

**Optimierung und Etablierung von Testmethoden und
funktionelle Untersuchung verschiedener
Aquaporine & Aquaglyceroporine**



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

vorgelegt von

Abdulnasser Almasalmeh

Kiel 2013

Referent:

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

Prof. Dr. E. Beitz

Prof. Dr. T. Kunze

25.03.2013

26.03.2013

Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl
(Dekan)

قُلْ رَبِّ زِدْنِي عِلْمًا
سورة طه آية 114

Und sage: Gott gebe mir mehr Wissen

Koran, Sure Taha, Vers 114

I. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, selbstständig verfasst habe und keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet habe. Diese Arbeit hat weder ganz, noch in Teilen, bereits an anderer Stelle einer Prüfungskommission zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegen. Ich erkläre, dass die vorliegende Arbeit gemäß der Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft erstellt wurde.

Ein Teil dieser Arbeit ist bereits veröffentlicht unter dem Titel: „*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. 2012 May;1818(5):1218-24.

Kiel, 14 Februar 2013

Abdulnasser Almaslameh

II. Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
Aqua bidest.	gereinigtes Wasser
ar/R-Region	aromatische/Arginin (R)-Region
BCECF	2',7'-Bis-(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CM-H ₂ DCFDA	5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester
dNTP's	Desoxyribonukleotide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetracetat
FDA	Fluoresceindiacetat
HA	Hämagglutinin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	<i>Kilodalton</i>
LiAc	Lithiumacetat
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MIP	<i>major intrinsic proteins</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PfAQP	Aquaglyceroporin aus <i>P. falciparum</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

II. Abkürzungsverzeichnis

Primer_s	Sense Primer für den '5 → '3 Strang
Primer_as	Antisense Primer für den '3 → '5 Strang
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SD-Medium	Synthetisches Dextrose -Minimalmedium
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sscDNA	<i>single stranded carrier</i> DNA
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
YNB	Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium
YPD-Medium	Yeast Peptone Dextrose Medium
%	Prozentangabe mg in 100 ml Lösung
% (V/V)	Volumenprozent

III. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Aquaporine	1
1.2. Struktur	2
1.2.1. NPA-Motive	3
1.2.2. aromatische Arginin-Region	3
1.3. Einteilung der Aquaporine	4
1.4. Ausschluss von Protonen und Kationen	4
1.5. Pharmazeutische Relevanz	5
1.6. Testsysteme zur Charakterisierung von Aquaporinen	7
1.7. <i>P. falciparum</i> Aquaglyceroporin	8
Zielsetzung I	8
1.8. Ammoniakleitfähigkeit von Aquaporinen	9
Zielsetzung II	9
1.9. Wasserstoffperoxidleitfähigkeit von Aquaporinen	10
Zielsetzung III	10
2. Materialien	11
2.1. Kits	11
2.2. Enzyme und Puffer	11
2.3. Chemikalien	11
2.4. Geräte und Materialien	13
2.5. Plasmide	15
2.6. Oligonukleotide	16
2.6.1. Klonierungsprimer	16
2.6.2. Sequenzierungsprimer	17
2.7. Verwendete <i>E. coli</i> Stämme	17
2.8. Verwendete <i>S. cerevisiae</i> Stämme	17
2.9. Puffer und Lösungen	18
2.9.1. für Molekularbiologie	18
2.9.2. für Proteinchemie	20
2.9.3. für funktionelle Charakterisierung	22

3. Methoden	25
3.1. Gentechnologische und Molekularbiologische Methoden	25
3.1.1. PCR	25
3.1.2. Agarose-Gelelektrophorese	26
3.1.3. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	27
3.1.4. Bestimmung der DNA-Konzentration	27
3.1.5. Restriktionsverdau von DNA	28
3.1.6. DNA-Ligation	29
3.1.7. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	29
3.1.8. Transformation von <i>E. coli</i>	30
3.1.9. Isolierung von Plasmid-DNA	30
3.1.10. Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	30
3.1.11. Dauerkulturen von <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	31
3.1.12. Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm	32
3.2. Proteinchemische Methoden	32
3.2.1. Isolierung der mikrosomalen Proteinfraction	32
3.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	32
3.2.3. Erstellung der BSA-Kalibrierung	32
3.2.4. SDS-PAGE	33
3.2.5. <i>Western Blot</i>	34
3.2.6. Isolierung sekretorischer Hefevesikel	35
3.2.7. Bestimmung der Vesikelgröße	36
3.3. Methoden zur Charakterisierung der AQP-Funktion	37
3.3.1. phänotypische Methoden auf Agarplatten	37
3.3.1.1. H ₂ O ₂ -Messung	37
3.3.2. Phänotypische Methoden in Flüssigkulturen	37
3.3.2.1. Bestimmung der Generationszeit	38
3.3.2.2. H ₂ O ₂ -Messung mit dem <i>Bioscreen</i>	38
3.3.3. Biophysikalische Methoden mit der <i>stopped flow</i> Apparatur	38
3.3.3.1. Messung der Wasserleitfähigkeit	39
3.3.3.2. Messung der Glycerolleitfähigkeit	42
3.3.3.3. Messung der Ammoniakleitfähigkeit	45
3.3.3.4. Untersuchung der Molenbruch-Anomalie	46

4. Ergebnisse	49
4.1. Optimierung der <i>stopped flow</i> Methode	49
4.1.1. Findung der optimalen Zymolyase20T-Konzentration	49
4.1.2. Lagerfähigkeit von Protoplasten	51
4.1.3. Schrumpfen oder Schwellen?	51
4.1.4. Der osmotische Gradient	52
4.2. Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit von PfAQP	53
4.2.1. Amplifikation und Klonierung von PfAQP	53
4.2.2. Wasserleitfähigkeit von PfAQP; eine umstrittene Funktion!	55
4.2.3. Hemmung des PfAQP durch Sorbitol	59
4.2.4. Einfluss von Polyolen auf die Glycerolleitfähigkeit von PfAQP	62
4.2.5. Molenbruch-Anomalie	63
4.3. Ammoniak-Leitfähigkeit	67
4.3.1. Optimierung der <i>stopped flow</i> Messung	67
4.3.1.1. Aufnahme des Absorptionsspektrums von FDA	68
4.3.1.2. Ammoniakgradient und Verstärkung des Photomultipliers	68
4.3.1.3. Lagerfähigkeit von beladenen Hefezellen	69
4.3.1.4. Einfluss der Temperatur	70
4.3.1.5. Messvolumen	70
4.3.2. Ammoniakleitfähigkeit von PfAQP und hAQP8	71
4.4. H₂O₂-Leitfähigkeit durch Aqua-(glycero)-porine	72
4.4.1. H ₂ O ₂ -Leitfähigkeit von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen	72
4.4.2. Vergleich der H ₂ O ₂ -Leitfähigkeit von rAQP1 und hAQP1	76
5. Diskussion	81
5.1. Optimierung der <i>stopped flow</i> Methode zur Messung der Wasser- und Glycerolleitfähigkeit	81
5.2. Einfluss von Polyolen auf die Funktion von PfAQP und EcGlpF	82
5.2.1. Wasserleitfähigkeit von PfAQP	82
5.2.2. Warum leitet PfAQP Wasser, EcGlpF jedoch nicht?	84
5.2.3. Hemmung des PfAQP durch Sorbitol	84
5.2.4. Glycerolleitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF	84
5.2.5. Warum hemmt Sorbitol nur PfAQP? Warum wird die Wasserleitfähigkeit stärker gehemmt als die Glycerolleitfähigkeit	85

III. Inhaltsverzeichnis

5.2.6. Molenbruch-Anomalie von PfAQP	85
5.2.7. Fazit I	87
5.3. Messung der Ammoniakleitfähigkeit	88
5.3.1. Etablierung der <i>stopped flow</i> Methode	88
5.3.2. Messung der Ammoniakleitfähigkeit von PfAQP und hAQP8	89
5.3.3. Fazit II	90
5.4. H₂O₂-Leitfähigkeit	91
5.4.1. Wer leitet besser, Aquaporine oder Aquaglyceroporine?	91
5.4.2. Fazit III	93
6. Ausblick	94
7. Zusammenfassung	95
8. Summary	96
9. Literaturverzeichnis	97
10. Anhang	117
10.1. Liste der <i>glycerol stocks</i>	117
11. Publikationen	119

1. Einleitung

Ohne Wasser geht nichts. Menschen, Tiere, Pflanzen, Protozoen, Hefe, Bakterien, Schleimpilze und alle Wesen brauchen Wasser zum Leben. Die wässrigen sechs Liter Blut verteilen in unserem Körper Wärme, Nährstoffe, Arzneistoffe und Metaboliten. Unser Gehirn schwimmt in einer wässrigen Flüssigkeit und die Zellen bestehen bis zu 60 % aus Wasser. Störung des Wasserhaushaltes führt nicht nur zu Kopfschmerzen und trockener Haut sondern auch zu Ödemen, Herz- und Kreislaufkrankheiten, die u. U. fatale Folgen haben können.

Deswegen wird der Wasserhaushalt durch strikte Mechanismen reguliert. Einer dieser Mechanismen sind die Aquaporine. Es ist bekannt, dass Wasser durch die lipophilen Zellmembranen diffundieren kann. Dies braucht allerdings eine hohe Aktivierungsenergie von mehr als $10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Außerdem ist die einfache Diffusion von Wasser für eine feine und schnelle Regulierung vieler biochemischer Prozesse sehr langsam (Verkman, 1989; Kozono *et al.*, 2002). Dazu kommt auch, dass für bestimmte Lipidmembranen eine Aktivierungsenergie für den Wassertransport von weniger als $5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ermittelt wurde (Gonen & Walz, 2006; Preston *et al.*, 1992). Aus diesen Gründen wurde vor ca. 80 Jahren vermutet, dass es für den Wassertransport zwischen Zellen und Geweben spezialisierte Proteine gibt. 1935 haben Hevesy *et al.* einen Wassertransport über eine Amphibienhaut gemessen, der drei- bis fünfmal höher ist als für reine Diffusion über Lipidmembranen berechnet. Diese Vermutung wurde erstmals von P. Agre, *Baltimore USA*, im Jahr 1992 bestätigt, als er zufällig bei Untersuchungen der Rhesusproteine aus Erythrozyten das erste Aquaporin entdeckt hat (Agre *et al.*, 1993) und dafür mit dem Nobelpreis 2003 ausgezeichnet wurde (Agre, 2004). Heute ist die Familie der Aquaporine auf mehr als 450 Mitglieder angewachsen (Zardoya, 2005).

1.1 Aquaporine

Aquaporine sind Membranproteine mit einer Molekulargröße um 30 kDa pro Monomer. Sie gehören zu der *major intrinsic proteins* Familie (MIP). Während im Menschen 13 verschiedene Aquaporine (hAQP0 bis hAQP12) identifiziert worden sind, enthält das Genom von Einzellern wie z. B. Archaea, Bakterien und Hefezellen wenige AQP-Gene; der Malariaerreger, *P. falciparum*, enthält nur ein AQP-Gen (*pfaqp*). Das Darmbakterium, *E. coli*, besitzt zwei Aquaporine (AqpZ & EcGlpF). Hefezellen (*S. cerevisiae*) haben vier und Schleimpilze (*D. discoideum*), je nach Entwicklungsstadium, bis zu fünf Aquaporine. Genauso wie im Menschen hat die Ratte ebenfalls 13 Aquaporine (rAQP0 bis rAQP12), die den

1. Einleitung

humanen Aquaporinen in Funktion und Aufbau sehr ähnlich sind. Einige Pflanzen, z. B. *A. thaliana*, übertreffen den Menschen mit mehr als 23 Aquaporinen.

1.2 Struktur

Alle Aquaporine zeigen eine einheitliche Struktur. Sie bestehen aus sechs Helices (1-6), die die Zellmembran spannen, und zwei Halbhelices (HB & HE), die nur bis zur Mitte der Membran hineintauchen. Die transmembranären Helices 1 bis 6 sind miteinander über fünf Schleifen (A-E) verbunden, wobei der N- und C-Terminus intrazellulär sind (Engel *et al.*, 2000).

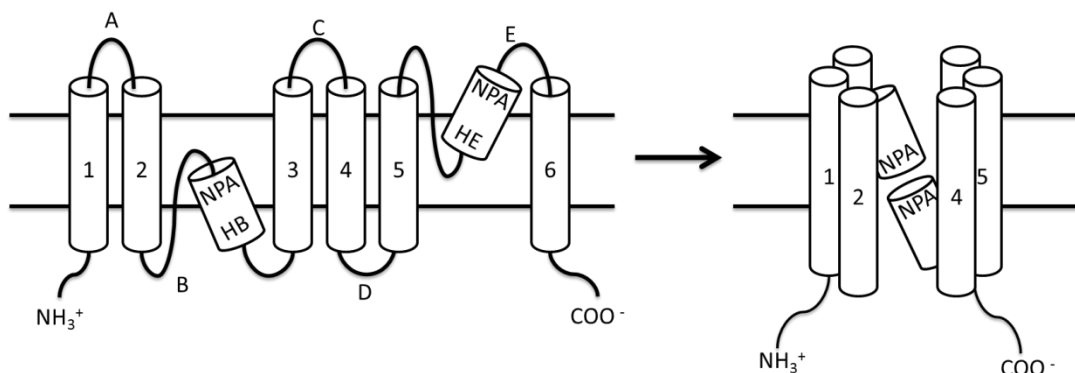


Abbildung 1.1: schematischer Aufbau eines Aquaporin-Monomeres

Am Ende der Halbhelices HB und HE befindet sich jeweils ein für alle Aquaporine charakteristisches NPA-Motiv, bestehend aus den Aminosäuren Asparagin (N), Prolin (P) und Alanin (A).

Die Helices 1, 2, 3 und HB bilden einen halben AQP-Kanal und die Helices 3, 4, 6 und HE bilden den zweiten Halbkanal. Auf Grund der hohen Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen beider Hälften geht man von einer Genduplikation aus (Wu & Beitz, 2007).

Unter physiologischen Bedingungen lagern sich vier Aquaporin-Monomere zu einem Tetramer, wobei jedes Monomer seine Funktion unabhängig von den restlichen Monomeren verrichtet.

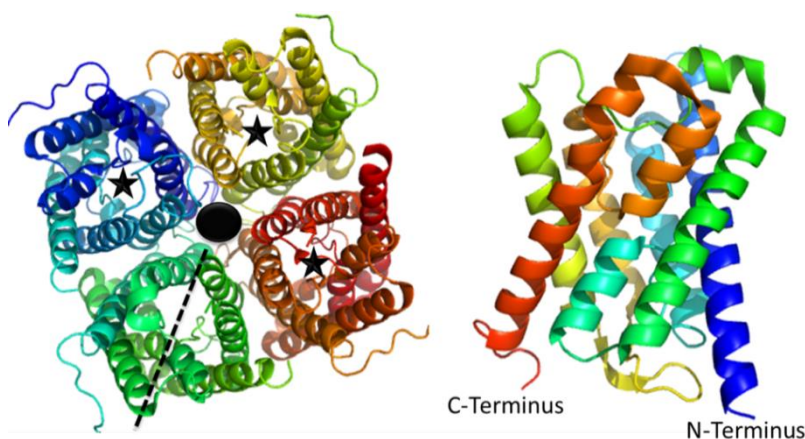


Abbildung 1.2:

Links:

Tetramer des Spinat-Aquaporins (SoPIP2;1. nach PDB 2B5F) mit intrazellulärem Blick

Der gepunktete Strich zeigt die AQP-Hälften, der schwarze Kreis symbolisiert die zentrale Pore und die Sternchen zeigen die einzelnen AQP-Kanäle.

Rechts:

SoPIP2;1-Monomer in Seitenansicht (nach PDB 3CN5)

1. Einleitung

Durch diese Zusammenlagerung entsteht eine zentrale Pore, deren Funktion für den Transport von Gasen noch umstritten ist.

1.2.1 NPA-Region

Die NPA-Region ist ein hochkonserviertes Merkmal aller Aquaporine. Während die Aminosäuren Prolin und Alanin zu einem gewissen Grad austauschbar sind, scheint Asparagin essentiell zu sein. Diesem Rest wird eine wichtige Rolle beim Wassertransport zugeschrieben (Zardoya, 2005; Wree *et al.*, 2011). Die Wassermoleküle dringen in den AQP-Kanal mit dem Sauerstoff hinein und die Wasserstoffe sind dabei extrazellulär orientiert. Die Amidgruppe des Asparagins tritt in Wechselwirkung mit dem Wassersauerstoff, so dass es zu Rotation des Wassermoleküls um 180° kommt. Dadurch verlassen die H-Atome zuerst den AQP-Kanal und danach der Sauerstoff (Murata, *et al.*, 2000; Tajkhorshid, *et al.*, 2002).

1.2.2 Aromatische Arginin-Region

Die aromatische Arginin-Region (ar/R-Region) liegt auf der extrazellulären Seite des AQP-Kanals. Sie besteht im Allgemeinen aus einem Arginin und einer oder mehreren aromatischen Aminosäuren und gilt als die engste Stelle des AQP-Kanals. Dadurch dient sie der Größenselektion. Die ar/R-Region des hAQP1 besteht aus Phenylalanin (Phe56), Histidin (His180), Cystein (Cys189) und Arginin (Arg195). Das hydrophobe Phenylalanin begrenzt den Kanal seitlich. Das Histidin ist typisch für schnell wasserleitende Aquaporine wie z. B. hAQP1 (Stroud *et al.*, 2003). Die Histidin-Seitenkette und der Carbonylsauerstoff des Cysteins ragen in den Kanal hinein. An die Thiolgruppe des Cysteins binden HgCl^+ -Ionen und führen zur Hemmung des Transports. Das Arginin ist bei dem physiologischen pH-Wert protoniert, was eine gewisse Barriere für positiv geladene Moleküle darstellt (Beitz *et al.*, 2006; Steinbronn *et al.*, 2009). Auf Grund der Anordnung dieser Reste weist die ar/R-Region solcher Aquaporine einen Durchmesser von ca. 2,8 Å auf, was der Größe eines Wassermoleküls entspricht.

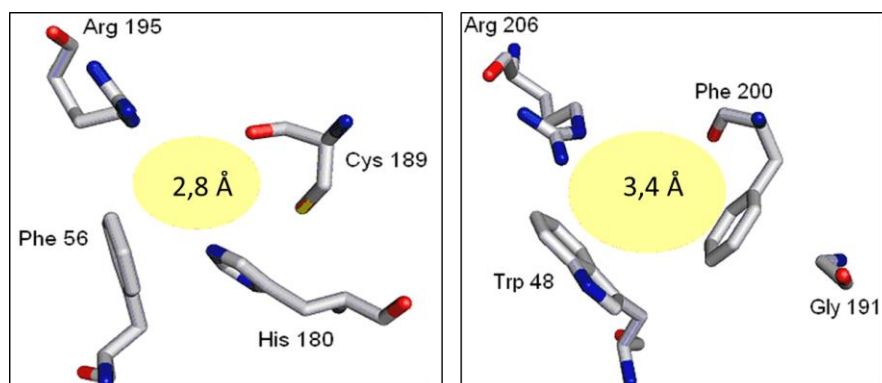


Abbildung 1.2: Die ar/R-Region in extrazellulärem Blick von dem wasserspezifischen hAQP1 (links) und dem Aquaglyceroporin EcGlpF (rechts).

1. Einleitung

Die ar/r-Region von EcGlpF besteht aus Tryptophan (Trp48), Glycin (Gly191), Phenylalanin (Phe200) und Arginin (Arg206). Arginin als typische Aminosäure in dieser Region behält seine Position wie in hAQP1. Im Gegensatz zu hAQP1 begrenzen in EcGlpF Tryptophan 48 (an Stelle des Phenylalanins 56 in hAQP1) und Phenylalanin 200 (an Stelle des Cysteins 189) den Kanal seitlich ohne hineinzuragen. Somit ist der Kanal insgesamt größer und hat einen Durchmesser von ca. 3,4 Å (Wu & Beitz, 2007). Glycin trägt zur Vergrößerung der Region und Erhöhung der Hydrophobie des Kanals.

