventionell. Anstelle des konservierten positiv geladenen Arginins befindet sich im ar/R-Selektivitätsfilter an Position 264 ein Leucin, welches dafür sorgt, dass das benachbarte Aspartat<sup>265</sup> für eine Wechselwirkung freisteht. Stopped-Flow Messungen zeigten, dass die Solute 3-Amino-1,2-propandiol und Formamidin, die aufgrund ihrer Größe die Kanalpore von TbAQP2 überwinden könnten, allein aufgrund ihrer Ladung ausgeschlossen wurden und damit eine Passage des 340 Da großen und zweifach positiven Pentamidins unwahrscheinlich ist. Vielmehr handelt es sich bei Pentamidin um einen nanomolaren Inhibitor der Glycerolleitfähigkeit von TbAQP2 mit einem IC<sub>50</sub> von 130 nM. Strukturvariationen von Pentamidin zeigten, dass mindestens eine Amidinfunktion für die Interaktion benötigt wird und beide Phenylgruppen und die Mittelkette essentiell sind, um Wasser abzuschirmen und eine hohe Affinität zu erhalten. Das Aspartat<sup>265</sup> wurde als essentielle Aminosäure identifiziert, die mit der Amidinfunktion des Pentamidins eine elektrostatische Wechselwirkung eingeht. TbAQP2 ist vor allem in der Flagellenregion von Trypanosomen lokalisiert, die durch eine hohe Rate an Membranstülpungen charakterisiert ist. Eine über TbAQP2 rezeptorvermittelte Endozytose als Aufnahmemechanismus für Pentamidin in die Trypanosomen ist denkbar.

AQP9 zeigt keine Auffälligkeiten im Layout des ar/R-Selektivitätsfilters, hingegen ein ungewöhnlich breites Solutspektrum, u.a. auch für Monocarbonsäuren/Monocarboxylate. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Leitfähigkeitsmessungen an der Stopped-Flow Apparatur gezeigt, dass die passierende Spezies die neutrale Säure, d.h. die untersuchte Essigsäure, Milchsäure und  $\beta$ -Hydroxybuttersäure, und nicht das Anion ist. Die Milchsäureleitfähigkeit von AQP9 blieb zudem vom Protonophor DNP unbeeinflusst, womit eine Abhängigkeit vom Protonengradienten ausgeschlossen wurde. Das murine AQP7 (AQP7) wies trotz einer deutlich höheren Glycerolleitfähigkeit nur einen Bruchteil der Monocarbonsäureleitfähigkeit von AQP9 auf, was nach Betrachtungen der Poisson-Boltzmann Potentiale auf die unterschiedliche Ladungsverteilung an der Oberfläche der beiden Aquaglyceroporine zurückgeführt wurde – war AQP9 positiv geladen, zeigte sich AQP7 stark negativ. In AQP9 wurden zwei positiv geladene, die Poreneingangsregion flankierende Arginine an Position 51 und 53 in der



## Zusammenfassung

Poreneingangsregion als für die Monocarbonsäureleitfähigkeit essentielle Aminosäuren identifiziert. Diese sorgen vermutlich dafür, dass AQP9 Monocarbonsäuren mit 4-10-mal höherer Wahrscheinlichkeit leitet als über den bei gegebenen pH vorliegendem Säureanteil erklärbar. Auf Grundlage der Ergebnisse ist als Aufnahmemechanismus von AQP9 für Monocarbonsäuren eine Anziehung des Monocarboxylat-Anions, damit eine erhöhte Aufenthaltswahrscheinlichkeit dessen, gefolgt von einer Protonierung aus dem Lösungsmittel und einer Passage der neutralen Säure wahrscheinlich. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Elektrostatik von Aquaglyceroporinen einen entscheidenden Einfluss auf ihre Funktion hat. So führt eine positive Elektrostatik in AQP9 dazu, dass es zu einer hohen Leitfähigkeit von Monocarbonsäuren kommt und in TbAQP2 ist es eine elektrostatische Interaktion mit der Carboxylgruppe einer einzelnen Aminosäure, die einen großen Beitrag zur nanomolaren Affinität von Pentamidin leistet.

## 8 Summary

In aquaporins and aquaglyceroporins, the ar/R-selectivity filter and NPA-region form a positive electrostatic barrier that strictly excludes cations. In this thesis the conductivity of *T. brucei* AQP2 (TbAQP2) for the positively charged pentamidine and of human AQP9 (AQP9) for negatively charged monocarboxylates was evaluated.

The canonical amino acid composition of the AQP selectivity filter is an arginine in an aromatic environment (ar/R). TbAQP2, however, carries a Leu264 instead of arginine exposing an Asp265 to the channel lumen. Stopped-flow measurements with 3-amino-1,2-propandiole and formamidine showed the selectivity filter is functional and excludes cations despite its unconventional layout. Both substrates could theoretically pass because of their size not being larger than glycerol and urea, respectively, but are detained due to their positive charge. The dicationic, 340 Da seized pentamidine is not a permeant but a nanomolar inhibitor of TbAQP2's glycerol permeability in yeast with an  $IC_{50}$  of 130 nM. Evaluation of the structure-activity relationship revealed at least one benzamidine moiety being crucial for interaction and showed the importance of a long aliphatic chain for lipophilic shielding of water. The Asp265 was found to be responsible for the electrostatic interaction with the amidine moiety of pentamidine. TbAQP2 is predominantly localized in the trypanosomal flagellar pocket where high rates of membrane turnover occur and drug-uptake via receptor-mediated endocytosis with TbAQP2 serving as the receptor might be a plausible mechanism.

In AQP9, the selectivity filter is inconspicuous but the protein shows conductance for a remarkable variety of solutes including monocarboxylic acids/monocarboxylate. Stopped-flow measurements in the framework of this thesis revealed that the neutral acid, i.e. lactic acid, acetic acid and  $\beta$ -hydroxybutyric acid, is the channeled species. Addition of the protonophor DNP left lactic acid permeability of AQP9 unaltered indicating independency of the proton gradient. Murine AQP7 very low functionality regarding monocarboxylic acids despite higher rates for glycerol influx. Computations of Poisson-Boltzmann electrostatics showed major differences in surface potentials with AQP9 being positively and AQP7 negatively charged. Two arginines at positions 51 and 53 in loop a of AQP9 were found to be crucial for 4-10 times higher conductance of AQP9 for monocarboxylic acids than given by the fraction at a certain pH. The postulated mechanism of AQP9 channeling monocarboxylic acids bases on attraction of the monocarboxylate anion leading to a higher probability of protonation via the solvent depending on pH and  $pK_s$  followed by a passage of the neutral acid. TbAQP2 and AQP9 both represent examples for the influence of protein electrostatics on solute selectivity of aquaglyceroporins.

## 9 Literaturverzeichnis

1. Tan, S., Tan, H. T., and Chung, M. C. M. (2008) Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics* **8**, 3924–3932
2. Cooper, G. M., and Hausman, R. E. (op. 2013) *The cell: A molecular approach*, 6th Ed., Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
3. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., and Tschesche, H. (1998) *Prinzipien der Biochemie*, 2nd Ed., Spektrum Akad. Verl., Heidelberg
4. Lodish, H. F. (2000) *Molecular cell biology*, 4th Ed., W.H. Freeman, New York
5. Hays, R. M., Franki, N., and Soberman, R. (1971) Activation energy for water diffusion across the toad bladder: evidence against the pore enlargement hypothesis. *J. Clin. Invest.* **50**, 1016–1018
6. Solomon, A. K. Characterization of Biological Membranes by Equivalent Pores. *J. Gen. Physiol.*, 335–364
7. Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggins, W. B., Agre, P. (1992) Appearance of Water Channels in *Xenopus* Oocytes Expressing Red Cell CHIP28 Protein. *Science*, 385–387
8. Essig, A., and Caplan, S. R. (1989) Water movement: does thermodynamic interpretation distort reality? *The American Physiological Society*, 694–698
9. Gupta, A. B., Verma, R. K., Agarwal, V., Vajpai, M., Bansal, V., and Sankararamkrishnan, R. (2012) MIPModDB: a central resource for the superfamily of major intrinsic proteins. *Nucleic Acids Research* **40**, D362-9
10. Zardoya, R. (2005) Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol. Cell* **97**, 397–414
11. Pavlovic-Djuranovic, S., Schultz, J. E., and Beitz, E. (2003) A single aquaporin gene encodes a water/glycerol/urea facilitator in *Toxoplasma gondii* with similarity to plant tonoplast intrinsic proteins 1. *FEBS Letters* **555**, 500–504
12. Beitz, E., Pavlovic-Djuranovic, S., Yasui, M., Agre, P., and Schultz, J. E. (2004) Molecular dissection of water and glycerol permeability of the aquaglyceroporin from *Plasmodium falciparum* by mutational analysis. *PNAS* **101**, 1153–1158
13. Uzcategui, N. L., Szallies, A., Pavlovic-Djuranovic, S., Palmada, M., Figarella, K., Boehmer, C., Lang, F., Beitz, E., and Duszenko, M. (2004) Cloning, heterologous expression, and characterization of three aquaglyceroporins from *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **279**, 42669–42676
14. Borgnia, M., Nielsen, S., Engel, A., and Agre, P. (1999) Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 425–458
15. Nakhoul, L. N., Davis, B. A., Romero, M. F., Boron, W. F. (1998) Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO<sub>2</sub> permeability of *Xenopus* Oocytes. *The American Physiological Society*, 543–548
16. Bienert, G. P., Moller, A. L. B., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Moller, I. M., Schjoerring, J. K., and Jahn, T. P. (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* **282**, 1183–1192
17. Almasalmeh, A., Krenc, D., Wu, B., and Beitz, E. (2014) Structural determinants of the hydrogen peroxide permeability of aquaporins. *The FEBS journal* **281**, 647–656