1.3 Einteilung der Aquaporine

Auf Grund des Aufbaus und der Funktion werden die Aquaporine in zwei Gruppen geteilt:

Die orthodoxen Aquaporine haben auf Grund der Aminosäureanordnung in der ar/R-Region einen Durchmesser von 2,8 Å. Sie sind durch ihre hohe Wasserleitfähigkeit ausgezeichnet. Ihre Produktion in Hefeprotoplasten (Song *et al.*, 2012) oder Oozyten (Wu *et al.*, 2010) bzw. ihre Rekonstitution in Liposomen (Newby *et al.*, 2008) führt zu einer starken Erhöhung der Wasserpermeabilität. Ein hAQP1-Monomer, als Prototyp der orthodoxen Aquaporine, ist in der Lage innerhalb einer Sekunde drei Milliarden Wassermoleküle zu transportieren (Zeidel *et al.*, 1992; Walz *et al.*, 1994).

Im Gegensatz dazu weisen die Aquaglyceroporine wie z. B. EcGlpF eine größere ar/R-Region mit einem Durchmesser von 3,4 Å. Trotzdem zeigen die meisten Aquaglyceroporine eine geringe bis fehlende Wasserleitfähigkeit (Borgnia *et al.* 2001; Wree *et al.*, 2011; Song *et al.* 2012). Dafür sind sie aber in der Lage, größere Moleküle zu transportieren wie z. B. Glycerol, Harnstoff oder Ammoniak (Heller *et al.*, 1980; Song *et al.*, 2012).

1.4 Ausschluss von Protonen und Kationen

Obwohl Wasser ein guter Protonenleiter ist, haben die Aquaporine strikte Mechanismen, um den Durchtritt von Protonen und Kationen zu verhindern (Beitz *et al.*, 2006; Steinbronn *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010).

Die Aquaporine verfügen über zwei Filter, die zusammen sehr effizient Protonen, Natrium- und Kaliumionen zurückhalten. Der erste Filter befindet sich in der NPA-Region. Die beiden kurzen Helices (HB & HE in Abb. 1.1) haben Dipolmomente, deren positive Partialladungen auf die Asparagine der NPA-Motive fokussiert sind. Somit herrscht im Zentrum der Pore ein positives elektrisches Feld, das einer ganzen Ladung entspricht. Dadurch werden Kalium- und Natriumionen zurückgehalten. Außerdem verstärken die Helix-Dipolmomente die Bildung von H-Brücken zwischen dem Wassersauerstoff und den Amidgruppen der Asparagine in den NPA-Motiven, so dass die H-Brücken zwischen dem zentralen und den benachbarten Wassermolekülen gespalten werden. Dies führt wiederum zur Zerstörung der

1. Einleitung

Clusterstruktur des Wassers im AQP-Kanal, was den Transport von Protonen durch den Grotthuss-Mechanismus verhindert.

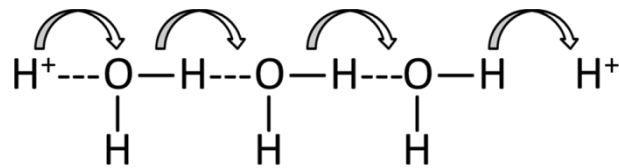


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Grotthuss-Mechanismus, bei dem die Ladung eines Protons entlang der Wasserstoffbrückenbindungen transportiert werden kann

Der zweite Filter befindet sich in der ar/R-Region. Durch die positive Ladung des Arginins wird der Durchtritt von Protonen durch elektrostatische Abstoßung verhindert. Dieser Ausschluss wird durch das teilweise protonierte Histidin verstärkt (Beitz *et al.*, 2006; Steinbronn *et al.*, 2009).

Für einen effizienten Ausschluss von Kationen einschließlich Protonen ist ein Zusammenspiel beider Filter notwendig. Die Beiträge der einzelnen Filterregionen verhalten sich nicht additiv. Erst durch Zerstörung beider Filter durch Mutationen (AQP1 N76D H180A R195V) geht die Ausschlussfähigkeit verloren (Steinbronn *et al.*, 2009).

1.5 Pharmazeutische Relevanz

Die Aquaporine spielen im menschlichen Körper eine große Rolle. Sie sind beteiligt an der Harnkonzentrierung, Regulation der Blutosmolarität, Wasserhomöostase, Transport von Glycerol im Fettgewebe und anderen Vorgängen (Jung *et al.*, 1994a; Nielsen *et al.*, 1996; Hamann *et al.*, 1998; Agre *et al.*, 2002; Beitz *et al.*, 2003). In Mikroorganismen sind sie (neben der einfachen Diffusion) der einzige Weg, um Wasser und Solute zu transportieren.

1. Einleitung

Die folgende Tabelle gibt eine Auswahl über die Funktion einiger Aquaporine:

Tabelle 1.1: Lokalisation und Funktion einiger Aqua-(glycero)-porine und damit verbundene Krankheiten

Aquaporin	Lokalisation im menschl. Körper bzw. Mikroorganismus	Funktion	Krankheiten
hAQP0	Augenlinse	Linsentransparenz	Katarakt
hAQP1	Erythrozyten & Niere	H ₂ O-Rückresorption	Tumore, Sjögren-Syndrom
hAQP2	Niere	Harnkonzentrierung	Diabetes insipidus
hAQP4	Gehirn & Blut-Hirn-Schranke	H ₂ O-Rückresorption	Hirnödeme
hAQP8	Herz, Lunge, Leber, Niere, Plazenta, Gehirn	H ₂ O- & NH ₃ -Transport	
hAQP9	Leber	Gluconeogenese	Adipositas
TbAQP 1-3	<i>T. bruci</i>	Soluttransport	Pentamidinresistenz
EcGlpF	<i>E. coli</i>	Glyceroltransport	
PfAQP	<i>P. falciparum</i>	Transport von H ₂ O, NH ₃ , Glycerol und andere	

Auf Grund ihrer wichtigen und vielfältigen Funktionen sind die Aquaporine interessante *drug targets* und Gegenstand aktueller pharmazeutischer Forschung.

Tolvaptan (SamscaTM, Aquaretikum seit August 2009) ist ein Antagonist von V₂-Rezeptoren. Durch Hemmung des Einbaus von hAQP2 in die Membran von Nierenzellen wird die Wasser-Rückresorption gehemmt ohne den Elektrolythaushalt zu beeinflussen.

Es gab auch Ansätze zur Entwicklung von spezifischen Hemmstoffen gegen PfAQP zur Behandlung der Malaria tropica. TbAQP steht in Verdacht, eine Rolle in der Resistenz-Entwicklung gegen Pentamidin und Melarsoprol zu spielen, was die Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit erschwert (Baker *et al.*, 2012). Außerdem laufen heutzutage auch Versuche zur Entwicklung von hAQP9-Hemmstoffen zur Behandlung von Adipositas. Auch in der Kosmetik werden Aquaporine eingesetzt. Im Verfahren der Aquaporation wird durch Radiowellen die Konformation der Aquaporine in der Haut geändert, so dass ihre Transportkapazität durch Lockerung der H-Brücken erhöht wird (Ästhetische Dermatologie (mdm) 2010 (5), 6-12).

Auf der anderen Seite sind einige Aquaporine im Geschehen bestimmter Krankheiten involviert. Z. B. hAQP1 und hAQP3 spielen eine Rolle bei der Proliferation von Tumorzellen. hAQP1 *knock out* Mäuse zeigen eine eingeschränkte Tumorangio-genese und hAQP3 *knock out* Mäuse sind resistent gegen Hautkrebs (Chakrabarti *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Verkman, 2009b).

1. Einleitung

Diese Daten zeigen die pharmazeutischen Interessen zur Aufklärung der Struktur und Funktion von Aquaporinen.

Deshalb wird versucht neue Testsysteme zu entwickeln, um die Aquaporine besser zu charakterisieren und essentielle Unterschiede zwischen den menschlichen Aquaporinen untereinander und Aquaporinen aus Krankheitserregern zu erkennen.

1.6 Testsysteme zur Charakterisierung von Aquaporinen

Zur Charakterisierung der Funktion von Aqua-(glycero)-porinen gibt es verschiedene Testmethoden wie z. B.:

- 1) phänotypische Tests auf festen Agar-Medium-Platten,
- 2) phänotypische Tests in Flüssigkulturen und
- 3) die biophysikalische *stopped flow* Methode

Jede Methode hat ihre Vor- und Nachteile. Die phänotypischen Tests auf festen Medien sind einfacher vorzubereiten und durchzuführen. Man lässt Zellen ohne AQP als Negativkontrolle und Zellen mit dem zu untersuchenden Aqua-(glycero)-porin auf einer Substrat-enthaltenden Medium-Platte wachsen. Durch Vergleich der Negativkontrolle mit den AQP-produzierenden Zellen kann man auf die Leitfähigkeit der Aquaporine für die interessierende Substanz schließen. Man kann auch mehrere Platten mit verschiedenen Konzentrationen herstellen, so dass ein konzentrationsabhängiges Wachstum beobachtet werden kann. Problematisch ist aber, dass viele Substanzen wie z. B. Glycerol, Ammoniak und Harnstoff durch Zellmembranen gut diffundieren können, was das Hintergrund-Wachstum verstärkt und bei langer Inkubation der Platten das Ergebnis verfälscht.

Bei der Untersuchung in Flüssigkulturen besteht der Vorteil, dass Wachstumskurven über mehrere Tage registriert werden können und somit der Einfluss von z. B. Gift- oder Hemmstoffen auf die einzelnen Wachstumsphasen der Zellen erkannt wird.

In beiden Fällen kann man nur erkennen, ob die interessierende Substanz durch das Aqua-(glycero)-porin transportiert wird oder nicht. Kinetische Daten wie z. B. Ratenkonstante, Geschwindigkeit oder Relaxationszeiten können nur mit der *stopped flow* Methode ermittelt werden.

Hierbei handelt es sich um eine biophysikalische Methode. Durch Mischung der AQP produzierenden Zellen mit Puffern, die hyper- oder hypoosmolar sind, kommt es zu einem osmotischen Schock. Um die Osmolarität über die Zellmembran auszugleichen, wird Wasser oder Solut transportiert, was das Zellvolumen ändert. Die Volumenänderung führt zu Änderung der Lichtstreuung, was als elektrisches Signal in Form einer Exponentialkurve gezeigt wird. Nach Bearbeitung der Kurven werden die kinetischen Parameter des Transportvorgangs ermittelt. Außer Verfolgung der Wasser- und Glycerolleitfähigkeit auf

1. Einleitung

Grund der Volumenänderung kann die *stopped flow* Methode Fluoreszenzänderungen registrieren. Dies wird zu Nutze gemacht, um die Ammoniakleitfähigkeit zu messen.

1.7 *P. falciparum* Aquaglyceroporin

Im Jahr 2002 wurde das Genom des Malariaerregers, *P. falciparum*, entschlüsselt. Danach erfolgte die Suche nach neuen Zielstrukturen für die Behandlung der *Malaria tropica*. Eins der gefundenen Ziele war das Aquaporin *pfaqp*. Die Analyse der Aminosäure-Sequenz ergab eine Ähnlichkeit von 50,4 % mit 35 % Identität zu dem bekannten Aquaglyceroporin aus *E. coli* (EcGlpF). Die Vermutung, dass es sich dabei um ein Aquaglyceroporin handelt, wurde durch Untersuchungen im Oozytensystem bestätigt. PfAQP transportierte Wasser mit einer Geschwindigkeit von $P_f = 276 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, was 91 % des Transports durch den wasserspezifischen Prototypen hAQP1 darstellt (Hansen *et al.*, 2002). Außerdem wurde eine Glycerolleitfähigkeit von $2\cdot 10^{-3} \text{s}^{-1}$ ermittelt. Im Gegensatz zu vielen Aquaglyceroporinen wie z. B. hAQP3, hAQP9, BccGlpF und EcGlpF wurde somit ein Aquaglyceroporin gefunden, welches im Oozytensystem für Wasser und Glycerol gut permeabel ist. Der Prototyp der Aquaglyceroporine (EcGlpF) hat in dem Oozytensystem eine zehnfach bessere Aufnahmerate für Glycerol als die Kontrolle (Maurel *et al.*, 1994). Seine Wasserleitfähigkeit konnte aber experimentell nicht nachgewiesen werden. Lediglich mit Hilfe von Computersimulationen wurde theoretisch eine gute Wasserleitfähigkeit vorhergesagt.

In 2008 betrafen widersprüchliche experimentelle Daten die Funktion von PfAQP. Die Funktion von PfAQP wurde von zwei unabhängigen Gruppen publiziert. Newby *et al.* haben die Kristallstruktur veröffentlicht und maßen in Proteoliposomen eine fünffach höhere Wasserleitfähigkeit ($k_{(\text{Wasser})} = 21,5 \text{s}^{-1}$) und eine sehr hohe Glycerol-Leitfähigkeit ($k_{(\text{Glycerol})} = 15,5 \text{s}^{-1}$) im Vergleich zu leeren Liposomen ($k_{(\text{Wasser})} = 4,5 \text{s}^{-1}$ bzw. $k_{(\text{Glycerol})} = 0,066 \text{s}^{-1}$). Dagegen zeigten Hedfalk *et al.* im gleichen Jahr eine fehlende Wasserleitfähigkeit von PfAQP in Hefeprotoplasten.

Zielsetzung I

Auf Grund dieser widersprüchlichen Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen sollte die *stopped flow* Methode für die Messung der Wasser- und Glycerolleitfähigkeit optimiert werden, um anschließend die Funktion von PfAQP in verschiedenen Polyolen (unterschiedliche Kettenlängen und Anzahl an OH-Gruppen) untersucht zu werden. Es wurden Hefeprotoplasten mit PfAQP, EcGlpF, rAQP1 und ohne AQP in Puffern mit Saccharose, Sorbitol, Glycerol und PEG300 präpariert.

1. Einleitung

EcGlpF diente als Positivkontrolle für die Glyceroleitfähigkeit. rAQP1 ist der Prototyp der wasserspezifischen Aquaporine und diente als Positivkontrolle. Protoplasten ohne AQP dienten in jedem Fall als Negativkontrolle.

1.8 Ammoniakleitfähigkeit von Aquaporinen

Ammoniak entsteht im menschlichen Körper vor allem durch den Abbau von Proteinen und Aminosäuren. Einige Mikroorganismen können Ammoniak aus Stickstoff enzymatisch bilden. Da Ammoniak gewisse Ähnlichkeiten zu Wasser hat (siehe Tabelle 1.2), wurden viele Aquaglyceroporine auf die Ammoniakleitfähigkeit getestet. Beispiele für Ammoniak leitende Aquaporine sind hAQP8 (Koyama *et al.*, 1998; Holm *et al.*, 2005; Bienert *et al.*, 2007), TbAQP1-3 (Zeuthen *et al.*, 2006), PfAQP (Zeuthen *et al.*, 2006) und TIP2;2 (Bertl *et al.*, 2007). In den meisten Experimenten wurde die Ammoniakleitfähigkeit durch Änderung des pH-Werts von Puffern oder im Inneren von Oozyten gemessen.

Tabelle 1.2: Vergleich einiger Wasser- und Ammoniak-Eigenschaften (Auswahl, berechnet mit Hilfe von <http://www.chemicalize.org/>):

Eigenschaft	H ₂ O	NH ₃
Volumen (Å ³)	19,51	22,86
Oberfläche (Å ²)	9,73	10,96
Länge (Å)	2,72	3,21
Dipolmoment	1,85	1,47
logP _{Oct/Wasser}	-0,65	-0,98

Zielsetzung II

Da Ammoniak gut durch Zellmembranen diffundieren kann, ist eine Messung der Ammoniakleitfähigkeit auf Grund Änderung der Lichtstreuung (noch) nicht möglich. Deswegen sollte im zweiten Teil dieser Arbeit die *stopped flow* Methode für die Ammoniakmessung auf Grund pH-abhängiger Fluoreszenzänderung von Hefezellen, die mit Fluoresceindiacetat (FDA) beladen worden sind, etabliert werden. Im Anschluss sollte die Ammoniakleitfähigkeit von PfAQP und hAQP8 gemessen werden.

1. Einleitung

1.9 Wasserstoffperoxidleitfähigkeit von Aquaporinen

Der dritte Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der H₂O₂-Leitfähigkeit von Aquaglycero-porinen.

Wasserstoffperoxid (H₂O₂) ist eine der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die für ihre schädigende Wirkung im Organismus bekannt sind. Sie können Zellproteine angreifen, was unter Umständen zur Apoptose führen kann. Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass die ROS und vor allem H₂O₂ eine wichtige Rolle in vielen Signaltransduktionswegen und als Enzymmodulatoren spielen (Chandrakuntal *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2004; Hee Joo *et al.*, 2001). Außerdem produzieren einige Mikroorganismen wie z. B. *P. falciparum* reaktive Sauerstoffspezies (Butzloff *et al.*, 2012) und verfügen über komplexe Mechanismen zu deren Detoxifikation (Qiu *et al.*, 2012).

Auf Grund der ähnlichen physikochemischen Eigenschaften von H₂O und H₂O₂ (Tabelle 1.3) besteht seit langer Zeit die Vermutung, dass Aquaporine H₂O₂ leiten können.

Tabelle 1.3: Vergleich einiger physikochemischer Eigenschaften von H₂O und H₂O₂

	H ₂ O	H ₂ O ₂
¹ Dichte (g·cm ⁻³)	0,998	1,450
¹ Dielektrizitätskonstante	80,4	73,1
¹ Dipolmoment	1,85·10 ⁻¹⁸	2,26·10 ⁻¹⁸
² Länge (Å)	2,72	3,52
² Volumen (Å ³)	19,51	28,34

¹: M. Ardon, Oxygen, W.A. Benjamin INC, New York, 1965.

²: <http://www.chemicalize.org/>

Zielsetzung III

In der Literatur gibt es wenige Daten über die H₂O₂-Leitfähigkeit von Aquaporinen. In zwei Publikationen wird über die direkte H₂O₂-Leitfähigkeit berichtet (Bienert *et al.*, 2006; Dynowski *et al.*, 2008). In allen anderen Veröffentlichungen werden Zusammenhänge zwischen Aquaporinen und H₂O₂-assoziierten Krankheiten oder Erscheinungen diskutiert. Deswegen sollte im Rahmen dieser Arbeit die H₂O₂-Leitfähigkeit von Aquaporinen und Aquaglycero-porinen genauer untersucht werden.