## Literaturverzeichnis

18. Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J. M., Mukhopadhyay, R., Agre, P., and Rosen, B. P. (2002) Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *PNAS* **99**, 6053–6058
19. Meng, Y.-L., Liu, Z., and Rosen, B. P. (2004) As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**, 18334–18341
20. Gonen, T., Sliz, P., Kistler, J., Cheng, Y., Walz, T. (2004) Aquaporin-0 membrane junctions reveal the structure of a closed water pore. *Nature* **429**, 193–197
21. Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, B., Engel, B., Fujiyoshi, Y. (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* **407**, 599–605
22. , G., Cheng, A., Reddy, V., Melnyk, P., and Mitra, A. K. (2000) Three-dimensional fold of the human AQP1 water channel determined at 4 Å resolution by electron crystallography of two-dimensional crystals embedded in ice. *J. Mol. Biol.* **301**, 369–387
23. Ho, J. D., Yeh, R., Sandstrom, A., Chorny, I., Harries, W. E. C., Robbins, R. A., Miercke, L. J. W., and Stroud, R. M. (2009) Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 Å and its mechanism of conductance. *PNAS* **106**, 7437–7442
24. Fu, D., Libson, A., Miercke, L. J. W., Weitzmann C., Nollert P., Krucinski J., Stroud R. M. (2000) Structure of a Glycerol Conducting Channel and the Basis for Its Selectivity. *Science* **290**, 481–486
25. Savage, D. F., Egea, P. F., Robles-Colmenares, Y., O'Connell, J. D. 3., and Stroud, R. M. (2003) Architecture and selectivity in aquaporins: 2.5 Å X-ray structure of aquaporin Z. *PLoS Biol.* **1**, E72
26. Geyer, R. R., Musa-Aziz, R., Qin, X., and Boron, W. F. (2013) Relative CO<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> selectivities of mammalian aquaporins 0-9. *AJP Cell Physiol.* **304**, C985-94
27. Preston, G. M., Jung, J. S., Guggino, W. B., and Agre, P. (1994) Membrane Topology of Aquaporin CHIP Analysis of functional Epitope-Scanning Mutants by vectorial Proteolysis\*. *J. Biol. Chem.* **269**, 1668–1673
28. Pao, G. M., Wu, L.-F., Johnson, K. D., Höfte, H., Chrispeels, M. J., Sweet, G., Sandal, N. N., and Saier, M. H. (1991) Evolution of the MIP family of integral membrane transport proteins. *Mol. Microbiol.* **5**, 33–37
29. Verkman, A. S., Anderson, M. O., and Papadopoulos, M. C. (2014) Aquaporins: important but elusive drug targets. *Nature reviews. Drug discovery* **13**, 259–277
30. Wang, Y., Schulten, K., and Tajkhorshid, E. (2005) What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF. *Structure (1993)* **13**, 1107–1118
31. Wu, B., and Beitz, E. (2007) Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. *CMLS* **64**, 2413–2421
32. Stroud, R. M., Miercke, L. J. W., O'Connell, J., Khademi, S., Lee, J. K., Remis, J., Harries, W., Robles, Y., and Akhavan, D. (2003) Glycerol facilitator GlpF and the associated aquaporin family of channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 424–431
33. Sui, H., Han, B. G., Lee, J. K., Walian, P., and Jap, B. K. (2001) Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* **414**, 872–878
34. Wu, B., Steinbronn, C., Alsterfjord, M., Zeuthen, T., and Beitz, E. (2009) Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel. *The EMBO journal* **28**, 2188–2194
35. Groot, B. L. de, and Grubmüller, H. (2001) Water Permeation across Biological Membranes: Mechanism and Dynamics of Aquaporin-1 and GlpF. *Science* **294**, 2353–2357
36. Eisenberg, D., and Kauzmann, W. (1969) The Structure and Properties of Water. *Science* **166**, 861
37. Bernal, J. D., and Fowler, R. H. (1933) A Theory of Water and Ionic Solution, with Particular Reference to Hydrogen and Hydroxyl Ions. *J. Chem. Physics* **1**, 515–548

38. Heller, K. B., Lin, E., and Wilson Hastings, T. Substrate Specificity and Transport Properties of the Glycerol Facilitator of Escherichia Coli. *J. Bacteriol.* **144**, 274–278
39. Beitz, E., Gollmack, A., Rothert, M., and Bulow, J. von (2015) Challenges and achievements in the therapeutic modulation of aquaporin functionality. *Pharmacology & Therapeutics* **155**, 22–35
40. Denker, B. M., Smith, B. L., Kuhajda, F. P., and Agre, P. (1988) Identification, Purification, and Partial Characterization of a Novel Mr 28,000 Integral Membrane Protein from Erythrocytes and Renal Tubules. *J. Biol. Chem.* **263**, 15634–15642
41. Beitz, E., and Agre, P. (2009) *Aquaporins*, Springer, Berlin
42. Kart, A., and Bilgili, A. (2008) Ionophore Antibiotics: Toxicity, Mode of Action and Neurotoxic Aspect of Carboxylic Ionophores. *J. Animal Veterinary Adv.* **7**, 748–751
43. Pomès, R., Roux, B. (1996) Structure and dynamics of a proton wire: a theoretical study of H<sup>+</sup> translocation along the single-file water chain in the gramicidin A channel. *Biophys. J.* **71**, 19–39
44. Doyle, A. D., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., MacKinnon, R. (1998) The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity. *Science* **280**, 69–76
45. Beitz, E., Wu, B., Holm, L. M., Schultz, J. E., and Zeuthen, T. (2006) Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *PNAS* **103**, 269–274
46. Chakrabarti, N., Roux, B., and Pomès, R. (2004) Structural Determinants of Proton Blockage in Aquaporins. *J. Mol. Biol.* **343**, 493–510
47. Chen, H., Ilan, B., Wu, Y., Zhu, F., Schulten, K., and Voth, G. A. (2007) Charge delocalization in proton channels, I: the aquaporin channels and proton blockage. *Biophys. J.* **92**, 46–60
48. Oliva, R., Calamita, G., Thornton, J. M., and Pellegrini-Calace, M. (2010) Electrostatics of aquaporin and aquaglyceroporin channels correlates with their transport selectivity. *PNAS* **107**, 4135–4140
49. Davis, M. E., and McCammon, J. A. (1990) Calculating electrostatic forces from grid-calculated potentials. *J. Comput. Chem.* **11**, 401–409
50. Honig, B., and Nicholls, A. (1995) Classical Electrostatics in Biology and Chemistry. *Science* **268**, 1144–1149
51. Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, J. M., McCammon, J. A. (2001) Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *PNAS* **98**, 10037–10041
52. Beitz, E., Pavlovic-Djuranovic, S., Yasui, M., Agre, P., and Schultz, J. E. (2004) Molecular dissection of water and glycerol permeability of the aquaglyceroporin from Plasmodium falciparum by mutational analysis. *PNAS* **101**, 1153–1158
53. Hansen, M., Kun, J. F. J., Schultz, J. E., and Beitz, E. (2002) A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage Plasmodium falciparum malaria parasites. *J. Biol Chem.* **277**, 4874–4882
54. Gutteridge, W. E. (1985) Existing chemotherapy and its limitations. *Br. Med. Bull.* **41**, 162–168
55. Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., and Burri, C. (2010) Human African trypanosomiasis. *The Lancet* **375**, 148–159
56. Alsford, S., Eckert, S., Baker, N., Glover, L., Sanchez-Flores, A., Leung, K. F., Turner, D. J., Field, M. C., Berriman, M., and Horn, D. (2012) High-throughput decoding of antitrypanosomal drug efficacy and resistance. *Nature* **482**, 232–236

57. Munday, J. C., Eze, A. A., Baker, N., Glover, L., Clucas, C., Aguinaga Andres, D., Natto, M. J., Teka, I. A., McDonald, J., Lee, R. S., Graf, F. E., Ludin, P., Burchmore, R. J. S., Turner, C. M. R., Tait, A., MacLeod, A., Maser, P., Barrett, M. P., Horn, D., and Koning, H. P. de (2014) Trypanosoma brucei aquaglyceroporin 2 is a high-affinity transporter for pentamidine and melaminophenyl arsenic drugs and the main genetic determinant of resistance to these drugs. *J. Antimicrob. chemother.* **69**, 651–663
58. Baker, N., Glover, L., Munday, J. C., Aguinaga Andres, D., Barrett, M. P., Koning, H. P. de, and Horn, D. (2012) Aquaglyceroporin 2 controls susceptibility to melarsoprol and pentamidine in African trypanosomes. *PNAS* **109**, 10996–11001
59. Baker, N., Koning, H. P. de, Maser, P., and Horn, D. (2013) Drug resistance in African trypanosomiasis: the melarsoprol and pentamidine story. *Trends in parasitology* **29**, 110–118
60. Lanteri, C. A., Tidwell, R. R., and Meshnick, S. R. (2008) The mitochondrion is a site of trypanocidal action of the aromatic diamidine DB75 in bloodstream forms of Trypanosoma brucei. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 875–882
61. Uzcategui, N. L., Figarella, K., Bassarak, B., Meza, N. W., Mukhopadhyay, R., Ramirez, J. L., and Duszenko, M. (2013) Trypanosoma brucei aquaglyceroporins facilitate the uptake of arsenite and antimonite in a pH dependent way. *Cell Physiol. Biochem.* **32**, 880–888
62. Michels, P., Hannaert, V., and Bringaud, F. (2000) Metabolic Aspects of Glycosomes in Trypanosomatidae – New Data and Views. *Parasitology Today* **16**, 482–489
63. Grünberg, J., Schwendimann, B., Sharma, P., R., Deshusses, J. (1980) Role of Glycerol Permeation in the Bloodstream Form of Trypanosoma brucei \*. *J. Protozool.* **27**, 484–491
64. Bakker, B. M., Michels, P. A. M., Opperdoes, F. R., and Westerhoff, H. V. (1997) Glycolysis in Bloodstream Form Trypanosoma brucei Can Be Understood in Terms of the Kinetics of the Glycolytic Enzymes. *J. Biol. Chem.* **272**, 3207–3215
65. Bassarak, B., Uzcategui, N. L., Schonfeld, C., and Duszenko, M. (2011) Functional characterization of three aquaglyceroporins from Trypanosoma brucei in osmoregulation and glycerol transport. *Cell Physiol. Biochem* **27**, 411–420
66. Beitz, E., Liu, K., Ikeda, M., Guggino, W. B., Agre, P., and Yasui, M. (2006) Determinants of AQP6 trafficking to intracellular sites versus the plasma membrane in transfected mammalian cells. *Biol. Cell* **98**, 101–109
67. Yasui, M., Hazama, A., Kwon, T. H., Nielsen, S., Guggino, W. B., and Agre, P. (1999) Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* **402**, 184–187
68. Ikeda, M., Beitz, E., Kozono, D., Guggino, W. B., Agre, P., and Yasui, M. (2002) Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells. Requirement of pore-lining residue threonine 63. *J. Biol. Chem.* **277**, 39873–39879
69. Rambow, J., Wu, B., Ronfeldt, D., and Beitz, E. (2014) Aquaporins with anion/monocarboxylate permeability: mechanisms, relevance for pathogen-host interactions. *Front. Pharmacol.* **5**, 199
70. Choi, W.-G., and Roberts, D. M. (2007) Arabidopsis NIP2;1, a major intrinsic protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress. *J. Biol. Chem.* **282**, 24209–24218
71. Wallace, I. S., Choi, W.-G., and Roberts, D. M. (2006) The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 1165–1175
72. Bienert, G. P., Desguin, B., Chaumont, F., and Hols, P. (2013) Channel-mediated lactic acid transport: a novel function for aquaglyceroporins in bacteria. *Biochem. J.* **454**, 559–570
73. Faghiri, Z., Camargo, S. M. R., Huggel, K., Forster, I. C., Ndegwa, D., Verrey, F., and Skelly, P. J. (2010) The tegument of the human parasitic worm Schistosoma mansoni as an excretory organ: the surface aquaporin SmaQP is a lactate transporter. *PLoS one* **5**, e10451