2. Materialien

2. Materialien

2.1 Kits

Promega, Madison, USA

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

Südlaborbedarf, Gauting

High Yield® PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit Extraction

2.2 Enzyme und Puffer

Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase (5 U·µl⁻¹), 10 × T4 DNA Ligase Puffer

Genaxxon BioScience, Ulm

Taq DNA Polymerase (5 U·µl⁻¹), Taq Standard Reaction Buffer 10×

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

ZYMOLYASE20T

New England BioLabs®, Ipswich, USA

OneTaq® DNA Polymerase (5 U·µl⁻¹), *OneTaq*® Standard Reaction Buffer 5 ×

2.3 Chemikalien

Applichem, Darmstadt

Tween®20, Glycin, 30 % (V/V) H₂O₂-Lösung, L-Prolin

Becton Dickinson, Heidelberg

Bacto™-Agar, Bacto™-Yeast Extract, Bacto™-Tryptone, Bacto™-Peptone, Difco™-Yeast Nitrogen Base w/o amino acids

Biochrom, Berlin

Penicillin, Streptomycin

2. Materialien

Bio-Rad, München

Bio-Rad Protein Assay-Reagenz

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

DTT

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Albumin Fraktion IV, ATP, Na₂HPO₄, EDTA, Glucose, Glycerol, Glycin, KCl, LB-Agar (Lennox), LB-Medium (Lennox), MgCl₂, Methanol, Milchkpulver, NaCl, Na₂HPO₄, NaOH, Rotiphorese Gel 40 (40 %), Saccharose, Sorbitol, Tris, Tween®20

Edmund Bühler, Hechingen

Schüttler

Genaxxon BioScience, Ulm

dNTP's, Agarose LE, Ampicillin-Natriumsalz, TEMED, SDS

Jackson Immuno Research Europe Ltd., Suffolk, UK

Ziege Anti-Maus IgG

Life Technologies

FDA, CM-H₂DCFDA

Merck, Darmstadt

APS, HCl, PEG300

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

Ethidiumbromid-Tabletten

MWG-Biotech, Ebersberg

Oligonukleotide (Primer)

Peqlab, Erlangen

peqGOLD *Prestained* Protein-Marker III

Roche Applied Science, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets, Anti-HA (12CA5) Antikörper

Sigma-Aldrich, München

APS, Mineralöl, Harnstoff, PEG 3350, DNA-Natriumsalz Typ II vom Lachssperma

2. Materialien

2.4 Geräte und Materialien

Adolf Wolf SANOclav, Bad Überkingen-Hausen

Sterilisationsautoklav

Beckmann Coulter, Krefeld

Optima™ XL-80 K Ultrazentrifuge, Rotor 50.2 Ti

Bio-Rad, München

Transblot® SD semidry transfer cell, Gene Pulser® II Electroporation System,
Spannungsquelle für Elektrophorese Power-Pac 200, Bio-Rad Protein Assay

Clemens, Waldbüttelbronn

Dualblock Primus advanced HT2X und Primus 25 mit HT Manager Software

Eppendorf, Hamburg

BioPhotometer, Kühlzentrifuge Centrifuge 5415R

GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

Wasserbad GFL®1083

H+P Labortechnik, Oberschleißheim

VARIOMAG MONO Magnetrührer

Heraeus Instruments, Osterode

Laborzentrifuge Multifuge 1S-R, Mikrozentrifuge Biofuge pico

Infors, Bottmingen, Schweiz

Brutschränke Infors HT

Jasco, Gross-Umstadt

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

Kern & Sohn, Balingen

Feinwaage ABS 120-4

2. Materialien

Kendro Laboratory Products, Hanau

UT 2 Trockenschrank

Merck Labsystems *Bioscreen C*

Desitometer, *Bioscreen C*

Mettler-Toledo, Gießen

RAININ Classic R Pipetten

Peqlab, Erlangen

SDS-PAGE-Kammer PerfectBlue® vertikales Dopplegelsystem Twin S, peqGold Protein-Marker III *Prestained*

Pharmacia Biotech, Dübendorf, Schweiz

Electrophoresis Power Supply-EPS 300

Roche Applied Science, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Lumi Imager™ F1

Sarstedt, Nümbrecht

Pipettenspitzen, Sterilfilter, Spritzen

Savant Instruments, Farmingdale, USA

Vakuumentrifuge DNA SpeedVac® DNA 110

Schleicher & Schuell, Dassel

Whatman Chromatography Paper 3MM

SCHOTT Instruments, Mainz

Digital-Labor-pH-Meter Lab 850

Scientific-Industries, Bohemia, USA

Vortex Genie 2

SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation, Barsbüttel

Reinstwasseranlage

Thermo Scientific, Schwerte

Hochdruck-Homogenisator *French Press cell disrupter* FA-078 mit French Press Zelle FA-032

2. Materialien

WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen

Heißluftsterilisator, Brutschrank

2.5 Plasmide

Die grafische Darstellung erfolgte mit dem Internet-Programm PlasMapper (<http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/jsp/librarySeq.jsp?id=Clontech15>)

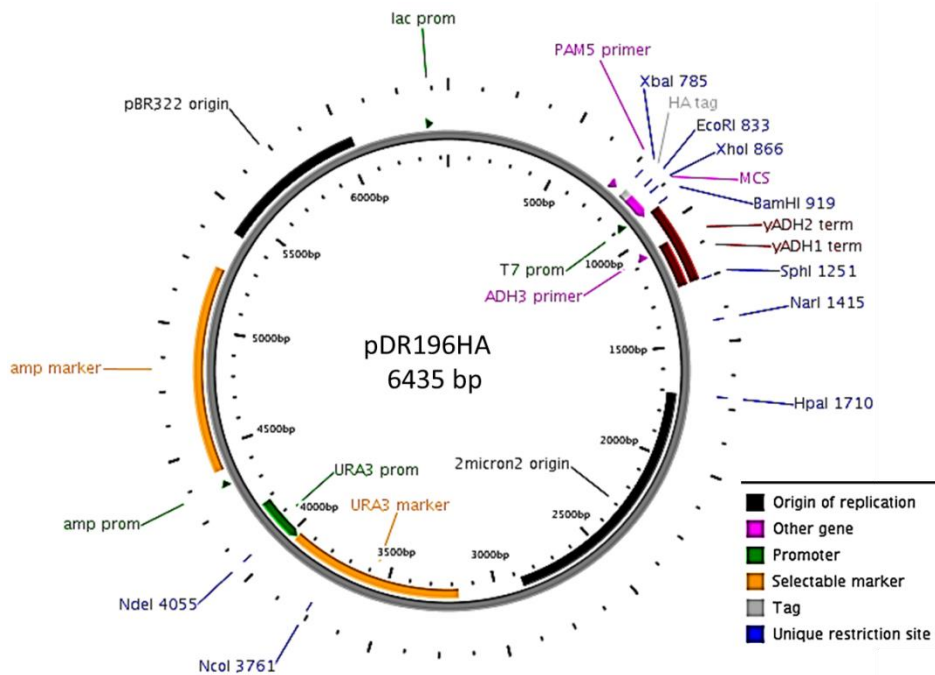


Abbildung 3: pDR196HA

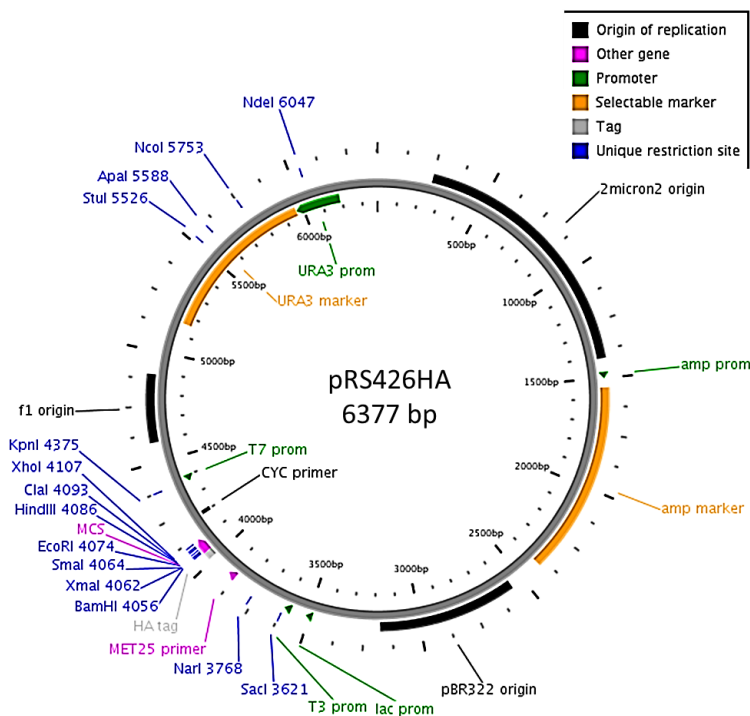


Abbildung 4: pRS426HA

2. Materialien

2.6 Oligonukleotide

2.6.1 Klonierungsprimer

Alle nachfolgenden Primer wurden am pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität hergestellt. Die Reinheit wurde mittels HPLC geprüft und die Konzentration photometrisch gemessen. Die Schnittstellen sind **fett** geschrieben.

Bezeichnung	Sequenz (Eingabe 5`bis 3`)	Sinn
dvUT- <i>SpeI</i>	GAGAA CTAGT ATGTTTGGAGAACAGTTGCTTAAG	s
dvUT- <i>XhoI</i>	GAG ACTCGAGT CAGCGAGACCCGATCGCGAGG	as
hUT-B- <i>SpeI</i>	GAGAA CTAGT ATGGAGGACAGCCCCACTATGG	s
hUT-B- <i>XhoI</i>	GAG ACTCGAGT CACAAAGGGCTTTCC	as
hAQP10- <i>SpeI</i>	GAGAA CTAGT ATGGTCTTCACTCAGG	s
hAQP10- <i>XhoI</i>	GAG ACTCGAGT CATAGCTTACTCC	as
hAQP12- <i>SpeI</i>	GAGAA CTAGT ATGGCTGGTCTTAACG	s
hAQP12- <i>XhoI</i>	GAG ACTCGAGT CAGCTGGAATGTGG	as
hAQP7- <i>BamHI</i>	GAGAG GGATCC ATGGTTCAAGCATCC	s
hAQP7- <i>EcoRI</i>	GAGAG AATTCT TAGAAGTGCTCTAGG	as
AQP10- <i>BamHI</i>	GAGAG GGATCC ATGGTCTTCACTCAGG 3	s
AQP10- <i>EcoRI</i>	GAGAG AATTCT CATAGCTTACTCCAGC	as
PfAQP- <i>PstI</i>	GAG ACTGCAGT GCATATGTTATTTTATAAATCATATGTTAGG	s
PfAQP- <i>Sall</i>	GAGAG TCGACTT ACAAATCTACACCATCTTTTTCATTATTTGC	as
hAQP1- <i>SpeI</i>	GAGAA CTAGT ATGGCCAGCGAGTTCAAGAAGAAGCTCTTCTGG	s
hAQP1- <i>XhoI</i>	GAG ACTCGAGT TTGGGCTTCATCTCCACCTGG	as
rAQP1- <i>SpeI</i>	GAGAA CTAGT ATGGCCAGCGAAATCAAGAAGAAGCTCTTCTGGAGGG	s
rAQP1- <i>Sall</i>	GAGAG TCGACTT TTGGGCTTCATCTCCACCC	as

2. Materialien

2.6.2 Sequenzierungsprimer

Die Sequenzierungsprimer sind am 5`Ende mit dem Fluoreszenzstoff IRD 800 markiert.

Bezeichnung	Sinn	Sequenz	Beschreibung
PMA5	s	CTCTCTTTTATACACACATTC	Für pDR196HA-Konstrukte
ADH3	as	CATAAATCATAAGAAATTCGC	
MET252	s	AGTAAAGCGTCTGTTAGAAAGG	Für pRS426HA-Konstrukte
CYC1	as	GACTTCAGATCCAGGGATA	

2.7 Verwendete *E. coli* Stämme:

DH5 α F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80d/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ -Hanahan, 1983

XL1-Blue endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ (lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) von Stratagene

2.8 Verwendete *S. cerevisiae* Stämme:

By4742 Δ fps1: MAT α , his3-1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0, yll043w::KanMX von Euroscarf

By4742 Δ fps1 Δ yfl054c: MAT α , his3-1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0, yfl054c::KanMX, fps1 Δ 0 vom Arbeitskreis Prof. Beitz

310 Δ fps1: MAT α ura3 mep1 Δ mep2 Δ ::LEU2 mep3 Δ :: KanMX2 fps1 Δ 0 vom Arbeitskreis Prof. Beitz

NY17 Δ fps1: MAT α , ura3-52, sec6-4 vom Arbeitskreis Prof. Beitz

2. Materialien

2.9 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden steril filtriert (0,2 µm Porenweite) oder bei 120 °C und 1 bar für mind. 20 min autoklaviert. Für Verdünnungen oder Ergänzung verdunsteter Wassermengen wurde ausschließlich autoklaviertes Reinstwasser benutzt.

2.9.1 Für Molekularbiologie

Agarose-Gelelektrophorese von DNA

50× TAE-Puffer
2 M Tris/Acetat pH 8,0
50 mM EDTA

10× Probenpuffer
0,4 % (V/V) Orange G
30 % (V/V) Glycerol
100 mM EDTA

λ-DNA-Marker
100 µl λ-DNA (30 µg/100 µl)
380 µl ddH ₂ O
54 µl 10× <i>Orange buffer</i>
6 µl <i>Pst</i> I
Über Nacht bei 37 °C inkubieren
bei -20 °C lagern

Ethidiumbromid-Lösung
1 Tablette $\hat{=}$ 100 mg
10 ml ddH ₂ O
bei 4 °C unter Lichtschutz

E. coli Nährmedien

LB-Medium
10 g·l ⁻¹ Trypton
10 g·l ⁻¹ NaCl
5 g·l ⁻¹ Hefeextrakt

LB-Agarplatten mit Amp
35 g·l ⁻¹ LB-Agar Lennox
100 mg·l ⁻¹ Ampicillin

2. Materialien

S. cerevisiae Nährmedien

I. Reichhaltiges Medium

Flüssiges YPD-Medium
10 g·l ⁻¹ Hefeextrakt
20 g·l ⁻¹ Pepton
20 g·l ⁻¹ Glucose

YPD-Agarplatten
20 g·l ⁻¹ Agar
1 l flüssiges YPD-Medium

II. Selektionsmedium für transformierte Zellen (SD KHL)

Flüssiges SD KHL-Medium
1,7 g·l ⁻¹ YNB
5 g·l ⁻¹ (NH ₄) ₂ SO ₄
20 g·l ⁻¹ Glucose
pH = 5,6 mit NaOH
steril filtrieren
1 ml 1000× Histidin-Lösung
1 ml 1000× Lysin-Lösung
5 ml 200× Leucin-Lösung

SD KHL-Agarplatten
1,7 g·l ⁻¹ YNB
5 g·l ⁻¹ (NH ₄) ₂ SO ₄
20 g·l ⁻¹ Glucose
pH = 5,6 mit NaOH
20 g·l ⁻¹ Agar
autoklavieren
1 ml 1000× Histidin-Lösung
1 ml 1000× Lysin-Lösung
5 ml 200× Leucin-Lösung

III. Selektionsmedium für die Ammoniak-Messung (SD KHLP)

Flüssiges SD KHLP-Medium
1,7 g·l ⁻¹ YNB
20 g·l ⁻¹ Glucose
pH = 5,6 mit NaOH
0,1 % Prolin
steril filtrieren
1 ml 1000× Histidin-Lösung
1 ml 1000× Lysin-Lösung
5 ml 200× Leucin-Lösung

Transformation von E. coli

1,5× LB
15 g·l ⁻¹ Trypton
15 g·l ⁻¹ NaCl
7,5 g·l ⁻¹ Hefeextrakt
10 mM PIPES, pH 6,5

TSS
15 ml 1,5× LB
4 ml 50 % PEG3350
0,4 ml Mg ₂ Cl
1 ml DMSO

2. Materialien

10× CM-Lösung
100 mM CaCl ₂
100 mM MgCl ₂

Transformation von *S. cerevisiae*

1 M Lithiumacetat
66 g Lithiumacetat
1 l ddH ₂ O

50 % PEG-Lösung
50 g PEG 3350
50 g ddH ₂ O

TE-Puffer
10 mM TRIS-HCl pH = 8
1 mM EDTA

sscDNA
200 mg sscDNA
100 ml TE-Puffer

Antibiotika zur Selektion

Stock
1000× Amp
1000× Tet

Volumen
100 mg·ml ⁻¹ in 50 % (V/V) Ethanol
15 mg·ml ⁻¹ in 50 % (V/V) Ethanol

2.9.2 Für die Proteinchemie

Präparation der mikrosomalen Proteinfraction

<i>extraction buffer</i>
20 mM TRIS/HCl, pH = 8,0
10 mM MgCl ₂
1 mM EDTA
1 mM DTT
5 % (V/V) Glycerol

<i>storage buffer</i>
20 mM TRIS/HCl, pH = 7,5
100 mM KCl
0,1 mM EDTA
1 mM DTT
10 % (V/V) Glycerol

50× Proteaseinhibitor
1 Tablette
Proteaseinhibitor-Mix
1 ml ddH ₂ O

2. Materialien

SDS-PAGE

4× Trenngelpuffer
1,5 M TRIS/HCl, pH = 8,8
0,4 % SDS

Kathodenpuffer
25 mM TRIS/HCl, pH = 8,3
192 mM Glycin
0,1 % SDS

SDS-Gel-Färbelösung
20 ml 5× Roti®-Blue
20 ml Methanol
60 ml Aqua bidest.

4× Sammelgelpuffer
500 mM TRIS/HCl, pH = 6,8
0,4 % SDS

4× SDS-Probenpuffer
250 mM TRIS/HCl, pH = 6,8
400 mM DTT
0,02 % Bromphenolblau A
8 % SDS
40 % (V/V) Glycerol

SDS-Gel-Entfärbelösung
10 % (V/V) Essigsäure
30 % (V/V) Ethanol

Western blot

5× Puffer A
25 mM TRIS/HCl, pH = 8,3
192 mM Glycin
0,04 % SDS

10× TBS-Puffer
0,2 mM TRIS/HCl, pH = 8,5
1,35 mM NaCl

MTBST-Puffer
3 % Milchpulver in TBST-Puffer

Primäre Antikörper
0,2 mg·ml ⁻¹ Maus Anti HA-Tag
0,2 mg·ml ⁻¹ Ziege Anti AQP1
0,2 mg·ml ⁻¹ Maus Anti AQP1
0,2 mg·ml ⁻¹ Kaninchen Anti AQP1

Transferpuffer
10 ml 5× Puffer A
10 ml Methanol
30 ml dem. Wasser

TBST-Puffer
100 ml 10× TBS-Puffer
0,1 % (V/V) Tween®20
ad 1 l mit dem. Wasser

Verdünnung
1:2000 in MTBST-Puffer

2. Materialien

Sekundäre Antikörper
0,8 mg·ml ⁻¹ Ziege-Anti-Maus
0,4 mg·ml ⁻¹ Ziege-Anti-Kaninchen
0,1 mg·ml ⁻¹ Esel-Anti-Ziege

Verdünnung
1:2000 in MTBST-Puffer

2.9.3 Für funktionelle Charakterisierung

Für Wasserleitfähigkeit mittels *stopped flow* Methode

Puffer I	Puffer II	Puffer III	Puffer IV
50 mM KH ₂ PO ₄	50 mM KH ₂ PO ₄	10 mM MOPS	10 mM MOPS
steril filtrieren	1,8 M Polyol	50 mM NaCl	50 mM NaCl
0,2 % (V/V) β-Mercaptoethanol	steril filtrieren	5 mM CaCl ₂	5 mM CaCl ₂
	0,2 % (V/V) β-Mercaptoethanol	1,2 M Polyol	1,8 M Polyol
		mit HCl pH auf 7,2	mit HCl pH auf 7,2
		steril filtrieren	steril filtrieren

Für Glycerolleitfähigkeit mittels *stopped flow* Methode

Die Puffer I bis III: siehe Wasserleitfähigkeit

isoosmotischer Glycerolpuffer IV
10 mM MOPS
50 mM NaCl
5 mM CaCl ₂
0,6 M Glycerol
0,6 M Polyol
mit HCl pH auf 7,2
steril filtrieren

hyperosmotischer Glycerolpuffer IV
10 mM MOPS
50 mM NaCl
5 mM CaCl ₂
0,6 M Glycerol
1,2 M Polyol
mit HCl pH auf 7,2
steril filtrieren

2. Materialien

Für Ammoniakleitfähigkeit mittels *stopped flow* Methode

Ladepuffer
50 mM MES, pH = 6
5 mM 2-Deox-D-Glucose
steril filtrieren
50 μ M FDA unmittelbar vor der Inkubation hinzufügen

FDA-Stock
5 mM FDA in DMSO

Inkubationspuffer I
10 mM TRIS/HCl, pH = 8
100 mM NaCl
steril filtrieren

Testpuffer I
10 mM TRIS/HCl, pH = 8
100 mM NH_4Cl
steril filtrieren

Für H_2O_2 -Leitfähigkeit auf Agarplatten

200 mM H_2O_2 -Lösung
1,02 ml 30 % (V/V) H_2O_2 -Lösung
ad 50 ml mit dd H_2O

- 250 ml SD KHL-Agar-Medium herstellen.
- Wenn das Medium lau warm ist, misst man 35 ml und gibt dazu:
 - o 35 μ l 200 mM H_2O_2 -Lösung \rightarrow 0,2 mM H_2O_2 -Medium-Platte
 - o 70 μ l 200 mM H_2O_2 -Lösung \rightarrow 0,4 mM H_2O_2 -Medium-Platte
 - o 105 μ l 200 mM H_2O_2 -Lösung \rightarrow 0,6 mM H_2O_2 -Medium-Platte
 - o 140 μ l 200 mM H_2O_2 -Lösung \rightarrow 0,8 mM H_2O_2 -Medium-Platte
 - o 175 μ l 200 mM H_2O_2 -Lösung \rightarrow 1,0 mM H_2O_2 -Medium-Platte

3. Methoden

3.1 Gentechnologische und molekularbiologische Arbeitsmethoden

3.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation ausgewählter DNA-Sequenzen für die nachfolgende Restriktion und Klonierung wurden die für die Aquaporine kodierenden DNA-Sequenzen oder die enthaltenden Plasmide als *template* DNA mit zwei spezifischen Oligonukleotidprimern (25 µM), Desoxyribonukleotiden (dNTPs, 2,5 µM), der DNA-abhängigen *Taq*- oder *OneTaq*-Polymerase und Puffer (mit 2 mM MgCl₂) in einem sterilen PCR-Reaktionsgefäß versetzt und mit sterilem Wasser auf 50 µl aufgefüllt.