## Literaturverzeichnis

74. Tsukaguchi, H., Shayakul, C., Berger, U. V., Mackenzie, B., Devidas, S., Guggino, W. B., van Hoek, A. N., and Hediger, M. A. (1998) Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J. Biol. Chem.* **273**, 24737–24743
75. Tsukaguchi, H., Weremowicz, S., Morton, C. C., and Hediger, M. A. (1999) Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *Am. J. Physiol.* **277**, F685-96
76. Ishibashi, K., Sasaki, S., Fushimi, K., Uchida, S., Kuwahara, M., Saito, H., Furukawa, T., Nakajima, K., Ymyguchi, Y., Gojobori, T., Marumo, F. (1994) Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc. Natd. Acad. Sci.* **91**, 6269–6273
77. Ishibashi, K., Kuwahara, M., Gu, Y., Kageyama, Y., Tohsaka, A., Suzuki, F., Marumo, F., and Sasaki, S. (1997) Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *J. Biol. Chem.* **272**, 20782–20786
78. Ishibashi, K., Morinaga, T., Kuwahara, M., Sasaki, S., and Imai, M. (2002) Cloning and identification of a new member of water channel (AQP10) as an aquaglyceroporin. *BBA Gene Structure and Expression* **1576**, 335–340
79. Elkjaer, M., Vajda, Z., Nejsum, L. N., Kwon, T., Jensen, U. B., Amiry-Moghaddam, M., Frokiaer, J., and Nielsen, S. (2000) Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 1118–1128
80. Badaut, J., and Regli, L. (2004) Distribution and possible roles of aquaporin 9 in the brain. *Neuroscience* **129**, 971–981
81. Badaut, J., Petit, J.-M., Brunet, J.-F., Magistretti, P. J., Charriaut-Marlangue, C., and Regli, L. (2004) Distribution of Aquaporin 9 in the adult rat brain: preferential expression in catecholaminergic neurons and in glial cells. *Neuroscience* **128**, 27–38
82. Ishibashi, K., Kuwahara, M., Gu, Y., Tanaka, Y., Marumo, F., and Sasaki, S. (1998) Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 268–274
83. Ishibashi, K., Kuwahara, M., Gu, Y., Tanaka, Y., Marumo, F., and Sasaki, S. (1998) Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 268–274
84. Viadiu, H., Gonen, T., and Walz, T. (2007) Projection map of aquaporin-9 at 7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **367**, 80–88
85. Calamita, G., Gena, P., Ferri, D., Rosito, A., Rojek, A., Nielsen, S., Marinelli, R. A., Fruhbeck, G., and Svelto, M. (2012) Biophysical assessment of aquaporin-9 as principal facilitative pathway in mouse liver import of glucogenetic glycerol. *Biol. Cell* **104**, 342–351
86. Gena, P., Mastrodonato, M., Portincasa, P., Fanelli, E., Mentino, D., Rodriguez, A., Marinelli, R. A., Brenner, C., Fruhbeck, G., Svelto, M., and Calamita, G. (2013) Liver glycerol permeability and aquaporin-9 are dysregulated in a murine model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS one* **8**, e78139
87. Jelen, S., Gena, P., Lebeck, J., Rojek, A., Praetorius, J., Frokiaer, J., Fenton, R. A., Nielsen, S., Calamita, G., and Rutzler, M. (2012) Aquaporin-9 and urea transporter-A gene deletions affect urea transmembrane passage in murine hepatocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **303**, G1279-87

## Literaturverzeichnis

88. Burnette, W. N. (1981) "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195–203
89. Mruk, D. D., and Cheng, C. Y. (2011) Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits. *Spermatogenesis* **1**, 121–122
90. Wu, B., Altmann, K., Barzel, I., Krehan, S., and Beitz, E. (2008) A yeast-based phenotypic screen for aquaporin inhibitors. *Pflugers Archiv : Eur. J Physiol.* **456**, 717–720
91. Beitz, E. (1999) TeXshade: sading and labeling of multiple sequence alignments using LaTeX2e. *Bioinformatics* **16**, 135–139
92. Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L., and Schwede, T. (2014) SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* **42**, W252-8
93. Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., and Baker, N. A. (2004) PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **32**, W665-7
94. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612
95. Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H., and Hieter, P. (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**, 119–122
96. Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J. D. (1997) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115–132
97. Ludewig, G., Williams, J. M., Li, Y., and Staben, C. (1994) Effects of pentamidine isethionate on *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1123–1128
98. Song, J., Almasalmeh, A., Krenc, D., and Beitz, E. (2012) Molar concentrations of sorbitol and polyethylene glycol inhibit the *Plasmodium* aquaglyceroporin but not that of *E. coli*: involvement of the channel vestibules. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 1218–1224
99. Koning, H. P. de (2000) Uptake of Pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is Mediated by Three Distinct Transporters: Implications for Cross-Resistance with Arsenicals. *Mol. Pharmacol.* **59**, 586–592
100. Froger, A., Tallur, B., Thomas, D., and Delamarche, C. (1998) Prediction of functional residues in water channels and related proteins. *Protein Science : a publication of the Protein Society* **7**, 1458–1468
101. Casal M., Paiva S., Andrade R.P., Gancedo C., Leao C. (1999) The Lactate-Proton Symport of *Saccharomyces cerevisiae* Is Encoded by JEN1. *J. Bacteriol.* **181**, 2620–2623
102. Meyer, A., Eskandari, S., Grallath, S., and Rentsch, D. (2006) AtGAT1, a high affinity transporter for gamma-aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol.Chem.* **281**, 7197–7204
103. Talley, K., and Alexov, E. (2010) On the pH-optimum of activity and stability of proteins. *Proteins* **78**, 2699–2706
104. Walter, A., and Gutknecht, J. (1984) Monocarboxylic acid permeation through lipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* **77**, 255–264
105. Wiechert, M., and Beitz, E. (2017) Mechanism of formate-nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity. *The EMBO Journal*



106. Wu, B., Rambow, J., Bock, S., Holm-Bertelsen, J., Wiechert, M., Soares, A. B., Spielmann, T., and Beitz, E. (2015) Identity of a Plasmodium lactate/H(+) symporter structurally unrelated to human transporters. *Nature Communications* **6**, 6284
107. Czodrowski, P., Dramburg, I., Sottriffer, C. A., and Klebe, G. (2006) Development, validation, and application of adapted PEOE charges to estimate pKa values of functional groups in protein-ligand complexes. *Proteins* **65**, 424–437
108. Prox, J., Arnold, P., and Becker-Pauly, C. (2015) Meprin alpha and meprin beta: Procollagen proteinases in health and disease. *Matrix Biol.* **44-46**, 7–13
109. Herzog, C., Haun, R. S., Kaushal, V., Mayeux, P. R., Shah, S. V., and Kaushal, G. P. (2009) Meprin A and meprin alpha generate biologically functional IL-1beta from pro-IL-1beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 904–908
110. Banerjee, S., and Bond, J. S. (2008) Prointerleukin-18 is activated by meprin beta in vitro and in vivo in intestinal inflammation. *J. Biol. Chem.* **283**, 31371–31377
111. Fields S., Song, O. (1989) A novel genetic System to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245–246
112. Snider, J., Kittanakom, S., Curak, J., and Stagljar, I. (2010) Split-ubiquitin based membrane yeast two-hybrid (MYTH) system: A powerful tool for identifying protein-protein interactions. *J. Vis. Exp.* **36**
113. Alberts, B. (2002) *Mol. Biol. Ccell*, 4th Ed., Garland, New York, NY
114. Yool, A. J., and Campbell, E. M. (2012) Structure, function and translational relevance of aquaporin dual water and ion channels. *Mol. Asp. Med.* **33**, 553–561
115. Gourbal, B., Sonuc, N., Bhattacharjee, H., Legare, D., Sundar, S., Ouellette, M., Rosen, B. P., and Mukhopadhyay, R. (2004) Drug uptake and modulation of drug resistance in Leishmania by an aquaglyceroporin. *J. Biol. Chem.* **279**, 31010–31017
116. Preston, G. M., Jung, J. S., Guggino, W. B., and Agre, P. (1994) Membrane topology of aquaporin CHIP. Analysis of functional epitope-scanning mutants by vectorial proteolysis. *J. Biol.Chem.* **269**, 1668–1673
117. Ashcroft, F., Gadsby, D., and Miller, C. (2009) Introduction. The blurred boundary between channels and transporters. *Philos. Trans. R. Soc.of Lond..B Biol. Sci.* **364**, 145–147
118. Artigas, P., and Gadsby, D. C. (2004) Large diameter of palytoxin-induced Na/K pump channels and modulation of palytoxin interaction by Na/K pump ligands. *J. Gen. Physiol.***123**, 357–376
119. Scheiner-Bobis, G., Meyer zu Heringdorf, D., Christ, M., Habermann, E. (1994) Palytoxin Induces K Efflux from Yeast Cells Expressing the Mammalian Sodium Pump. *Am. Soc. Pharmacol. Exp.Ther.* **45**, 1132–1136
120. Lisal, J., and Maduke, M. (2009) Review. Proton-coupled gating in chloride channels. *Philos. Trans. R. Soc.of Lond..B Biol. Sci.* **364**, 181–187
121. Miller, C., and Nguitragool, W. (2009) A provisional transport mechanism for a chloride channel-type Cl-/H+ exchanger. *Philos. Trans. R. Soc.of Lond..B Biol. Sci.* **364**, 175–180
122. Hagstrom-Toft, E., Enoksson, S., Moberg, E., Bolinder, J., and Arner, P. (1997) Absolute concentrations of glycerol and lactate in human skeletal muscle, adipose tissue, and blood. *Am. J. Physiol.* **273**, E584-92
123. Raez, B., Iten, M., Grether-Buehler, Y., Kaminsky, R., Brun, R. (1997) The Alamar Blue® assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (T.b. rhodesiense and T.b. gambiense) in vitro. *Acta Trop.* **68**, 139–147
124. Spinello, A., Almeida, A. de, Casini, A., and Barone, G. (2016) The inhibition of glycerol permeation through aquaglyceroporin-3 induced by mercury(II): A molecular dynamics study. *J.of Inorg. Biochem.***160**, 78–84

125. Martins, A. P., Marrone, A., Ciancetta, A., Galan Cobo, A., Echevarria, M., Moura, T. F., Re, N., Casini, A., and Soveral, G. (2012) Targeting aquaporin function: potent inhibition of aquaglyceroporin-3 by a gold-based compound. *PLoS one* **7**, e37435
126. Diallinas, G. (2014) Understanding transporter specificity and the discrete appearance of channel-like gating domains in transporters. *Front. Pharmacol.* **5**, 207
127. Lu, W., Du, J., Schwarzer, N. J., Gerbig-Smentek, E., Einsle, O., and Andrade, S. L. A. (2012) The formate channel FocA exports the products of mixed-acid fermentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 13254–13259
128. Song, J., Baker, N., Rothert, M., Henke, B., Jeacock, L., Horn, D., and Beitz, E. (2016) Pentamidine Is Not a Permeant but a Nanomolar Inhibitor of the Trypanosoma brucei Aquaglyceroporin-2. *PLoS pathog.* **12**, e1005436
129. Mukhopadhyay, R., and Beitz, E. (2010) Metalloid transport by aquaglyceroporins: Consequences in the treatment of human diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **679**, 57–69
130. Song, J., Mak, E., Wu, B., and Beitz, E. (2014) Parasite aquaporins: current developments in drug facilitation and resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 1566–1573
131. Batra, J., Szabo, A., Caulfield, T. R., Soares, A. S., Sahin-Toth, M., and Radisky, E. S. (2013) Long-range electrostatic complementarity governs substrate recognition by human chymotrypsin C, a key regulator of digestive enzyme activation. *J. Biol. Chem.* **288**, 9848–9859
132. Schreiber, G., Haran, G., and Zhou, H.-X. (2009) Fundamental aspects of protein-protein association kinetics. *Chem. Rev.* **109**, 839–860
133. Jeacock, L., Baker, N., Wiedemar, N., Maser, P., and Horn, D. (2017) Aquaglyceroporin-null trypanosomes display glycerol transport defects and respiratory-inhibitor sensitivity. *PLoS pathog.* **13**, e1006307
134. Promeneur, D., Liu, Y., Maciel, J., Agre, P., King, L. S., and Kumar, N. (2007) Aquaglyceroporin PbAQP during intraerythrocytic development of the malaria parasite Plasmodium berghei. *PNAS* **104**, 2211–2216
135. Dietz, M. S., Fricke, F., Krüger, C. L., Niemann, H. H., and Heilemann, M. (2014) Receptor-Ligand Interactions: Binding Affinities Studied by Single-Molecule and Super-Resolution Microscopy on Intact Cells. *Chem. Phys. Chem.* **15**, 671–676
136. Barber, R. (1986) Discrimination between intact cell desensitization and agonist affinity changes. *Mol. Cell. Endocrin.* **46**, 263–270
137. Green, N. M. (1963) Avidin: The Nature of the Biotin Binding-site. *Biochem. Journal* **89**, 599–609
138. Peng, H.-P., Lee, K. H., Jian, J.-W., and Yang, A.-S. (2014) Origins of specificity and affinity in antibody-protein interactions. *PNAS* **111**, E2656-65
139. Damper, D., Patton, C. L. (1975) Pentamidine transport in Trypanosoma brucei-kinetics and specificity\*. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 271–276
140. Achcar, F., Kerkhoven, E. J., and Barrett, M. P. (2014) Trypanosoma brucei: meet the system. *Curr. Opin. Microbiol.* **20**, 162–169
141. Engstler, M., Thilo, L., Weise, F., Grunfelder, C. G., Schwarz, H., Boshart, M., and Overath, P. (2004) Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in Trypanosoma brucei. *J. Cell Sci.* **117**, 1105–1115
142. Overath, P., and Engstler, M. (2004) Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: Trypanosoma brucei as a model system. *Mol. Microbiol.* **53**, 735–744
143. Cross, G. A. (1975) Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of Trypanosoma brucei. *Parasitology* **71**, 393–417