Tabelle 3.1: Pipettierschema eines PCR-Ansatzes.

Standard-PCR
0,4 µl <i>template</i> DNA
0,8 µl Primer I
0,8 µl Primer II
4 µl dNTPs
10 µl 10 × PCR-Puffer
0,4 µl <i>OneTaq</i> -Polymerase
ad 50 µl H ₂ O

Tabelle 3.2: Standard-PCR-Programm

PCR-Programm		
Initiale Denaturierung	95 °C	3 Min
30 Zyklen		
Denaturierung	95 °C	30 sec
Primer- <i>Annealing</i>	T _a °C	30 sec
Elongation	68 °C	2 Min
Auffüllung	68 °C	5 Min
Kühlung	4 °C	∞

Es wurden 20-60 ng *Miniprep*-DNA als *template* eingesetzt. Die eingesetzten Primerpaare (2.6) wurden am pharmazeutischen Institut der CAU hergestellt. Die Reinheit wurde mittels HPLC und die Konzentration photometrisch bestimmt.

Für annäherungsweise Bestimmung der Schmelztemperatur (T_m) von Primern ≤ 30 Basenpaare (bp) wurde Gleichung 1 eingesetzt:

$$T_m = 4(n_{GC}) + 2(n_{AT}) \quad (GI\ 1)$$

wobei:

n_{GC}: Anzahl der GC-Basen.

n_{AT}: Anzahl der AT-Basen.

3. Methoden

Für Oligonukleotide länger als 30 bp eignet sich Gleichung 2:

$$T_m = 60 + 0,41(\text{GC}\%) - \frac{60}{n} \quad (\text{Gl 2})$$

Die *Annealing*temperatur (T_a) liegt 5 bis 10 °C unter der Schmelztemperatur. Sind die *Annealing*temperaturen der Primer unterschiedlich, so ist mit der niedrigeren Temperatur gearbeitet worden, wobei nur Unterschiede von ± 5 °C akzeptiert wurden.

Die Elongationszeit wurde an die Länge des erwarteten Produktes angepasst. Diese beträgt für die *Taq*- und *OneTaq*-Polymerase 0,5 bis 1 min je Kilobasenpaare (kb). Die Elongationstemperatur der *Taq*-Polymerase liegt bei 72 °C und für die *OneTaq*-Polymerase beträgt sie 68 °C.

Die Zyklenzahl von 30 wurde experimentell ermittelt. Sie hängt von mehreren Faktoren ab: i) Akkumulation von Endprodukten, vor allem Pyrophosphat, verlangsamt die Synthese, ii) die Substratkonzentration (Primer & dNTPs) nimmt ab und iii) die verstärkte Fehlhybridisierung nimmt zu.

Nach Abschluss der PCR wurde 1 μl des Restriktionsenzym *DpnI* zugegeben und weiter bei 37 °C für 2 bis 3 h inkubiert, um die *template* DNA abzubauen. Anschließend wurde die Temperatur auf 80 °C für 20 min erhöht, um das *DpnI* zu inaktivieren. Der Ansatz wurde anschließend auf Agarosegel aufgetragen und das PCR-Produkt aufgereinigt.

3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Wurde eine ausgewählte DNA-Sequenz mittels PCR amplifiziert, so wurde der komplette Ansatz nach Verdau der *template* DNA mit *DpnI* auf Agarosegel aufgetragen, um einerseits die Größe und Konzentration des PCR-Produktes durch Vergleich mit den Banden eines DNA-Markers zu bestimmen (3.1.4) und andererseits die Ziel-DNA von den sonstigen Bestandteilen des PCR-Ansatzes durch Extraktion aus dem Gel zu befreien (3.1.3). Nach Behandlung der PCR-Produkte und Plasmide mit Restriktionsendonukleasen (3.1.5) für die anschließende Ligation (3.1.6) wurden diese auch elektrophoretisch gereinigt.

In der Regel wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle gelöst. Nach Ergänzung der verdunsteten Wassermenge und 5 minütiger Abkühlung wurde vorsichtig 1 μl Ethidiumbromid-Lösung (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) zugegeben und das Gel gegossen. Die Elektrophorese-Kammer wurde mit TAE-Puffer gefüllt.

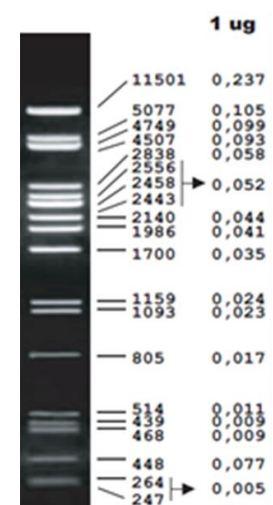


Abbildung 3.1: die mit *PstI* verdaute λ -DNA

3. Methoden

Das Probenvolumen wurde mit Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert (max. 23 μl). Nach Auftragen der Proben und 3 μl DNA-Marker wurde die Elektrophorese bei 120 V für 25 bis 35 min durchgeführt. Anschließend wurden die DNA-Banden unter der UV-Lampe bei 366 nm detektiert und fotografiert. Als Vergleichsmarker diente die mit *Pst*I verdaute Lamda-DNA (λ -DNA).

3.1.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Aufreinigung der DNA diente zur Erhöhung der Reinheit, Befreiung der PCR-Produkte von den sonstigen Bestandteilen oder zur Gewinnung bestimmter Fragmente nach Behandlung der Plasmide mit Restriktionsendonukleasen (3.1.5).

Nach beendeter Agarosegel-Elektrophorese wurden die zu reinigenden DNA-Banden ausgeschnitten, in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit dem *Hi Yield[®] SLG[®] PCR Clean-up/Gel Extraction-Kit* laut Herstellerangaben mit einigen Änderungen extrahiert. Es wurde *W1 Buffer* während des Waschens nicht zugegeben und nicht mit dem gelieferten *Elution Buffer*, sondern mit sterilem Wasser eluiert, da einige Elutionspuffer Ionen enthalten, die die Ligation oder PCR stören können. Außerdem wurde die Inkubationszeit vor der Elution auf 5 min verlängert.

3.1.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Elektrophoretische Bestimmung

Dafür wurden 1 bis 2 μl DNA und 5 μl DNA-Marker ($0,05 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) auf Agarosegel aufgetragen. Nach der Elektrophorese bei 120 V für 25 bis 35 min wurden die DNA-Banden unter der UV-Lampe detektiert und fotografiert. Durch Vergleich der Intensität der DNA-Bande mit den Marker-Banden kann die Konzentration abgeschätzt werden. Dazu diente auch die mit *Pst*I verdaute λ -DNA.

Photometrische Bestimmung

Alternativ kann die Konzentration photometrisch ermittelt werden. Dafür wurden 5 μl DNA mit Wasser auf 100 μl verdünnt und im Photometer gegen Wasser bei 260 nm gemessen. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der folgenden Formel:

$$c [\mu\text{g} / \text{l}] = E_{260\text{nm}} * f * \text{Verdünnug} \quad (\text{Gl 3})$$

wobei:

f: ist der Gerätefaktor und beträgt 0,02 für Oligonukleotide und Einzelstrang-DNA bzw. 0,04 für Plasmide und Doppelstrang-DNA

$E_{260\text{nm}}$: ist die Absorption bei 260 nm und soll $\in [0,2-0,8]$ liegen

3. Methoden

Der Photometer zeigt auch das Verhältnis $\frac{E_{260nm}}{E_{280nm}}$, welcher als Reinheitsmerkmal angesehen wird. Liegt dieses Verhältnis $\geq 1,8$, so kann man von Protein-freier DNA ausgehen. Liegt es aber $\leq 1,5$, so wurde die DNA wie unter 3.1.3 wieder gereinigt.

3.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau wurde eingesetzt, um in der AQP-DNA-Sequenz und im Plasmid kompatible Enden zu generieren, mit deren Hilfe die AQP-Sequenz (*insert*) und das Plasmid ligiert werden konnten (3.7). Da man für die anschließende Ligation immer zwei Enden braucht, wurden das *insert* und das Plasmid jeweils mit zwei unterschiedlichen Enzymen verdaut.

Tabelle 3.3: Pipettierschema eines Restriktionsansatzes

x μ l DNA
1,0 μ l Enzym I ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)
1,0 μ l Enzym II ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)
5,0 μ l Puffer 10 \times
ad 50 μ l ddH ₂ O

Es wurden 50 bis 100 ng DNA für den Verdau eingesetzt. Außerdem wurde angestrebt, einen Puffer zu finden, in dem beide Restriktionsendonukleasen ausreichende Aktivität aufweisen. War das nicht der Fall, so wurden das *insert* bzw. Plasmid zuerst mit dem einen Enzym in seinem Puffer verdaut, elektrophoretisch gereinigt und dann erfolgte der Verdau mit dem 2. Enzym in seinem Puffer.

Nach jedem Verdau erfolgte die Gelelektrophorese zur Reinigung (3.1.3) der DNA von den Verdaukomponenten. In jedem Fall wurden neben dem Verdauansatz sowohl der DNA-Marker als auch das unverdaute *insert* bzw. Plasmid als Kontrollen mitaufgetragen.

Zur Überprüfung, ob die Restriktionsstellen in einem Plasmid vorhanden sind bzw. ob die Restriktionsenzyme die für die Aquaporine kodierenden DNA-Fragmente nicht schneiden, wurde vor dem eigentlichen Restriktionsschritt ein Kontrollverdau in einem kleinen Ansatz durchgeführt.

Tabelle 3.4: Pipettierschema eines Kontrollverdaus

1 μ l DNA
0,5 μ l Enzym I
1,0 μ l Puffer 10 \times
7,5 μ l ddH ₂ O

3. Methoden

3.1.6 DNA-Ligation

Nach der elektrophoretischen Reinigung verdauter *inserts* und Plasmide wurden diese in einem molaren Verhältnis von 3:1 (*insert* : Plasmid) versetzt und mit Hilfe der T4 DNA-Ligase in ihrem Puffer ligiert.

Tabelle 3.5: Pipettierschema eines Ligationsansatzes

7,0 µl <i>insert</i>
1,0 µl Plasmid (50-100 ng)
1,0 µl T4 DNA-Ligase
1,0 µl 10 × T4 DNA-Ligase Puffer

Der Ansatz wurde anschließend über Nacht bei 16 °C, 30 min bei Raumtemperatur oder 20 min bei 37 °C inkubiert.

3.1.7 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Vormittags wurde eine Bakterienkolonie des Stammes DH5α oder XL1-Blue in 5 ml flüssigen LB-Mediums (mit 15 µg·l⁻¹ Tetracyclin für den XL1-Blue Stamm) suspendiert und bei 37 °C auf dem Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Abends wurden 100 ml LB-Medium (mit 15 µg·l⁻¹ Tetracyclin für den XL1-Blue Stamm) mit 0,5 ml der Vorkultur inokuliert und bei 20 °C auf dem Schüttler bei 200 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die OD₆₀₀ bestimmt. Wurde ein OD₆₀₀-Wert von 0,5 überschritten, so wurde die Hauptkultur auf OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt und wieder bis OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die 100 ml Kultur wurde dann auf Eis 10 min abgekühlt, auf zwei 50 ml sterile Reaktionsgefäße geteilt und bei 2000 × g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jedes *E. coli* Pellet in 15 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung durch langsames und vorsichtiges Schütteln (**kein Vortexen**) resuspendiert. Nach erneuter Abkühlung für 10 min auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand verworfen und 10 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung zugegeben. Nach Inkubation auf Eis für 20 min wurden die Zellen zentrifugiert und in 5 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 20 % (V/V) Glycerol resuspendiert. Beide *E. coli*-Suspensionen wurden vereinigt und über Nacht in der Eismaschine inkubiert. Am Tag 3 wurde die Zellsuspension aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

3. Methoden

3.1.8 Transformation von *E. coli*

Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen wurde eingesetzt zur Vermehrung von Ligationsprodukten oder zur Gewinnung neuer Plasmid-DNA für die Hefetransformation, zur Sequenzierung oder zur Restriktion mit Endonukleasen für (Um)-Klonierungsarbeiten. Ein Reaktionsgefäß chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde auf Eis 2 bis 3 min auftauen gelassen und anschließend 1 pg bis 50 ng DNA zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 1 min. Anschließend wurden 900 µl LB-Medium zugegeben und das Reaktionsgefäß bei 37 °C unter Schütteln für 45 bis 60 min vorinkubiert. 50 bis 100 µl wurden auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin als Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Nachmittag wurden Kolonien in 5 ml flüssigen LB-Mediums mit Ampicillin als Selektionsmarker suspendiert und wieder über Nacht inkubiert.

3.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA (*Miniprep*)

Nach Inkubation der *E. coli* Zellsuspension über Nacht wurden 2 ml bei 13.000 × g für 1 min zentrifugiert. Die Isolierung der DNA erfolgte nach Herstellerangaben des Kits *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*. Im Gegensatz zu den Herstellerangaben wurde die isolierte DNA nicht mit dem gelieferten *Elution buffer* eluiert, sondern mit 50 bis 100 µl Wasser. Mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese (3.1.2) wurden die Konzentration und die DNA-Größe durch Vergleich mit den λ-Markerbanden bestimmt.

3.1.10 Transformation von *S. cerevisiae*

Zur Untersuchung der Aquaporinfunktion eignet sich das Hefe-Testsystem. Dafür wurde eine große Hefekolonie in 5 ml YPD-Medium suspendiert und über Nacht bei 29 °C unter Schütteln bei 220 rpm inkubiert. Das Volumen des enthaltenden Kolbens betrug mindestens das fünf fache des Mediumvolumens, um ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff zu garantieren. Am nächsten Tag wurde die OD₆₀₀ photometrisch bestimmt (zwischen 5 und 10). Aus dieser Vorkultur wurden 50 ml YPD-Medium mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,2 inkubiert, bis die OD₆₀₀ einen Wert von 0,6 ± 0,1 (3 bis 4 h) erreichte. Danach wurden die Hefezellen bei 4000 × g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, mit 25 ml Wasser gewaschen und in 1 ml Wasser resuspendiert. Je nach Anzahl der gewünschten Transformationen wurden 80 bis 100 µl in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Abhängig von Anzahl der Transformationen wurden folgende Mastermix-Bestandteile zusammen versetzt:

3. Methoden

Tabelle 3.6: Zusammensetzung des Mastermix für die Hefetransformation

	μl für 1 Transformation	μl für 5+1 Transformation	μl für 10+1 Transformation
50 % (m/V) PEG 3350	240	1440	2640
1 M LiAc	36	216	396
sscDNA	50	300	550
ddH ₂ O	34	204	374
Gesamt	360	2160	3960

Das sscDNA-Gefäß wurde vorher in Wasser 5 min gekocht. Zu jedem Transformationsgefäß wurden 360 μl Mastermix und abhängig von der DNA-Konzentration 0,4 bis 0,8 μl DNA zugegeben. Die Zellen wurden durch Pipettieren resuspendiert und in dem Heizblock bei 42 °C für 45 bis 60 min inkubiert. Während der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße alle 20 min vorsichtig geschüttelt. Im Anschluss wurden die Zellen bei 13.000 $\times g$ für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 1 ml Wasser zugegeben. Das Hefepellet wurde durch langsames Pipettieren (**kein Vortexen**) resuspendiert. Auf den SD KHL-Agar-Platten wurden 70 bis 100 μl ausgestrichen und umgeben von Parafilm bei 29 °C 3 bis 5 Tage inkubiert.

3.1.11 Dauerkulturen von *E. coli* und *S. cerevisiae*

Da Zellen auf Agar-Medium-Platten maximal 4 Wochen im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt werden können, wurden Dauerkulturen (*glycerol stocks*) angelegt, die zur langfristigen Aufbewahrung der (transformierten) *E. coli* und *S. cerevisiae* Zellen dienen.

Es wurde eine Kolonie aus einer 2 bis 3 Wochen alten Platte in 5 ml Selektionsmedium gegeben und über Nacht bei 29 °C für *S. cerevisiae* bzw. 37 °C für *E. coli* im Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml der Zellsuspension zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 μl flüssigen Selektionsmediums und 500 μl 40 % (V/V) Glycerollösung resuspendiert und bei -80 °C dauerhaft aufbewahrt.

Wurde später eine neue Kultur der gleichen Zellen benötigt, so wurde von dem *glycerol stock* etwas Zellmaterial mit der Spitze der 1 ml Pipette entnommen und in 5 ml Selektionsmedium bei der entsprechenden Temperatur über Nacht inkubiert. Nach Bestimmung der OD₆₀₀ wurde die Hauptkultur angesetzt.

3. Methoden

3.1.12 Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm

Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) dient zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes der Ernte von Hefezellen zur weiteren Verarbeitung. In Schüttelkulturen gilt ein OD_{600} -Wert von 0,6 als Mitte der log-Phase, wo sich die Zellen mit maximaler Rate vermehren. Da die heterologe Genexpression und somit die Produktion von fremden Proteinen in der späten log-Phase einsetzt, wurde ein OD_{600} -Wert von 0,8 bis 1 zur Ernte der Zellen festgesetzt.

Die Messung der OD_{600} erfolgte photometrisch. Dazu wurden mind. 500 μ l Zellsuspension in Halbmikro-Küvetten pipettiert und gegen die reine Flüssigkeit vermessen. Waren die gemessenen Werte $\geq 0,8$, so wurde die Suspension entsprechend verdünnt.

Beim Ansetzen einer Hauptkultur wurde zunächst die OD_{600} der Vorkultur gemessen und mit Hilfe der folgenden Gleichung das benötigte Volumen an Vorkultur (V^*) berechnet.

$$V^* = \frac{V \cdot OD_{600}}{OD_{600}^*} \quad \text{GI4}$$

wobei:

V^* : das benötigte Volumen an Vorkultur (ml)

OD_{600}^* : OD_{600} der Vorkultur $\in (0,2-0,8)$

V: Volumen der Hauptkultur (ml)

OD_{600} : Start- OD_{600} der Hauptkultur

3.2 Proteinchemische Arbeitsmethoden

3.2.1 Isolierung der mikrosomalen Proteinfraction

Die mikrosomalen Membranproteine wurden isoliert, um nach der elektrophoretischen Trennung in SDS-Gelen die Aquaporine auf PVDF-Membrane zu transferieren und mit Hilfe von Antikörpern zu detektieren.

50 ml Hefekultur einer OD_{600} um 1 wurden bei $4.000 \times g$ und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 30 ml Wasser und erneuter Zentrifugation wurde das Hefepellet in 0,5 bis 1 ml *extraction buffer* resuspendiert. Dazu kamen 25 \times Protease-Inhibitor und das gleiche Volumen an Glasperlen (ein volles 1,5 ml Reaktionsgefäß). Die Glasperlen wurden vorher über Nacht in 1 M HCl gelegt und danach mit Wasser gewaschen und autoklaviert. Der Zellaufschluss erfolgte durch alternierendes Vortexen und Kühlen auf Eis für je 30 s. Nach 10 bis 15 Zyklen wurde der Ansatz bei $10.000 \times g$ und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in spezielle Reaktionsgefäße für die Ultrazentrifuge überführt. Nach

3. Methoden

Tarieren der Reaktionsgefäße wurde die mikrosomale Proteinfraction durch Zentrifugation bei $100.000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 45 bis 60 min im Vakuum gesammelt. Nach Entfernung des Überstandes wurde 1 bis 1,5 ml *storage buffer* und $25 \times$ Protease-Inhibitor zugegeben und das Pellet durch Vortexen und kräftiges Pipettieren resuspendiert.

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach der *Bradford*-Methode ermittelt. Dazu wurden 1 bis 5 μl Proteinsuspension mit Wasser auf 800 μl verdünnt. Dazu kamen 200 μl *Bradford*-Reagenz. Die Proben wurden gevortext und 5 min stehen gelassen. Anschließend erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei 595 nm gegen den *storage buffer*. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe von Kalibriergeraden ausgerechnet.

3.2.3 Erstellung der BSA-Kalibrierlösung

Zur Erstellung der Kalibriergeraden für die Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine arithmetische Verdünnungsreihe ausgehend von $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ BSA-Stammlösung in 1 M NaOH hergestellt. Es wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: 1 / 2,5 / 5 / 10 und $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Über entsprechende Funktionen des Photometers wurden die Konzentrationen eingegeben und die Absorption der BSA-Proben vermessen.

3.2.4 SDS-PAGE

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zur Trennung der mikrosomalen Proteine der Größe nach eingesetzt. Dafür wurden Sammel- und Trenngel wie in der folgenden Tabelle hergestellt

Tabelle 3.7: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels

	6 % Sammelgel	12,5 % Trenngel	16,67 % Trenngel
Sammelgelpuffer	1 ml		
Trenngelpuffer		3 ml	3 ml
Wasser	2,4 ml	5,25 ml	4 ml
40 % Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	0,6 ml	3,75 ml	5 ml
TEMED	6 μl	10 μl	10 μl
10 % APS	25 μl	80 μl	80 μl

3. Methoden

Die SDS-Gele wurden in die Elektrophorese-Apparatur eingebaut und einige Minuten stehen gelassen, damit sie auf Raumtemperatur kommen. Währenddessen wurden die Proteinproben mit dem SDS-Puffer versetzt und 30 min bei 37 °C solubilisiert. Waren feste Bestandteile noch sichtbar gewesen, so wurden die Proteinproben 1 min bei 13.000 × *g* zentrifugiert.

Danach wurden 15 bis 20 µl je Probe und 5 µl von dem peqGOLD *Prestained* Proteinmarker III in die SDS-Gel-Taschen pipettiert. Danach erfolgte die Trennung im Kathodenpuffer bei 100 V für ca. 60 min, um die Proteine im Sammelgel aufzukonzentrieren.

Bei Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf 120 bis 150 V für 60 bis 90 min erhöht. Waren die Markerbanden gut sichtbar aufgetrennt, so wurde die Elektrophorese beendet und die Gele für den folgenden *Western Blot* vorbereitet.

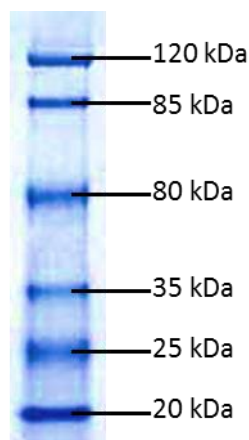


Abbildung 5.2: peqGold *Prestained* Proteinmarker III nachgezeichnet

3.2.5 *Western Blot*

Um die Aquaporine immunchemisch nachzuweisen, wurden die aufgetrennten Proteine durch *semi dry* Elektro Blot von dem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert und anschließend mit Antikörpern detektiert.

Während der letzten 10 Minuten der SDS-PAGE wurden sechs *Whatman* Papiere mit Kathodenpuffer 5 bis 10 min getränkt. Mit Methanol wurde eine PVDF-Membran pro SDS-Gel aktiviert und danach ca. 5 min im Kathodenpuffer inkubiert. Drei *Whatman* Papiere wurden luftblasenfrei auf die Anodenplatte gelegt und darauf die abgetropfte PVDF-Membran. Nach Auflage des SDS-Gels auf die Membran kamen die restlichen drei *Whatman* Papiere. Das ganze *Sandwich* wurde frei von Luftblasen zusammengedrückt und mit 2 ml Kathodenpuffer befeuchtet. Mit der Kathodenplatte wurde die *Blot*-Apparatur geschlossen und der Proteintransfer erfolgte bei 12 bis 15 V für 80 bis 90 min.

Die mit den Proteinen beladene Membran wurde in 3 % MTBST für 60 bis 90 min geschüttelt, um freie Stellen zu blockieren. Danach wurde die Membran mit 10 ml des ersten Antikörpers in 3 % MTBST im Kühlkeller bei 4 °C über Nacht auf dem Tischschüttler

3. Methoden

inkubiert. Am nächsten Tag wurde der erste Antikörper in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und die Membran durch zweimaliges Schwenken mit ca. 30 ml TBST und dreimalige Inkubation für 10 bis 15 min gewaschen. Anschließend wurden 10 ml des zweiten Antikörpers in 3 % MTBST zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Entfernung des zweiten Antikörpers erfolgte ein erneutes Waschen wie nach dem ersten Antikörper. Die Detektion erfolgte mit Hilfe von *ECL plus Western Blotting Detection System*. Die an dem zweiten Antikörper konjugierte Peroxidase katalysierte die Umsetzung von Luminol im Alkalischen mit H_2O_2 zum Dicarboxylat-Danion unter Chemilumineszenz. Die auftretende Lumineszenz wurde mit Hilfe des *Lumi Imager*TM F1 Gerätes detektiert.

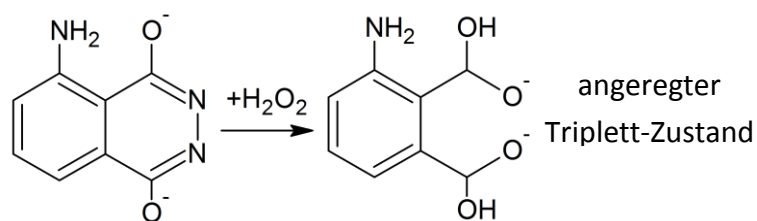


Abbildung 3.3: Die Chemilumineszenzreaktion

Die geblotteten Gele wurden mit *coomassie Brilliant Blau* gefärbt, um die Proteinbahnen sichtbar zu machen. Nach zwei stündiger Färbung wurden die Gele mit Entfärbelösung mehrmals gewaschen.

3.2.6 Isolierung sekretorischer Hefevesikel

Sekretorische Hefevesikel zeichnen sich durch hohe Stabilität und einheitliche Größe. Im Gegensatz zu Protoplasten haben Vesikel ein größeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis und einen höheren Anteil an Aquaporinen im Vergleich zu anderen Kanälen und Transportern.

Für die Gewinnung von Hefevesikeln wurde der Hefestamm NY17 Δ fps1 eingesetzt. Dieser Stamm weist ein Gendefekt auf, wodurch die Produktion eines löslichen 85 kDa Proteins beeinträchtigt, welches am Transport der Vesikel zur Zellmembran beteiligt ist. Dadurch werden die Vesikel im Cytosol sechsmal stärker akkumuliert, als in dem Wildtyp-Stamm. Dieser Effekt wird allerdings durch Inkubation bei 37 °C für einige Stunden ausgelöst. Deswegen müssen die Hefezellen im Selektionsmedium bei 25 °C wachsen gelassen und danach bei 37 °C inkubiert, damit es zur Akkumulation der Vesikel im Cytosol kommt (Potenza *et al.*, 1992).

Nach Transformation der Hefe NY17 Δ fps1 wie unter 3.12 beschrieben und Inkubation bei 25 °C für 3 bis 4 Tage auf SD KHL-Agarplatten wurde eine Hefekolonie in 3 ml SD HLK-Medium gegeben und über Nacht bei 25 °C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Am

3. Methoden

nächsten Tag wurden 100 ml SD KHL-Medium mit der Vorkultur inokuliert und weiter bis zu einer OD₆₀₀ von 2 inkubiert.

Die 100 ml Kultur wurde auf 5 l Medium im Fermenter verdünnt und folgende Parameter laut Angaben des Fermenterherstellers eingestellt:

Umdrehungszahl	200 rpm
pH-Wert	5,5
O ₂ -Sättigung	mind. 40 %
Temperatur	1) 25 °C zum Wachsen der Zellen 2) 37 °C in den letzten 4 Stunden zur Akkumulation der Vesikel

Der Fermentationsvorgang wurde in Gang gesetzt und aus Zeitgründen nach 40 Stunden beendet. Anschließend wurden die Zellen bei 4.000 × *g* und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Hefepellet (ca. 40 g) wurden resuspendiert und auf mehrere Reaktionsgefäße geteilt. Nach Zugabe des 25 × Protease-Inhibitors erfolgte der Zellaufschluss durch alternierendes Vortexen und Abkühlen auf Eis für jeweils 30 s.

Anschließend wurde die Suspension bei 10.000 × *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut bei 50.000 × *g* und anschließend bei 100.000 × *g* und 4 °C für 60 min. Das gewonnene Vesikelpellet wurde im Inkubationspuffer resuspendiert und durch eine Filtermembran (∅ = 100 nm) extrudiert.

3.2.7 Bestimmung der Vesikelgröße

Die Vesikelgröße wurde mit freundlicher Unterstützung des Arbeitskreises von Prof. Steckel mit Hilfe eines Zetasizer bestimmt. Der Zetasizer kann Partikel mit einem Durchmesser von 0,6 nm bis 6 µm erfassen. Die Ermittlung der Partikelgröße erfolgt durch die dynamische Lichtstreuung. In einer Suspension bewegen sich die Vesikel aufgrund der Brownschen Molekularbewegung. Dies führt zu Streuung des eingestrahnten Laserlichts der Wellenlänge 632 nm. Die Detektion des Streulichtes erfolgt in 90°. Die Streulichtintensität wird in verschiedenen Zeitintervallen registriert, wobei die Probe drei Läufen unterzogen wurde. In jedem Lauf wurden 10 Messungen vorgenommen, wobei jede einzelne Messung 10 s dauert.

3. Methoden

3.3 Methoden zur Charakterisierung der AQP-Funktion

Es wurden verschiedene Prinzipien und Methoden zur funktionellen Charakterisierung der Aqua-(glycero)-porine optimiert, neue Testverfahren entwickelt und etabliert. Im Allgemeinen herrschten drei Testmethoden:

- 1) phänotypische Methoden auf Agarplatten
- 2) phänotypische Methoden in Flüssigkulturen und
- 3) biophysikalische Fluoreszenz- und Lichtstreuungsmessungen.

3.3.1 Phänotypische Methoden auf Agarplatten

Dieses Testverfahren zeichnet sich durch einfache Vorbereitung der Zellen und kurze Durchführungszeiten aus. Im Prinzip wurden Agarplatten hergestellt, die die Substanz enthalten, deren Aufnahme durch Aqua(glycero)porine bestimmt werden soll.

Die Zellen, die zuvor mit dem leeren Plasmid (Kontrolle) oder mit dem AQP-Plasmid-Konstrukt transformiert worden sind, wurden auf die Agarplatten punktförmig pipettiert und bei 29 °C inkubiert.

Durch Vergleich des Wachstums der Kontrolle mit dem der AQP produzierenden Zellen konnte auf die Leitfähigkeit geschlossen werden.

3.3.1.1 H₂O₂-Aufnahmemessung auf Agarplatten

Hierbei wurden Agar-Medium-Platten hergestellt, die 0 / 0,2 / 0,4 / 0,6 / 0,8 und 1 mM H₂O₂ enthalten. Für diesen Test wurde der Hefestamm By4742Δfps1Δyfl054c wie unter 3.1.10 transformiert. 3 bis 5 ml einer Übernachtskultur mit einer OD₆₀₀ von 1 wurden bei 4.000 × g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und in 2 ml frischen Mediums resuspendiert. Die OD₆₀₀ wurde photometrisch gemessen und auf 1 eingestellt. Von dieser Stammsuspension wurde eine geometrische Verdünnungsreihe (1×10⁻¹ bis 1×10⁻⁴) vorbereitet. Auf den H₂O₂-Platten wurden 4 µl Zellsuspension je Verdünnung reihenweise pipettiert und 3 bis 4 Tage bei 29 °C inkubiert.

3.3.2 phänotypische Methoden in Flüssigkulturen

Mit diesem Verfahren wurde der Einfluss von H₂O₂ auf das Wachstum von Hefezellen über mehrere Tage verfolgt, so dass die Leitfähigkeit einiger Aqua(glycero)porine für H₂O₂

3. Methoden

bestimmt werden konnte. Der Test erfolgt in Mikrotiterplatten (100 *well plate*), wobei jedes *well* max. 360 μ l umfasst.

3.3.2.1 Bestimmung der Generationszeit

Der Hefestamm By4742 Δ fps1 Δ yfl054c wurde mit dem leeren Plasmid pDR196HA transformiert und eine Vorkultur vorbereitet. 3 ml dieser Vorkultur wurden zentrifugiert, gewaschen und in frischem SD KHL-Medium so resuspendiert, dass OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt war. Jeweils 300 μ l wurden in ein *well* pipettiert. Das Wachstum wurde über mehrere Tage im *Bioscreen*-Gerät verfolgt.

Folgende Parameter wurden eingestellt:

Wellenlängenbereich	420-580 nm
Temperatur	29 °C
Messung der OD	alle 30 min
Versuchsdauer	4 Tage

3.3.2.2. H₂O₂-Messung mit dem *Bioscreen*

3 bis 4 ml Übernacht-Zellkultur wurden bei 4.000 \times *g* und 4 °C für 5 min zentrifugiert und in frischem SD KHL-Medium so resuspendiert, dass OD₆₀₀ von 0,4 eingestellt war. Separat wurden SD KHL-Medien mit 0,6 / 1,2 / 1,6 mM H₂O₂ vorbereitet.

Anschließend wurden in ein *well* jeweils 150 μ l Hefesuspension und 150 μ l SD KHL-H₂O₂-Medium pipettiert, so dass sich die OD₆₀₀ und die H₂O₂-Konzentration halbierten, wobei jede Probe dreimal pipettiert wurde. Nachdem alle Proben aufgetragen worden sind, wurde die Platte in das Gerät eingelegt und das Programm mit dem oben genannten Einstellungen gestartet.

3.3.3 Biophysikalische Methoden mit der *stopped flow* Apparatur

Die *stopped flow* Methode eignet sich zur schnellen Registrierung der dynamischen Lichtstreuung und Fluoreszenzänderungen in sehr kleinen Volumina. Sie wurde eingesetzt, um die Wasser-, Glycerol- und Ammoniakleitfähigkeit zu messen.

3. Methoden

3.3.3.1 Messung der Wasserleitfähigkeit

Die Hefepartoplasten in Spritze III werden mit dem hyperosmotischen Puffer in Spritze I schnell gemischt und in die Küvette geleitet. Auf Grund des osmotischen Gradienten kommt es zu Wasseraustritt, wodurch sich das Volumen der Protoplasten verkleinert. Kleinere Protoplasten können das eingestrahlte Licht ($\lambda = 546 \text{ nm}$) stärker streuen, was von dem Detektor registriert, von dem Photomultiplier verstärkt und am Computer als eine exponentiell steigende Kurve gezeigt wird. Es wurden 9 Kurven pro Probe gespeichert und mit Hilfe der Biokine Software (Bio-Logic) die Mittelwertkurve berechnet und normiert. Ermittlung der kinetischen Parameter erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 11.0.

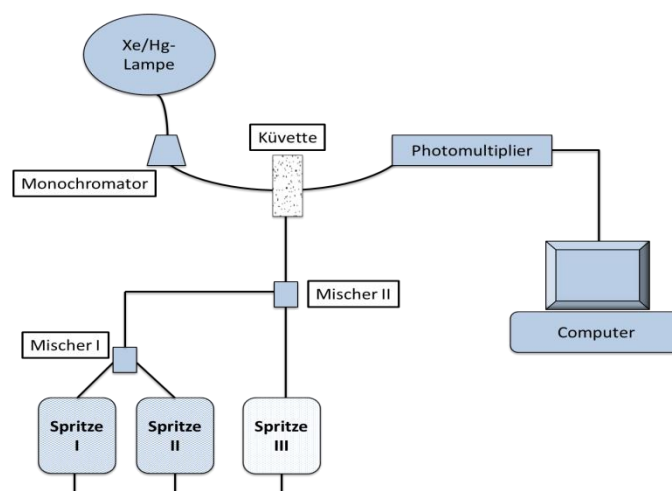


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der *stopped flow* Apparatur. Erklärung der einzelnen Teile und deren Funktion ist im Text.

Präparation von Hefepartoplasten

50 ml einer Übernacht-Kultur mit OD_{600} von $0,9 \pm 0,1$ wurden in einem ausgewogenen Reaktionsgefäß bei $4.000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 min zentrifugiert und mit 10 ml Puffer I gewaschen. Der Überstand wurde komplett entfernt (ggf. erneut für 2 min zentrifugieren und den restlichen Überstand abpipettieren). Durch Wiegen des Reaktionsgefäßes mit dem Hefepellet konnte das Nassgewicht (80 bis 120 mg) ermittelt werden. Danach wurden die Zellen in 3 ml Puffer I resuspendiert und für ca. 10 min bei $29 \text{ }^\circ\text{C}$ vorinkubiert. Dazu wurden 100 mg BSA, 200 U Zymolyase20T pro g Hefe-Nassgewicht und 6 ml Puffer II zugegeben. Danach erfolgte eine Inkubation für 50 bis max. 70 min bei $29 \text{ }^\circ\text{C}$ und 80 rpm.

Anschließend wurden die Protoplasten bei $2.000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 min zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 10 ml kalten Puffers III wurden die Protoplasten durch vorsichtiges Pipettieren (**kein Vortexen**) in 5 ml resuspendiert und bis zur Messung auf Eis oder bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ im Kühlschrank aufbewahrt.

Unmittelbar vor der Messung wurde ein Teil dieser Protoplastensuspension so verdünnt, dass mind. 4 ml mit OD_{600} von $2 \pm 0,2$ erhalten wurden (Gleichung 4).

3. Methoden

Beginn der Messung und Aufnahme der Kurven

10 min vor Beginn der Messung wurde die Xe/Hg-Lampe angeschaltet und auf 100 W eingestellt. Die Protoplasten werden in die Spritze III gezogen. Die Spritze I ist mit Puffer IV und Spritze II mit Wasser gefüllt. Die Stempel unter den Spritzen werden langsam hochgefahren, so dass die Luftblasen entweichen können. Das angeschlossene Wasserbad (nicht in der Abbildung gezeigt) temperierte die drei Spritzen auf 20 °C.

Mit Hilfe des Programms „Bio-Kine 32 V4.46“ wurden folgende Parameter eingestellt:

<i>mixing sequence</i>	Mischungsverhältnis	1:1
	Gesamtvolumen/Messung	202 µl
	Flussrate	14 ml·s ⁻¹
<i>Acquisition Setup</i>	Anzahl der Messpunkte	8000
	<i>sampling period</i>	5 ms
Photomultiplier	Verstärkung	400 ×
	<i>output filter</i>	3 ms

Mit diesen Einstellungen wurde die Messung gestartet und die registrierten Kurven wurden gespeichert und anschließend normiert.

Normierung der Wasserkurven

Zum Vergleich der Leitfähigkeit von Aquaporinen wurden die Mittelwertkurven normiert. Mit diesen normierten Kurven wurden der τ -Wert, die Ratenkonstante (k_{Wasser}) und der Koeffizient der Wasserleitfähigkeit ermittelt.