144. Alsford, S., Field, M. C., and Horn, D. (2013) Receptor-mediated endocytosis for drug delivery in African trypanosomes: fulfilling Paul Ehrlich's vision of chemotherapy. *Trends Parasitol.* **29**, 207–212
145. Damper, D., Patton, C. L. (1976) Pentamidine Transport and Sensitivity in brucei -Group Trypanosomes\*. *J. Protozool.* **23**, 349–356
146. Silvi, S., and Credi, A. (2015) Luminescent sensors based on quantum dot-molecule conjugates. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4275–4289
147. Ehrlich P. (1913) Address in Pathology on Chemiotherapy. *Br. Med. J.* 353–359
148. Heynick, F. (2009) The original 'magic bullet' is 100 years old - extra. *Br. J. Psychiatry* **195**, 456
149. Liu, H., Liu, Y., Liu, S., Pang, D.-W., and Xiao, G. (2011) Clathrin-mediated endocytosis in living host cells visualized through quantum dot labeling of infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Virol.* **85**, 6252–6262
150. Anas, A., Okuda, T., Kawashima, N., Nakayama, K., Itoh, T., Ishikawa, M., and Biju, V. (2009) Clathrin-mediated endocytosis of quantum dot-peptide conjugates in living cells. *ACS nano* **3**, 2419–2429
151. Madhumathi, J., and Verma, R. S. (2012) Therapeutic targets and recent advances in protein immunotoxins. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 300–309
152. Nok, A. J., and Nock, I. H. (2002) Transferrin coupled azantraquinone enhances the killing effect on trypanosomes. The role of lysosomal mannosidase. *Parasite (Paris, France)* **9**, 375–379
153. Baral, T. N., Magez, S., Stijlemans, B., Conrath, K., Vanhollebeke, B., Pays, E., Muyldermans, S., and Baetselier, P. de (2006) Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. *Nat Med* **12**, 580–584
154. Field, M. C., and Carrington, M. (2009) The trypanosome flagellar pocket. *Nature Rev. Microbiol.* **7**, 775–786
155. Graf, F. E., Ludin, P., Wenzler, T., Kaiser, M., Brun, R., Pyana, P. P., Buscher, P., Koning, H. P. de, Horn, D., and Maser, P. (2013) Aquaporin 2 mutations in *Trypanosoma brucei gambiense* field i solates correlate with decreased susceptibility to pentamidine and melarsoprol. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2475
156. Jensen, M. O., Rothlisberger, U., and Rovira, C. (2005) Hydroxide and proton migration in aquaporins. *Biophys. J.* **89**, 1744–1759
157. Lu, W., Du, J., Schwarzer, N. J., Wacker, T., Andrade, S. L. A., and Einsle, O. (2013) The formate/nitrite transporter family of anion channels. *Biol. Chem.* **394**, 715–727
158. Wang, Y., Huang, Y., Wang, J., Cheng, C., Huang, W., Lu, P., Xu, Y.-N., Wang, P., Yan, N., and Shi, Y. (2009) Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature* **462**, 467–472
159. Naray-Szabo, G. (1989) Electrostatic complementarity in molecular associations. *J. Mol. Graph.* **7**, 76–81, 98
160. Koch, U., Biasiol, G., Brunetti, M., Fattori, D., Pallaoro, M., and Steinkühler, C. (2001) Role of Charged Residues in the Catalytic Mechanism of Hepatitis C Virus NS3 Protease: Electrostatic Precollision Guidance and Transition-State Stabilization. *Biochem.* **40**, 631–640
161. Radic, Z., Kirchhoff, P. D., Quinn, D. M., McCammon, J. A., and Taylor, P. (1997) Electrostatic Influence on the Kinetics of Ligand Binding to Acetylcholinesterase: Distinctions between the active center ligands and Fasciculin. *J. Biol. Chem.* **272**, 23265–23277
162. Kirscht, A., Kaptan, S. S., Bienert, G. P., Chaumont, F., Nissen, P., Groot, B. L. de, Kjellbom, P., Gourdon, P., and Johanson, U. (2016) Crystal Structure of an Ammonia-Permeable Aquaporin. *PLoS Biol.* **14**, e1002411

## Literaturverzeichnis

163. Becker-Pauly, C., Barre, O., Schilling, O., dem Keller, U. auf, Ohler, A., Broder, C., Schutte, A., Kappelhoff, R., Stocker, W., and Overall, C. M. (2011) Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates. *Mol. Cell. Proteomics : MCP* **10**, M111.009233
164. Jackle, F., Schmidt, F., Wichert, R., Arnold, P., Prox, J., Mangold, M., Ohler, A., Pietrzik, C. U., Koudelka, T., Tholey, A., Gutschow, M., Stirnberg, M., and Becker-Pauly, C. (2015) Metalloprotease meprin beta is activated by transmembrane serine protease matriptase-2 at the cell surface thereby enhancing APP shedding. *Biochem. J.* **470**, 91–103
165. Poole, R. C., and Halestrap A.P. (1993) Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *The American Physiological Society*, 771–782
166. Halestrap, A. P. (2012) The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB life* **64**, 1–9
167. Badaut, J. (2010) Aquaglyceroporin 9 in brain pathologies. *Neuroscience* **168**, 1047–1057