Die Mittelwertkurve wird mit der Biokine Software geöffnet und dann wird die x-Achse auf 2 bis 3 s verkürzt, so dass man mit dem *cross cursor* (Ziffer 1 in Abbildung 3.5) den ersten Punkt der Kurve anklicken kann. Unter der Schaltfläche „Math“ (Ziffer 2) findet sich die Option „*translate trace*“ (Ziffer 2.a in Abbildung 3.6). Klickt man diese an, so erscheint ein Dialogfenster mit den aktuellen Koordinaten des ausgewählten Punktes. Unter diesen gibt man die Koordinaten (0,0) und bestätigt mit OK. Dadurch verschiebt man das Koordinatensystem so, dass die Kurve bei (0,0) beginnt. Mit dem *cross cursor* wählt man nun den Beginn der Plateauphase und liest in der Bearbeitungsleiste den Wert der y-Achse (Ziffer 3 in Abbildung 3.5).

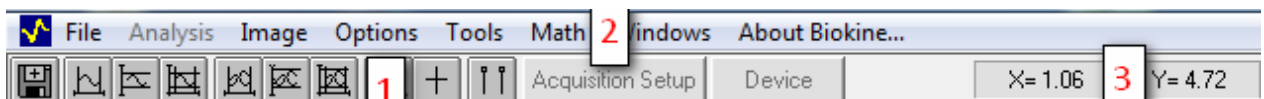


Abbildung 3.5: Ausschnitt vom Programm Bio-Kine 32 V4.46 für die Normierung von *stopped flow* Kurven.

3. Methoden

Unter der Schaltfläche „Math“ findet sich die Option „ $a \cdot (\text{File 1}) + b$ “ (Ziffer 2.b in Abbildung 3.6). Klickt man diese an, so erscheint ein Dialogfenster für die Kurvengleichung. In das Feld für die Konstante a gibt man den reziproken Wert der y-Achse ein und bestätigt mit OK. Dadurch wird die Plateauphase der Kurve auf den Wert 1 hoch gezogen und somit ist die Kurve auf (0,1) normiert. Die Kurven wurden als *.txt files* gespeichert, um sie mit dem Programm SigmaPlot 11.0 zu öffnen und damit die kinetischen Parameter zu bestimmen.

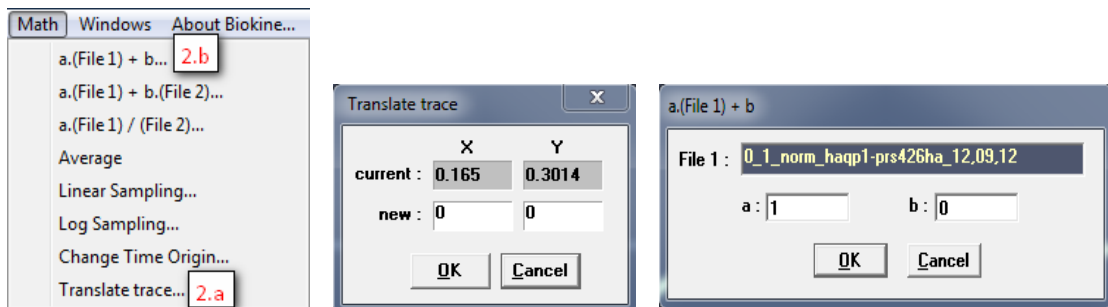


Abbildung 3.6: Die Schaltfläche „Math“ mit den Optionen „translate trace“ und der Kurvengleichung.

Ermittlung der Ratenkonstante (k_{Wasser}), des τ -Wertes und der transportierten Wassermenge

Ratenkonstante

Mit Hilfe des Programms SigmaPlot 11.0 wurden die normierten Kurven zu einer einfach oder zweifach exponentiellen Kurve gefittet. Für die einfache Exponentialfunktion gilt folgende Gleichung:

$$y = a(1 - e^{-k(\text{Wasser})t}) \quad (\text{Gl 5})$$

wobei:

a: Amplitude der Kurve. Für die normierten Kurven gilt $a = 1$.

$k_{(\text{Wasser})}$ = Ratenkonstante in s^{-1}

Für die zweifache Exponentialkurve gilt hingegen die Gleichung 6

$$y = a(1 - e^{-k_1 \cdot t}) + b(1 - e^{-k_2 \cdot t}) \quad (\text{Gl 6})$$

wobei:

a: Amplitude der ersten Phase mit k_1 als Ratenkonstante in s^{-1}

b: Amplitude der zweiten Phase mit k_2 als Ratenkonstante in s^{-1}

3. Methoden

In diesem Fall errechnet sich die Ratenkonstante (in s^{-1}) mit der folgenden Gleichung:

$$k_{(\text{Wasser})} = \frac{a \cdot k_1 + b \cdot k_2}{a + b} \quad (\text{GI 7})$$

τ -Wert (s)

Der τ -Wert ist die Zeit, bei der 63,2 % des Transportvorganges erreicht ist. Der Wert kann direkt an der Kurve bei $y = 0,632$ abgelesen werden. Er ist bei idealem exponentiellem Kurvenverlauf identisch mit dem reziproken Wert von $k_{(\text{Wasser})}$.

Koeffizient der Wasserleitfähigkeit

Der Wasserleitfähigkeitskoeffizient ist ein Maß für die Transportgeschwindigkeit und hat die Einheit ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$). Für die Berechnung wird die folgende Gleichung herangezogen:

$$P_{(\text{Wasser})} = \frac{k_{(\text{Wasser})} \cdot V_0}{S_0 \cdot V_w \cdot \Delta c} \quad (\text{GI 8})$$

wobei:

$k_{(\text{Wasser})}$: Ratenkonstante in s^{-1}

$V_0 = 6,5 \cdot 10^{-8} \text{ m}^3$ ist Protoplastenvolumen

$S_0 = 7,9 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2$ ist Protoplastenoberfläche

$V_w = 18 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ist das molekulare Wasservolumen

$\Delta c = 300 \text{ mOsm} \cdot \text{l}^{-1}$ ist der osmotische Gradient in der Messküvette

Transportierte Wassermenge

Zur Ermittlung der transportierten Wassermenge kann die Fläche unter der **nicht normierten** Kurve (AUC) herangezogen werden. Dies kann mit SigmaPlot 11.0 berechnet und angezeigt werden.

3.3.3.2 Messung der Glycerolleitfähigkeit

Bei Messung der Glycerolleitfähigkeit von Aquaglyceroporinen wurden ebenfalls Protoplasten hergestellt und in dem Puffer III inkubiert. Die Messung in der *stopped flow* Apparatur erfolgte gegen einen Glycerol enthaltenden isoosmotischen Messpuffer (0,6 M Glycerol + 0,6 M Polyol) oder gegen einen hyperosmotischen Puffer (0,6 M Glycerol + 1,2 M Polyol).

Bei Mischen der Protoplasten mit dem isoosmotischen Messpuffer herrschte in der Mischung ein chemischer Glycerol-Gradient von 300 mOsm, auf Grund dessen Glycerol durch die Aquaglyceroporine in die Protoplasten transportiert wurde. Das einströmende

3. Methoden

Glycerol zog Wasser mit sich, wodurch die Protoplasten angeschwollen und das eingestrahlte Licht ($\lambda = 546 \text{ nm}$) weniger gestreut haben. Es resultiert eine exponentiell abfallende Kurve.

Bei Mischen mit dem hyperosmotischen Messpuffer resultierte eine zweiphasige Kurve. In der ersten Phase wurde den Protoplasten auf Grund der Hyperosmolarität Wasser entzogen. Die Protoplasten schrumpften und konnten das eingestrahlte Licht stärker streuen. Die Kurve stieg exponentiell. Gleichzeitig setzte sich der Glyceroleinstrom in die Protoplasten auf Grund des chemischen Gradienten ein. Dadurch schollen die Protoplasten auf und die Lichtstreuung nahm wieder ab. Die Kurve fiel ab. In jedem Fall wurden 9 Kurven registriert und daraus die Mittelwertkurve berechnet. Anschließend wurden die Kurven normiert.

Normierung der Glycerolkurven

Bei Messung der Glycerolleitfähigkeit mit dem isoosmotischen Puffer resultierte eine exponentiell abfallende Kurve. Der Beginn der Plateauphase wurde zunächst mit *cross cursor* markiert. Unter „*translate trace*“ wurde der y-Achsenwert auf 0 geändert. Dann wurde der Beginn der Kurve mit dem „*cross cursor*“ markiert, den y-Achsenwert abgelesen und die Kurve dem reziproken Wert multipliziert. Die normierte Kurve wurde als *.txt file* gespeichert.

Bei Messung mit dem hyperosmotischen Puffer (0,6 M Glycerol + 1,2 M Polyol) resultierte eine zweiphasige Kurve, deren Verlauf der Bateman-Funktion ähnelt. Die x-Achse wurde zuerst verkürzt, so dass der Beginn des steigenden Kurventeils mit dem „*cross cursor*“ gewählt wurde. Die Koordinaten wurden dann mit Hilfe der Option „*Math* → *translate trace*“ auf (0,0) geändert. Die Kurve wurde dann als *.txt file* gespeichert.

Ermittlung der Ratenkonstante und des τ -Wertes

Ratenkonstante bei isoosmotischer Messung:

Die Mittelwertkurve aus der Messung mit dem isoosmotischen Puffer wurde mit dem Programm SigmaPlot 11.0 geöffnet und zu einer einfach exponentiellen Kurve gefittet. Dafür gilt folgende Gleichung

$$y = ae^{-k(\text{Glycerol})t} + b \quad (\text{Gl 9})$$

wobei:

a: Amplitude der Kurve soll nah 1 liegen

b: der y-Achsenabschnitt

$k_{(\text{Glycerol})}$: Ratenkonstante für die Glycerolleitfähigkeit in s^{-1} .

3. Methoden

Für die normierten Kurven gilt $a = 1$ und $b = 0$. Somit kann Gleichung 9 vereinfacht werden:

$$y = e^{-k(\text{Glycerol})t} \quad (\text{GI } 10)$$

Ratenkonstante bei hyperosmotischer Messung

Hierbei resultierte eine zweiphasige Kurve; der steigende Teil der Kurve repräsentiert den Wasserausstrom aus den Protoplasten und der abfallende Teil den Glyceroleinstrom in die Protoplasten.

$$y = a (1 - e^{-k(\text{Wasser})t}) + b e^{-k(\text{Glycerol})t} \quad (\text{GI } 11)$$

wobei:

a: Amplitude für den Wasseraustritt mit der Ratenkonstante $k_{(\text{Wasser})}$ in s^{-1}

b: Amplitude des Soluteinstroms mit der Ratenkonstante $k_{(\text{Glycerol})}$ in s^{-1}

τ -Wert

Bei dem exponentiell abfallenden Kurvenverlauf ist der τ -Wert die Zeit, bei der 36,8 % des Transportvorgangs erreicht worden ist. Dafür liest man den Wert der x-Achse bei $y = 0,368$.

Bestimmung des τ -Wertes von zweiphasigen Vorgängen, wie bei der hyperosmotischen Glycerolmessung, ist kompliziert, da wir dabei mit gemischten Vorgängen zu tun haben, die sich zeitlich abschneiden.

Koeffizient der Glycerolleitfähigkeit

Genauso wie bei der Wassermessung gilt hier der Glycerolleitfähigkeitskoeffizient als Maß für die Transportgeschwindigkeit. Der Koeffizient lässt sich folgendermaßen berechnen:

$$P_{(\text{Glycerol})} = \frac{K_{(\text{Glycerol})} V_0 c_{\text{ges}}}{S_0 \Delta c} \quad (\text{GI } 12)$$

wobei:

$k_{(\text{Glycerol})}$: Ratenkonstante für die Glycerolleitfähigkeit in s^{-1}

$V_0 = 6,5 \times 10^{-8} \text{ m}^3$ ist Protoplastenvolumen

$S_0 = 7,9 \times 10^{-5} \text{ m}^2$ ist Protoplastenoberfläche

c_{ges} : Glycerolkonzentration in M

$\Delta c = 300 \text{ mOsm} \cdot \text{l}^{-1}$ ist der chemische Gradient des Soluten in der Messküvette.

3. Methoden

3.3.3.3 Messung der Ammoniakleitfähigkeit

Die Messung der Ammoniakleitfähigkeit der Aquaglyceroporine erfolgte durch Verfolgung der Fluoreszenzänderung in intakten Hefezellen.

Beladung der Zellen mit Fluoresceindiacetat (FDA)

Zur Untersuchung der Ammoniakleitfähigkeit von Aquaglyceroporinen wurden Hefezellen mit Fluoresceindiacetat (FDA) beladen und mit einem Ammoniak enthaltenden Puffer in der *stopped flow* Apparatur gemischt.

Ein Hefeklon wurde in 3 bis 4 ml SD KHL-Medium suspendiert und über Nacht bei 29 °C inkubiert. Am nächsten Nachmittag wurde die OD₆₀₀ photometrisch gemessen und eine Hauptkultur von 40 ml mit einer Start-OD₆₀₀ von ca. 0,05 über Nacht inkubiert. Am Tag der Messung wurden die Hefezellen bei 4.000 × g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und mit 30 ml Wasser gewaschen. Es wurde immer auf komplettes Entfernen des Wassers durch Abpipettieren geachtet. Danach wurden die Zellen in 1 ml Ladepuffer resuspendiert, die OD₆₀₀ durch 1:100 Verdünnung bestimmt und dann so mit Ladepuffer weiter verdünnt, dass eine OD₆₀₀ von ca. 50 ± 5 eingestellt war. Dazu kam das entsprechende Volumen an 5 mM FDA-Lösung in DMSO, so dass eine Endkonzentration von 50 µM erreicht war. Die Suspension wurde möglichst genau 10 min inkubiert. Dann wurden die Zellen bei 4.000 × g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Nach Entfernung des gelben Überstandes wurden die Zellen zwei Mal mit 5 ml Inkubationspuffer gewaschen und darin resuspendiert. Die nun beladenen und gelb gefärbten Zellen wurden sofort und während der weiteren Prozedur immer auf Eis gehalten. Unmittelbar vor der Messung wurde ein Teil so verdünnt, dass mind. 5 ml mit OD₆₀₀ von 10 ± 0,5 erhalten waren.

Stopped flow Parameter

Xe/Hg-Lampe	λ	490 nm
	<i>cut off filter</i>	> 512 nm
<i>mixing sequence</i>	Mischungsverhältnis	1:1
	Gesamtvolumen/Messung	202 µl
	Flussrate	14 ml·s ⁻¹
<i>Acquisition Setup</i>	Anzahl der Messpunkte	8000
	<i>sampling period</i>	20 ms
Photomultiplier	Verstärkung	400 ×
	<i>output filter</i>	30 µs

3. Methoden

Mit diesen Einstellungen wurde die Messung gestartet und die registrierten Kurven wurden gespeichert und anschließend normiert.

Normierung der Ammoniakkurven

Im Gegensatz zur Messung der Wasser- und Glycerolleitfähigkeit wurde bei der Ammoniakmessung keine Plateauphase erreicht. Durch den Ammoniakstrom in die Hefezellen steigt die Fluoreszenz zunächst exponentiell und dann ging die Kurve in eine linear steigende Gerade über. Der Beginn der Kurve wurde auf 0 herabgesetzt und der Beginn des linearen Teils auf 1 normiert.

Ermittlung der Ratenkonstante und des τ -Wertes

Ratenkonstante

Die Mittelwertkurve wurde mit dem Programm SigmaPlot 11.0 zu einer einfach exponentiellen Kurve gefittet. Hierzu gilt die Gleichung

$$y = a(1 - e^{-k(\text{Ammoniak})t}) \quad (\text{Gl 13})$$

wobei:

a: Amplitude der Kurve. Für die normierten Kurven gilt $a = 1$.

$k_{(\text{Ammoniak})}$ = Ratenkonstante in s^{-1}

τ -Wertes

Zur Ermittlung des τ -Wertes wird die Zeit an der x-Achse bei $y = 0,632$ abgelesen.

3.3.3.4 Untersuchung der Molenbruch-Anomalie

Für die Untersuchung, ob sich zwei verschiedene Solute in ihren Leitfähigkeiten beeinflussen können, wurde ein einfaches Testsystem mit der *stopped flow* Apparatur aufgebaut und verwendet.

Die in Puffer III inkubierten Protoplasten wurden mit einem Messpuffer gemischt, der eine Mischung aus Glycerol und Harnstoff in folgenden Anteilen enthält: 0/1, 1/3, 2/3, und 1/0 Glycerol zu Harnstoff.

3. Methoden

Hierfür wurden auch 2 Puffersysteme wie bei der Glycerolmessung eingesetzt:

- 1) Bei Messung mit isoosmotischem Puffer (0,6 M Saccharose + 0,6 M Glycerol/Harnstoff-Mischung) betrachtet man einen exponentiell abfallenden Verlauf der Kurve.
- 2) Bei Messung mit hyperosmotischem Puffer (1,2 M Saccharose + 0,6 M Glycerol/Harnstoff-Mischung) betrachtet man einen zwei phasigen Verlauf der Kurve, der der Bateman-Funktion entspricht.

Normierung der Solutmischungskurven

Die Kurven wurden genauso normiert wie bei der Messung der Glycerolleitfähigkeit.

Ermittlung der Ratenkonstante und den τ -Wertes

Die Messungsparameter wurden hier ebenfalls wie bei Messung der Glycerolleitfähigkeit ermittelt, da hier die gleichen Verhältnisse herrschten und dadurch die gleichen Erscheinungen resultierten.

4. Ergebnisse

4.1 Optimierung der *Stopped flow* Methode

Vor Durchführung der eigentlichen Messungen der Wasser- und Solutleitfähigkeit wurden einige Parameter kontrolliert und bestimmt.

4.1.1 Findung der optimalen Zymolyase20T-Konzentration

Zymolyase20T ist ein Enzymgemisch mit β -1,3-Glucan-Laminaripentaohydrolase als Hauptkomponente, die β -1,3 glykosidische Bindungen von Glucosepolymeren zu Laminariapentaosen (Glucosepentameren) spaltet. Dadurch wird die rigide Zellwand der Hefezellen aufgelockert, so dass Volumenänderungen auf Grund des Transportes von Wasser oder Soluten besser detektiert werden; man erhöht also die Empfindlichkeit der Messung. Problematisch ist aber, dass die Zymolyase Proteaseaktivität von $1 \cdot 10^4 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$ hat. Deswegen dient der Zusatz von 100 mg BSA dem Schutz der Zellproteine und darunter der Aquaporine.

Da man in der Literatur verschiedene Angaben für optimale Protoplastierung findet wie z. B. 50 bis $100 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ (Hersteller), $450 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ (Walworth & Novick, 1987) und $600 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ (Nakamoto *et al.*, 1991) wurden 100 ml Hefekultur mit einer OD_{600} von 1 auf 5 Reaktionsgefäße a 20 ml geteilt, zentrifugiert und mit verschiedenen Zymolyase20T-Mengen versetzt, so dass folgende Konzentrationen erhalten wurden:

Tabelle 4.1: Zur Bestimmung der optimalen Zymolyase20T-Konzentration wurde eine Kultur auf mehrere Gefäße geteilt und mit den folgenden Enzym-Einheiten pro Gramm Hefe versetzt.

Gefäß	Zymolyase20T ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	100
2	200
3	400
4	600
5	800

Nach beendeter Protoplastierung wurde mit den einzelnen Fraktionen der Wassertransport aus den Protoplasten gemessen. Anschließend wurden die Kurven normiert und die Ratenkonstanten bestimmt.

4. Ergebnisse

Die Abbildung 4.10 zeigt die Schumpfkurven der einzelnen Fraktionen. Hierbei wurden die Protoplasten einem auswärts gerichteten osmotischen Gradienten von 150 mOsm ausgesetzt. Dadurch wurde den Protoplasten Wasser entzogen; sie schrumpften und streuten das Licht stärker. Mit $200 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ erhält man den besten Kurvenverlauf und die höchste Ratenkonstante. Die Kurve zeichnet sich durch geringes Rauschen im Vergleich zu 100 und $400 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. Außerdem werden 600 und $800 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ von den meisten Arbeitsgruppen als hoch eingestuft.

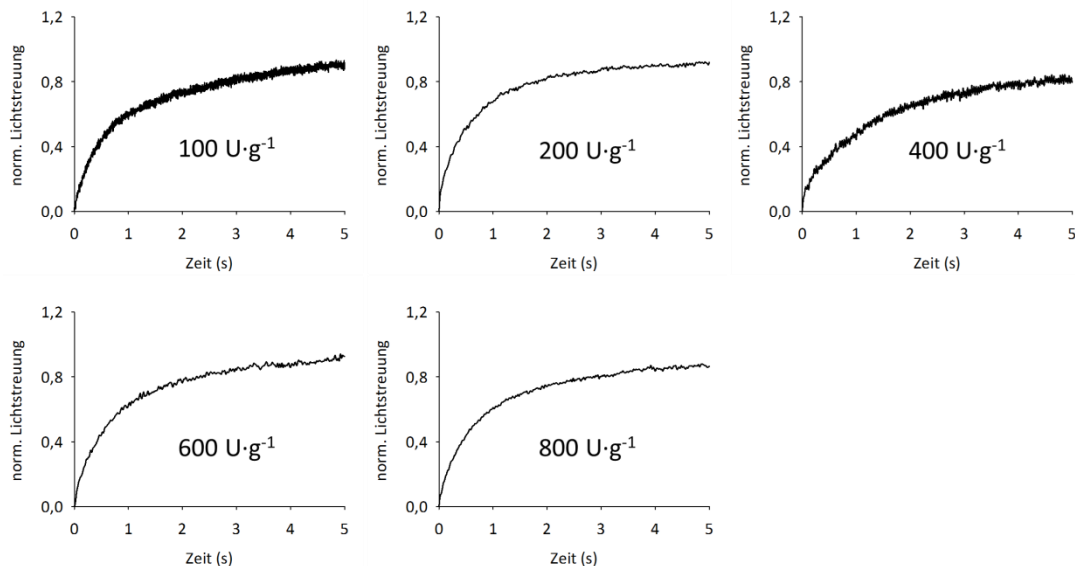


Abbildung 4.10: Ermittlung der optimalen Zymolyase20T-Konzentration für ausreichende Protoplastierung. Gemessen wurde der Wasseraustritt aus den Protoplasten auf Grund des osmotischen Gradienten von 150 mOsm auswärts.

Die Tabelle 4.2 zeigt die berechneten Ratenkonstanten der einzelnen Fraktionen. Die Werte sind sehr ähnlich. Der höchste Wert von $1,79 \text{ s}^{-1}$ wurde mit $200 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ erreicht. Auf Grund der Kurvenverläufe und Ratenkonstanten wurden alle weiteren Protoplastierungen mit $200 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ durchgeführt.

Tabelle 4.2: Die Ratenkonstanten aus den Schwellkurven. Die Werte wurden mit Hilfe des Programmes SigmaPlot 11.0 nach dem Kurvenfitting ermittelt.

Gefäß	c ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)	K-Wert (s^{-1})
1	100	1,52
2	200	1,79
3	400	1,68

Gefäß	c ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)	K-Wert (s^{-1})
4	600	1,45
5	800	1,45

4. Ergebnisse

4.1.2 Lagerfähigkeit von Protoplasten

Für Bestimmung der Lagerfähigkeit von Protoplasten im Inkubationspuffer wurden 150 ml Hefekultur mit OD_{600} von 1,3 zentrifugiert und gewaschen. Die Protoplastierung erfolgte mit $200 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ Zymolyase20T. Nach der Protoplastierung (Tag 0) wurde der Wasseraustritt auf Grund eines auswärts gerichteten Gradienten von 150 mOsm gemessen.

Nach Lagerung der Protoplasten über das Wochenende wurde der Wasseraustritt an drei weiteren Tagen gemessen (Tag 3 bis 5).

Aus der Abbildung 4.11 wird ersichtlich, dass sich die Schrumpfeigenschaften der Protoplasten nicht verändert haben. Dies wurde auch durch die τ -Werte der einzelnen Messungen bestätigt. Die τ -Werte liegen bei $2,32 \pm 0,14 \text{ s}$. Diese Stabilität der Protoplasten in dem Inkubationspuffer hat den Vorteil, dass man die Wasser- oder Solubleitfähigkeit einige Tage nach der Präparation messen kann.

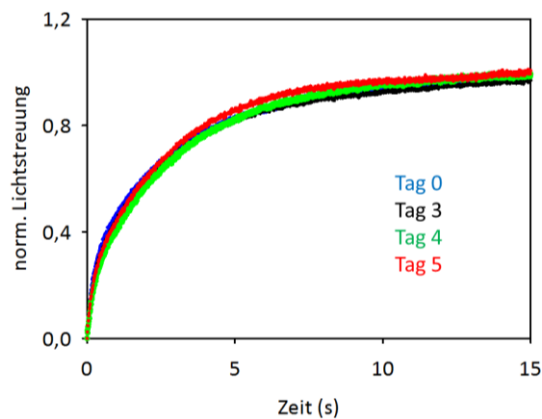


Abbildung 4.11: Lagerfähigkeit von Protoplasten im Inkubationspuffer bei 4 °C im Kühlschrank. Die Protoplasten wurden an Tag 0 präpariert und gemessen. Nach Lagerung über das Wochenende wurden sie an drei weiteren Tagen (Tag 3-5) gemessen.

4.1.3 Schrumpfen oder Schwellen?

In den obigen Versuchen wurden die Protoplasten mit einem hyperosmotischen Puffer gemischt und dadurch der Wasseraustritt gemessen. Im folgenden Versuch wurden Protoplasten präpariert und damit sowohl der Wasseraustritt (durch Mischung mit einem hyperosmotischen Puffer) als auch der Wassereintritt (durch Mischung mit einem hypoosmotischen Puffer) gemessen, um die Frage zu beantworten, ob die Protoplasten auf Schrumpfen oder Schwellen besser ansprechen. Die Abbildung 4.12 zeigt das Ergebnis.

4. Ergebnisse

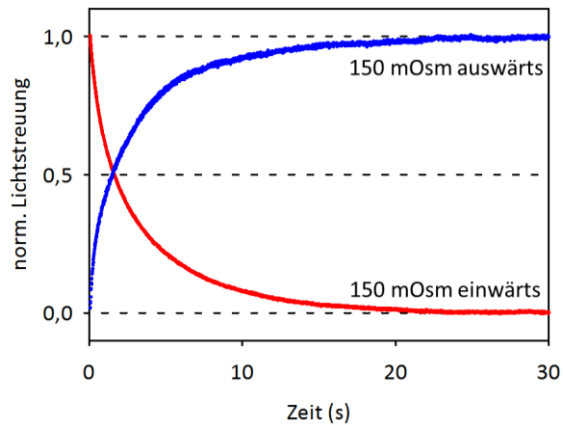


Abbildung 4.12: Mit den gleichen Protoplasten wurden Schumpfkurven in Blau und Schwellkurven in Rot auf Grund 150 mOsm registriert.

Bei Mischen der Protoplasten mit dem hyperosmotischen Puffer resultierte ein auswärts gerichteter osmotischer Gradient von 150 mOsm, auf Grund dessen Wasser nach außen transportiert wurde. Dies führte zu Schrumpfung der Zellen, die dadurch das Licht stärker gestreut haben, was in einer exponentiell steigenden Kurve sichtbar wurde. Den umgekehrten Verlauf beobachtet man bei Mischen der Protoplasten mit einem hypoosmotischen Puffer.

Beide Kurven zeichnen sich durch geringes Rauschen und symmetrischen Verlauf, was auf eine gute Protoplastierung hinweist. Außerdem schneiden sich die Kurven bei $y = 0,51$. Dies bedeutet, dass in beiden Fällen die gleiche Menge an Wasser nach außen bzw. nach innen mit der gleichen Ratenkonstante transportiert wurde. Dieser Versuch macht deutlich, dass die Protoplasten ihr Volumen in beide Richtungen verändern können, was auch heißt, dass die Osmolarität des Inkubationspuffers geeignet ist und den Protoplasten einen ausreichenden Spielraum überlässt. Außerdem zeigt die Abbildung 4.12, dass die Protoplasten über einen Zeitraum von 30 s stabil waren; sie sind durch den Wassereintritt nicht aufgeplatzt und wegen des Wasseraustritts sind sie nicht in sich gefallen. Für die folgenden Versuche haben wir uns für die Schrumpfvariante, also für die Mischung mit einem hyperosmotischen Puffer, entschieden.

4.1.4 Der osmotische Gradient

Im folgenden Versuch wurde der Wassertransport aus den Protoplasten auf Grund 150 und 300 mOsm gemessen, um den Einfluss des osmotischen Gradienten auf die Leitfähigkeit zu untersuchen.

Abbildung 4.13.A zeigt den Wassertransport aus den Protoplasten. Sowohl mit 150 mOsm als auch mit 300 mOsm fand der Wassertransport mit der gleichen Ratenkonstante ($1,3 \text{ s}^{-1}$ und $1,1 \text{ s}^{-1}$) statt. Man sieht aber, dass die blaue Kurve bei ca. 36,3 s einen nicht linearen Verlauf einnimmt. Dies deutet darauf, dass die Protoplasten an dem Zeitpunkt maximal geschrumpft haben; es findet keine Volumenveränderung statt und die Oberfläche ist stark

4. Ergebnisse

uneben geworden, so dass das Licht in alle Richtungen gestreut wird. Dieses betrachtet man auch mit 150 mOsm, aber erst ab 63,8 s auf Grund des kleineren Gradienten.

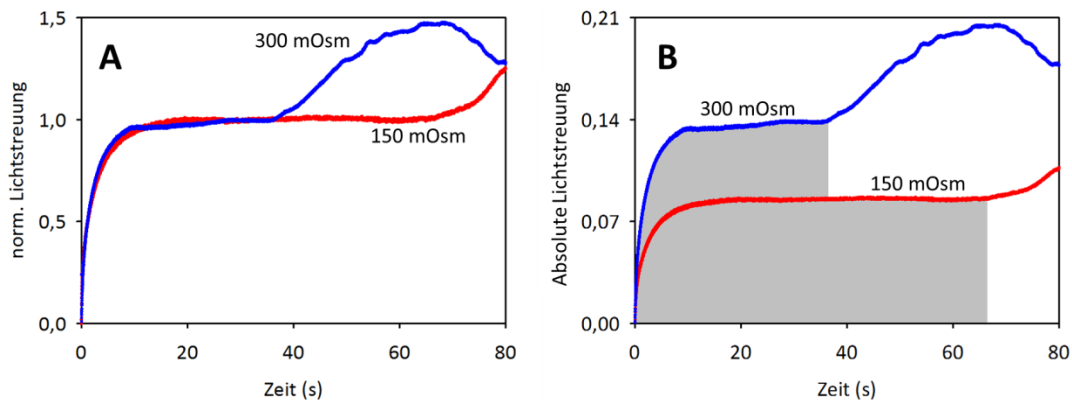


Abbildung 4.13: Messung des Wasseraustritts auf Grund 150 mOsm in Rot und 300 mOsm in Blau. Gezeigt sind in A) die normierten und in B) nicht normierten Kurven. Grau gefärbt sind die Flächen unter den Kurven

Einen zweiten Unterschied sieht man an Hand der nicht normierten Kurven (Abb. 4.13.B). In Grau gefärbt sind die Flächen unter den Kurven. Mit 300 mOsm hat die Fläche (AUC_{300}) einen absoluten Wert von 4,7. Die Fläche unter der mit 150 mOsm gemessenen Kurve ist mit einem Wert von 5,4 ähnlich. Das bedeutet, in beiden Fällen wurde die gleiche Menge an Wasser transportiert. Der Unterschied liegt darin, dass mit höherem Gradienten der Transportvorgang schneller beendet wurde. Nach 36,2 s sind die Protoplasten total geschrumpft, weswegen die blaue Kurve in Abb. 4.13 den nicht linearen Verlauf einnimmt. Hingegen dauerte der Transportvorgang mit 150 mOsm fast doppelt so lange. Die totale Schrumpfung der Protoplasten beginnt nach ca. 63,8 s.

4.2 Wasser- und Glycerolleitfähigkeit von PfaQP

Die Daten zu diesem Kapitel sind bereits veröffentlicht in „*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*).

Auf Grund widersprüchlicher Daten in der Literatur über die Funktion des Aquaglyceroporins aus *P. falciparum* (PfaQP) wurde die DNA-Sequenz amplifiziert, kloniert und die Wasser- und Glycerolleitfähigkeit in verschiedenen Polyolen getestet.

4.2.1 Amplifikation und Klonierung von PfaQP

Die DNA-Sequenz wurde mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer enthielten Schnittstellen für *PstI* und *Sall*. Anschließend wurde die *template* DNA mit 1 μ l *DpnI* verdaut und elektrophoretisch gereinigt. Das PCR-Produkt und das leere Plasmid pDR196HA wurden anschließend mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *Sall* für 3 h bei

4. Ergebnisse

37 °C verdaut. Die Restriktionsansätze wurden danach auf Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch gereinigt.

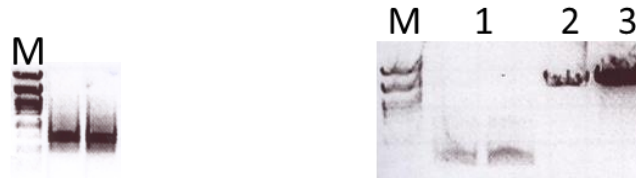


Abbildung 4.14: Links: PCR-Produkt von PfAQP. Rechts: Verdau von 1) PfAQP und 2) pDR196HA mit *PstI* und *Sall*. 3) Als Kontrolle wurde das unverdaute Plasmid pDR196HA aufgetragen. M =Marker.

Aus dem Gel wurden die verdauten DNA-Fragmente extrahiert und anschließend ligiert. Nach Transformation kompetenter *E. coli* Zellen und *Miniprep* wurde die Ligation kontrolliert. Bei Verdaut mit *PstI* und *Sall* entstehen die erwarteten Banden; die obere entspricht dem leeren Plasmid und die untere der PfAQP-Sequenz. In Spur 2 wurde das verdaute und in Spur 3 das unverdaute Plasmid als Kontrolle aufgetragen.

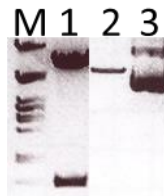


Abbildung 4.15: Kontrollverdau von 1) PfAQP-pDR196HA und 2) pDR196HA mit *PstI* und *Sall*. 3) Als Kontrolle wurde das unverdaute Plasmid pDR196HA. M =Marker.

4. Ergebnisse

4.2.2 Wasserleitfähigkeit von PfAQP; eine umstrittene Funktion!

Auf Grund der widersprüchlichen Daten in der Literatur über die Wasserleitfähigkeit von PfAQP wurden *S. cerevisiae* Zellen mit den Aquaglyceroporinen PfAQP und EcGlpF, mit dem wasserspezifischen rAQP1 und dem leeren Plasmid transformiert. Nach der Selektion auf SD KHL-Platten wurden Protoplasten präpariert. Die Präparation erfolgte in einem Sorbitolpuffer und zum Vergleich in einem Saccharosepuffer und anschließend wurde die Wasserleitfähigkeit beider Protoplastenpräparationen gemessen.

Die ersten Messungen des Wassertransports durch die AQPs und Kontrollen erfolgten in dem Sorbitol-Puffersystem mit einem osmotischen Gradienten von 300 mOsm auswärts gerichtet. In diesem System lieferten Protoplasten mit PfAQP oder EcGlpF identische Schrumpfkurven wie die dazugehörigen Negativkontrollen, deren Wassertransport auf einfache Diffusion beruht. Die Positivkontrolle mit rAQP1 transportierte Wasser 27mal schneller als ihre Kontrolle (Abb. 4.16).

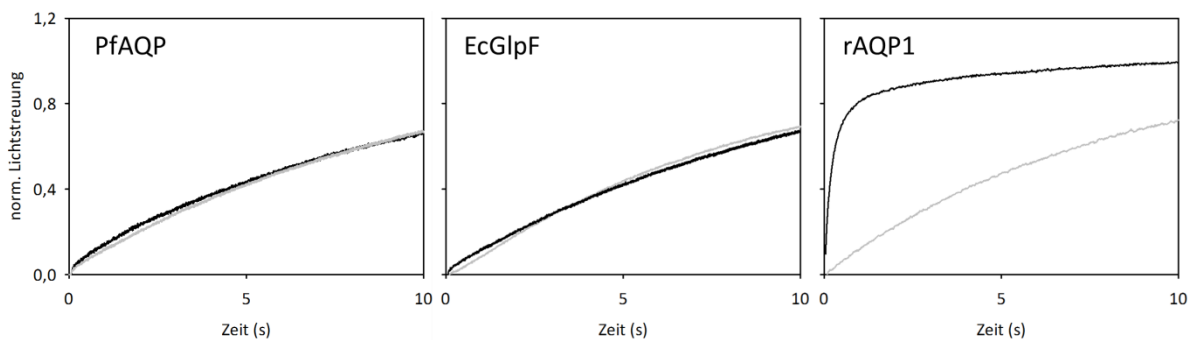


Abbildung 4.16: Wasserleitfähigkeit von Protoplasten mit PfAQP, EcGlpF und rAQP1 (schwarze Kurven) im Vergleich zu Protoplasten ohne AQP (graue Kurven) in Sorbitolpuffer.

Nach Normierung der Kurven und *Fitting* zu einem zweifach exponentiellen Verlauf wurden die Ratenkonstanten ermittelt und an Hand der Kurve wurden die τ -Werte abgelesen. Das Verhältnis von $\frac{k_{(AQP)}}{k_{(Kontrolle)}}$ bzw. $\frac{\tau_{(AQP)}}{\tau_{(Kontrolle)}}$ verdeutlicht die bessere Leitfähigkeit des AQP. Je größer das Verhältnis der k-Werte bzw. je kleiner das Verhältnis der τ -Werte ist, umso schneller fand der Transport statt.

Tabelle 4.3: Die Ratenkonstanten (s^{-1}) und die abgelesenen τ -Werte (s) in Sorbitol

	$k_{(AQP)}$	$k_{(Kontrolle)}$	$\frac{k_{(AQP)}}{k_{(Kontrolle)}}$	$\tau_{(AQP)}$	$\tau_{(Kontrolle)}$	$\frac{\tau_{(AQP)}}{\tau_{(Kontrolle)}}$
PfAQP	0,10	0,10	1	8,82	8,82	1
EcGlpF	0,11	0,10	1,1	8,39	8,80	0,95
rAQP1	3,44	0,13	26,5	0,36	7,72	0,046

4. Ergebnisse

Im nächsten Schritt wurden Protoplasten mit PfAQP, EcGlpF, rAQP1 (Positivkontrolle) und Negativkontrolle in einem Saccharose-Puffersystem präpariert und anschließend erfolgte die Messung des Wassertransports auf Grund eines osmotischen Gradienten von 300 mOsm auswärts gerichtet, genauso wie bei der Messung mit Sorbitol.

In Saccharose-Puffersystem zeigte PfAQP einen höheren Wassertransport als die dazu gehörige Kontrolle. Mit einer Ratenkonstante von $1,25 \text{ s}^{-1}$ leiteten Protoplasten mit PfAQP Wasser 5mal schneller als solche ohne AQP ($k = 0,25 \text{ s}^{-1}$).

Ähnlich wie im Sorbitol-Testsystem zeigt EcGlpF in Saccharose keine Wasserleitfähigkeit. Der wasserspezifische rAQP1 führte zu Erhöhung der Wasserpermeabilität der Protoplasten um den Faktor 16,6.