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die Abhandlung, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist. Die Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ein Teil dieser Arbeit wurde unter folgenden Titeln publiziert:

Song, J., Baker, N., Rothert, M., Henke, B., Jeacock, L., Horn, D., Beitz., E. (2016) Pentamidine is Not a Permeant but a Nanomolar Inhibitor of the *Trypanosoma brucei* Aquaglyceroporin-2. *PLoS Pathog.* **12(2)**, e1005436

Rothert, M., Rönfeldt, D., Beitz, E. (2017) Electrostatic Attraction of Weak Monoacid Anions Increases Probability for Protonation and Passage through Aquaporins. *J. Biol.Chem.*, *in press*

Beitz, E., Golldack, A., Rothert, M., von Bülow, J. (2015) Challenges and achievements in the therapeutic modulation of aquaporin functionality. *Pharmacol. Ther.* **155**, 22-35

Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Monja Rothert

Kiel, Mai 2017



## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit ist unter der Leitung von Prof. Dr. Eric Beitz am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel entstanden. Ihm danke ich dafür, dass ich dieses für mich spannende Thema bearbeiten durfte. Seine Tür stand allzeit offen und die anregenden Diskussionen, Ideen und Denkanstöße waren immer sehr hilfreich.

Jie Song danke ich dafür, dass er mich, obwohl er selbst nicht mehr vor Ort war, so gut in die Kunst der Stopped-Flow-Messungen eingearbeitet hat und immer erreichbar war. Der Stopped-Flow möchte ich dafür danken, dass sie mir in ihren guten Phasen eine tolle Zusammenarbeit beschert hat. In ihren schlechten Phasen bereitete sie mir mit ihren „Schlaganfällen“, die sich als Partikel von Dichtungsringen in den engen Gängen des Mischblocks herausstellten, allerdings viel Kopfzerbrechen. In dieser Zeit hat mir der unermüdliche Enthusiasmus und Optimismus von Kalle sehr geholfen, der sich akribisch mit mir auf Spurensuche begab, wofür ich ihm sehr dankbar bin. Dirk Böhme danke ich dafür, dass dann seine passgenauen neuen Silikon-O-Ringe mein Laborleben nachhaltig erleichtert haben. Folknand danke ich für die Hingabe bei gemeinsamen Auseinanderbau- und Mischblockreinigungsaktionen.

Julia von Bülow danke ich für ihre fachlichen Anregungen, die aufbauenden und motivierenden Gespräche, für die sie stets eine offene Tür und ein offenes Ohr hatte. Ihre Frohnatur und ansteckende gute Laune waren eine Bereicherung und fehlten später schmerzlich.

Björn danke ich für die Synthesearbeiten, das immer zeitnahe Sequenzieren, auch wenn die Proben mal spontan kamen, und dafür, dass er einfach Björni ist.

Uli Girreser danke ich für eine reibungslose als auch unterhaltsame Zusammenarbeit bei der Betreuung des 4. Semesters, für seinen unverwechselbaren Humor und seine Hilfe bei der Beantwortung jeglicher Fragen chemischer und statistischer Art.

André, Malte und Tine danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Und vor allem Tine für die Sorgfalt und Zeit, die sie sich genommen hat, und mir mit ihrer konstruktiven Kritik eine unersetzbare Hilfe war.

Der „Original-Gruppenbüro-Crew“ Marie, Tine und Julia Holm-Bertelsen danke ich für die lustige, motivierende, kommunikative Atmosphäre, die den Arbeitsalltag hat kurzweilig werden lassen. Marie danke ich zusätzlich für die angenehme Stimmung während der Schreibphase eine Etage tiefer. Philipp danke ich für die vielen bereichernden Gespräche, zum einen fachlicher

Natur als auch als Zugewinn für das soziale Miteinander. Holger danke für die stets fröhliche Begrüßung morgens und seine aufmerksamen Fragen. Meinem Arbeitskreis und allen anderen, die ich hier nicht einzeln aufgeführt habe, danke ich für das kollegiale und entspannte Klima, lustige Gespräche in der Mittagspause und ein insgesamt angenehmes Institutsleben.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie immer für mich da waren und alles gegeben haben, um mir diesen Weg zu ermöglichen. Meinem Partner Lasse möchte ich danken, dass er während der gesamten Zeit stets hinter mir stand und mir immer wieder Kraft gegeben hat weiterzumachen und mein Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.



## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Monja Rothert  
Geburtsdatum: 31.07.1988  
Geburtsort: Hamburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Promotion und Weiterbildung

---

04/2014-heute Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
04/2014-heute Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik

### Studium der Pharmazie und Ausbildung zur Apothekerin

---

12/2013 Erteilung der Approbation als Apothekerin  
06/2013-11/2013 Pharmaziepraktikum, Sophienhof Apotheke, Kiel  
12/2012-05/2013 Pharmaziepraktikum, Arbeitskreis von Prof. Dr. Clement  
10/2008-11/2012 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

### Schule

---

07/2007 Allgemeine Hochschulreife, Otto-Hahn-Gymnasium, Geesthacht

### Publikationen

---

Song, J., Baker, N., Rothert, M., Henke, B., Jeacock, L., Horn, D., Beitz., E. (2016) Pentamidine is Not a Permeant but a Nanomolar Inhibitor of the *Trypanosoma brucei* Aquaglyceroporin-2. *PLoS Pathog.* **12(2)**, e1005436

Rothert, M., Rönfeldt, D., Beitz, E. (2017) Electrostatic Attraction of Weak Monoacid Anions Increases Probability for Protonation and Passage through Aquaporins. *J. Biol. Chem.*, *in press*

Beitz, E., Golldack, A., Rothert, M., von Bülow, J. (2015) Challenges and achievements in the therapeutic modulation of aquaporin functionality. *Pharmacol. Ther.* **155**, 22-35