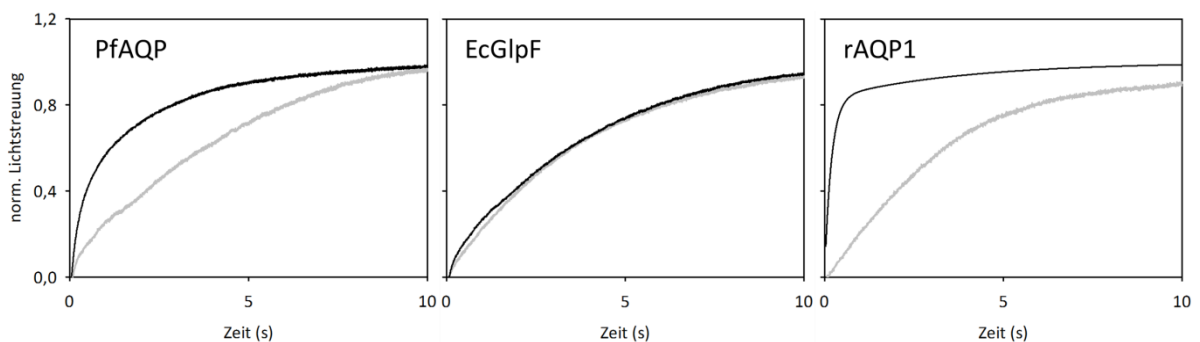


Abbildung 4.17: Wasserleitfähigkeit von Protoplasten mit PfAQP, EcGlpF und rAQP1 (schwarze Kurven) im Vergleich zu Protoplasten ohne AQP (graue Kurven) in Saccharosepuffer.

Nach Normierung und *Fitting* der Kurven wurden die Ratenkonstanten ermittelt, die τ -Werte abgelesen und deren Verhältnisse berechnet:

Tabelle 4.4: Die Ratenkonstanten (s^{-1}) und die abgelesenen τ -Werte (s) in Saccharose

	$k_{(\text{AQP})}$	$k_{(\text{Kontrolle})}$	$\frac{k_{(\text{AQP})}}{k_{(\text{Kontrolle})}}$	$\tau_{(\text{AQP})}$	$\tau_{(\text{Kontrolle})}$	$\frac{\tau_{(\text{AQP})}}{\tau_{(\text{Kontrolle})}}$
PfAQP	1,25	0,25	5	1,31	4,04	0,32
EcGlpF	0,26	0,27	0,96	3,72	3,7	1,01
rAQP1	4,48	0,27	16,6	0,26	3,56	0,07

Die obigen Versuche zeigen deutlich, dass das eingesetzte Polyol einen Einfluss auf die Wasserleitfähigkeit hat. Sorbitol ist eine lineare Kette mit sechs Kohlenstoffatomen und sechs OH-Gruppen; Saccharose ist ein cyclisches Disaccharid mit acht OH-Gruppen. Um den Effekt der Polyolstruktur auf die Funktion von PfAQP zu untersuchen, wurden neue Protoplastierungspuffer mit Polyethylenglykol 300 (PEG300) und Glycerol hergestellt und die Wasserleitfähigkeit von PfAQP, rAQP1 als Positivkontrolle und Protoplasten ohne AQP als Negativkontrolle auf Grund eines osmotischen Gradienten von 300 mOsm, auswärts gerichtet, gemessen.

4. Ergebnisse

PEFG300 ist eine lineare Kette, die länger als Sorbitol ist, aber mit nur zwei OH-Gruppen. Glycerol mit drei Kohlenstoffatomen und drei OH-Gruppen kann als ein halbes Sorbitolmolekül angesehen werden.

Somit haben wir eine Auswahl an unterschiedlichen linearen und cyclischen Polyolen, die unterschiedliche Anzahl an OH-Gruppen haben, um den Einfluss des Polyols auf die AQP-Funktion zu testen.

Die Abbildung 4.18 zeigt die Schrumpfkurven von Protoplasten mit PfAQP, rAQP1 und der Negativkontrolle in PEG300 und in Glycerol.

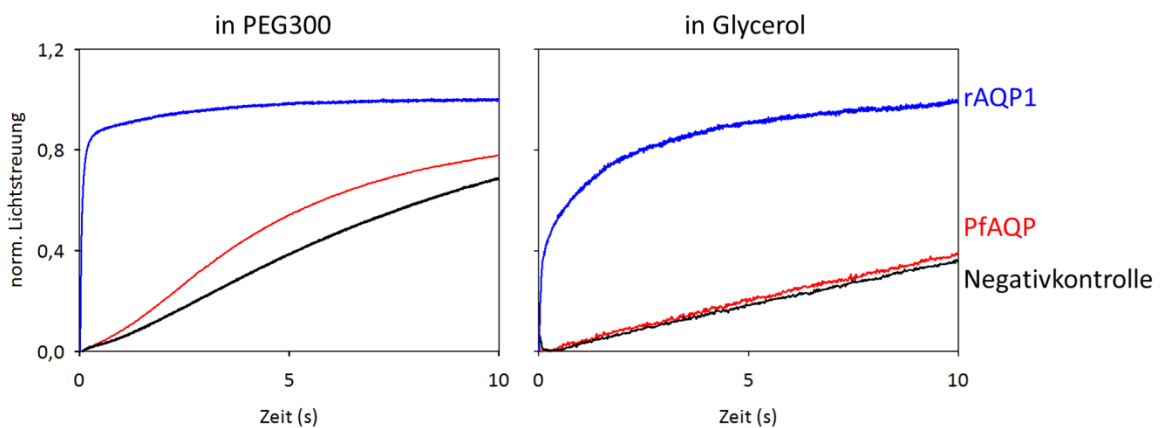


Abbildung 4.18: Wasserleitfähigkeit von Protoplasten mit PfAQP (Rot) und rAQP1 (Blau) und die Negativkontrolle (Schwarz) in PEG300 (links) und Glycerol (rechts).

In PEG300 erhöht PfAQP die Wasserpermeabilität von Protoplasten um den Faktor 5,5 im Vergleich zur Negativkontrolle, bringt aber kaum eine Verbesserung im Glycerolpuffer.

Wie in Sorbitol und Saccharose zeigt rAQP1 in beiden Polyolen seine hohe Wasserleitfähigkeit. In der Tabelle 4.5 sind die Ratenkonstanten in PEG300 und Glycerol zusammengefasst.

Tabelle 4.5: Die Ratenkonstanten (s^{-1}) in PEG300 und Glycerol

	PEG300	Glycerol
	k-Wert in s^{-1}	
PfAQP	0,11	0,04
rAQP1	12,3	5,7
Kontrolle	0,02	0,03

Die obigen Ergebnisse zeigen den deutlichen Einfluss des eingesetzten Polyols auf die Wasserleitfähigkeit von Protoplasten mit PfAQP. Die ermittelten Ratenkonstanten von Protoplasten mit PfAQP widerspiegeln den Wassertransport durch das Aquaporin und die einfache Diffusion von Wasser durch die Membran. Die Ratenkonstanten der jeweiligen Negativkontrollen beruhen auf die einfache Diffusion des Wassers.

4. Ergebnisse

Deswegen wurden im Folgenden die Ratenkonstanten der jeweiligen Kontrollen $k_{(\text{Kontrolle})}$ von den Ratenkonstanten der PfAQP-Protoplasten $k_{(\text{gesamt})}$ subtrahiert, um die Ratenkonstante für die reine Wasserleitfähigkeit durch PfAQP $k_{(\text{PfAQP})}$ zu ermitteln:

Tabelle 4.6: $k_{(\text{gesamt})}$ beschreibt den Wassertransport durch AQP und Diffusion, $k_{(\text{Kontrolle})}$ beschreibt nur die Diffusion, $k_{(\text{PfAQP})}$ ist ein Maß für den reinen Wassertransport durch PfAQP

Polyol	$k_{(\text{gesamt})} \text{ s}^{-1}$	$k_{(\text{Kontrolle})} \text{ s}^{-1}$	$k_{(\text{PfAQP})} = k_{(\text{gesamt})} - k_{(\text{Kontrolle})} \text{ s}^{-1}$
Saccharose	1,25	0,25	1,00
Sorbitol	0,1	0,1	0,00
PEG300	0,18	0,02	0,16
Glycerol	0,04	0,03	0,01

Die so berechneten Ratenkonstanten in den jeweiligen Polyolen wurden anschließend als Exponentialfunktion $y = a \cdot (1 - e^{-k_{(\text{PfAQP})} \cdot t})$ graphisch dargestellt.

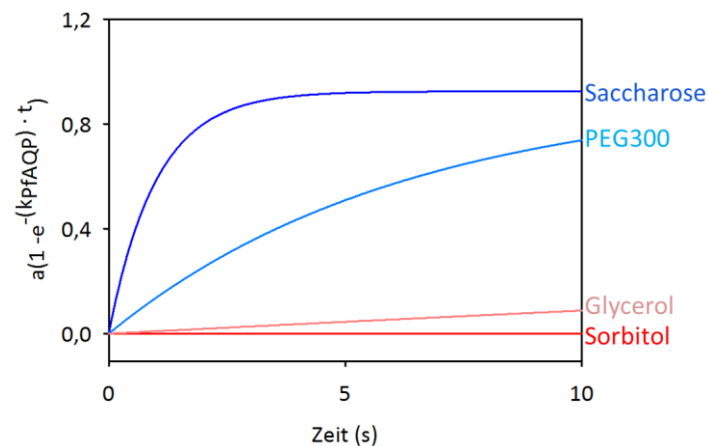


Abbildung 4.20: Graphische Darstellung des reinen Wassertransports durch PfAQP mit den berechneten Ratenkonstanten

Abbildung 4.20 zeigt den Einfluss des Polyols auf PfAQP. Das große und cyclische Saccharosemolekül beeinflusst die Funktion nicht; PfAQP hat in diesem Puffersystem seine maximale Wasserleitfähigkeit. In den linearen Polyolen nimmt sie mit steigender Zahl an OH-Gruppen ab. Unter der Annahme, dass Saccharose die Funktion des PfAQP nicht beeinflusst, wurden die Flächen unter den einzelnen Kurven berechnet und auf die Fläche unter der Saccharose-Kurve bezogen, um den Effekt der Polyole zu verdeutlichen:

Tabelle 4.7: Ausmaß der Hemmung der Wasserleitfähigkeit von PfAQP durch die eingesetzten Polyole

Polyol	absolute Fläche	bezogen auf die Saccharose-Fläche	Hemmung des PfAQP durch das Polyol
Saccharose	8,32	100 %	0 %
PEG300	4,63	55,65 %	44,35 %
Glycerol	0,45	5,41 %	94,59 %
Sorbitol	0,0	0,0 %	100 %

4. Ergebnisse

4.2.3 Hemmung des PfAQP durch Sorbitol

Die obigen Versuche zeigen eine 100 %-ige Hemmung des Aquaglyceroporins PfAQP durch Sorbitol. In dem folgenden Experiment, welches mit dem Kollegen J. Song durchgeführt wurde, wurde die Konzentrationsabhängigkeit dieser Hemmung genauer untersucht. Dafür wurden Protoplasten mit PfAQP und ohne PfAQP als Negativkontrolle in Saccharose enthaltendem Puffer präpariert und mit hyperosmotischen Testpuffern in der *stopped flow* Apparatur gemischt, so dass die Wasserleitfähigkeit auf Grund eines auswärts gerichteten osmotischen Gradienten von 300 mOsm gemessen wurde. Die hyperosmotischen Testpuffer enthielten Saccharose und Sorbitol in den folgenden Verhältnissen: 1:0, 2:1, 1:2 und 0:1 (Saccharose:Sorbitol).

Unabhängig von dem Saccharose/Sorbitol-Verhältnis haben Protoplasten mit PfAQP und die jeweiligen Kontrollen untereinander identische Ergebnisse geliefert, die der Messung mit reinem Saccharosepuffer entsprachen, wie in der Abbildung 4.17 und 4.20. Dies bedeutet, dass die Zugabe von Sorbitol nicht zu einer sofortigen Hemmung führt (Daten nicht gezeigt). Deswegen wurden Protoplasten in Saccharosepuffer präpariert, zentrifugiert und danach in Puffern resuspendiert, die Saccharose und Sorbitol in den Verhältnissen 1:0, 2:1, 1:2 und 0:1 enthielten. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag wurde die Wasserleitfähigkeit der einzelnen Protoplasten durch Mischen mit hyperosmotischen Testpuffern (ebenfalls mit Saccharose und Sorbitol in den genannten Verhältnissen) gemessen. Abbildung 4.21 zeigt eine zunehmende Hemmung der Wasserleitfähigkeit von Protoplasten mit PfAQP je größer der Anteil an Sorbitol ist.

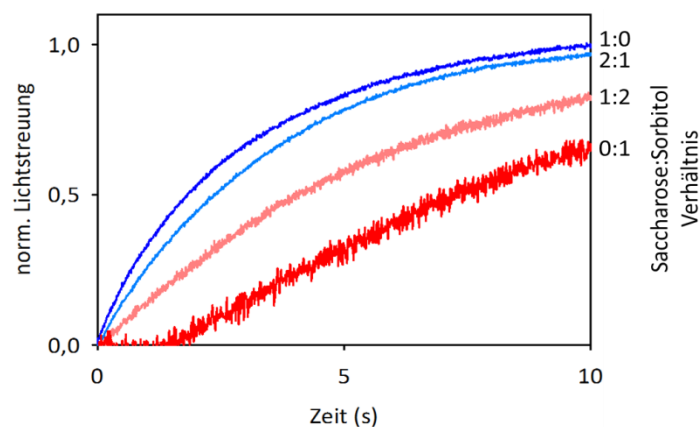


Abbildung 4.21: Protoplasten wurden über Nacht in Mischung aus Saccharose/Sorbitol in den Verhältnissen 1:0, 2:1, 1:2 und 0:1 inkubiert und dann die Wasserleitfähigkeit gemessen.

Protoplasten sind empfindlich für Hitze, Druck und hohe Osmolarität. Bei jedem Zentrifugations- und Umpufferungsschritt werden sie unter Stress gesetzt, wodurch ihre Eigenschaften beeinträchtigt werden. Deswegen wurden die Protoplasten nicht im Saccharosepuffer hergestellt, zentrifugiert und in Saccharose/Sorbitol-Puffern resuspendiert, sondern direkt in diesen Saccharose/Sorbitol-Puffern präpariert. Gemessen wurde anschließend mit hyperosmotischen Puffern, die auch Saccharose und Sorbitol im

4. Ergebnisse

gleichen Verhältnis enthielten, wie in dem Inkubationspuffer. Die Abbildung 4.22 zeigt ein ähnliches Ergebnis wie in der Abbildung 4.21; die Messung verlief aber insgesamt besser und empfindlicher. Dies merkt man an dem geringeren Rauschen und den deutlicheren Unterschieden zwischen den Kurven.

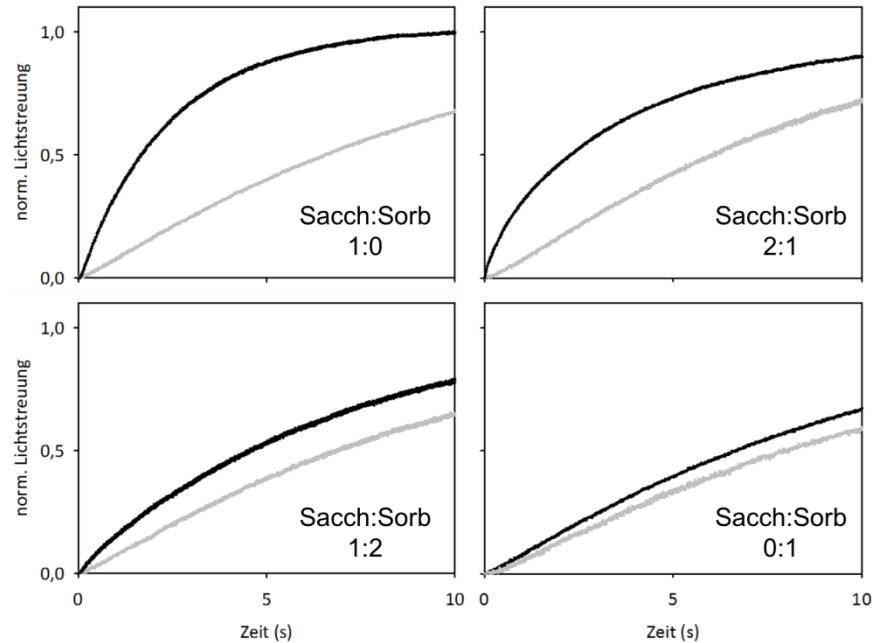


Abbildung 4.22: Wasserleitfähigkeit von Protoplasten mit PfAQP (schwarz) und die dazugehörigen Kontrollen (grau), präpariert und gemessen in verschiedenen Saccharose/Sorbitol-Anteilen.

Anschließend wurden die Kurven zu einem einfach oder zweifach exponentiellen Verlauf gefittet und die Ratenkonstanten ermittelt. Danach wurden die Ratenkonstanten der jeweiligen Kontrollen von denen der PfAQP-Protoplasten subtrahiert, um die reine Wasserleitfähigkeit durch PfAQP graphisch darzustellen (Tabelle 4.8)

Abbildung 4.8: $k_{(\text{gesamt})}$ beschreibt den Wassertransport durch AQP und Diffusion, $k_{(\text{Kontrolle})}$ beschreibt nur die Diffusion, $k_{(\text{PfAQP})}$ ist ein Maß für den reinen Wassertransport durch PfAQP

Verhältnis Saccharose:Sorbitol	$k_{(\text{gesamt})} \text{ s}^{-1}$	$k_{(\text{Kontrolle})} \text{ s}^{-1}$	$k_{(\text{PfAQP})} = k_{(\text{gesamt})} - k_{(\text{Kontrolle})} \text{ s}^{-1}$
1:0	0,40	0,06	0,34
2:1	0,35	0,06	0,29
1:2	0,16	0,06	0,10
0:1	0,06	0,06	0,00

4. Ergebnisse

Abbildung 4.23.A zeigt eine zunehmende Hemmung der PfAQP-Funktion je größer der Sorbitol-Anteil.

In Abbildung 4.23.B wurde der Sorbitol-Anteil gegen die $k_{(PfAQP)}$ -Werte aufgetragen. Man sieht den deutlichen Effekt von Sorbitol auf die Wasserleitfähigkeit des PfAQP, welcher erst auftreten kann, wenn die Protoplasten in Sorbitol längere Zeit inkubiert wurden.

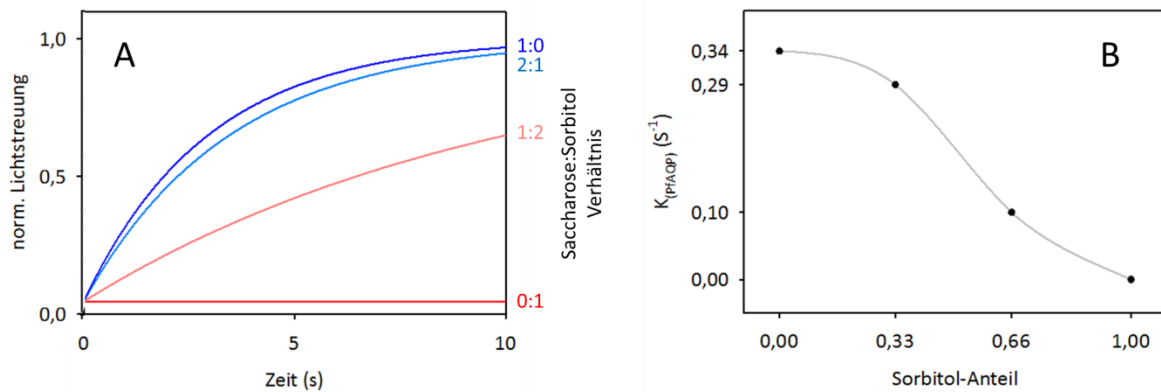


Abbildung 4.23: A) Graphische Darstellung des reinen Wassertransports durch PfAQP in Puffern mit verschiedenen Saccharose/Sorbitol-Verhältnissen. B) Auftragung der Ratenkonstante gegen die Sorbitolkonzentration.

Unter der Annahme, dass PfAQP in reinem Saccharose-Puffer seine volle Funktionalität besitzt, wurden die Flächen unter den Kurven in Abbildung 4.23.A berechnet und auf die Fläche unter der Saccharose-Kurve (Saccharose/Sorbitol-Verhältnis 1:0) bezogen. Anschließend wurden die molaren Sorbitolkonzentrationen gegen die prozentualen Flächen aufgetragen, um den IC_{50} -Wert abzulesen. Der Abbildung 4.24 kann eine Sorbitolkonzentration von ca. 0,81 M entnommen werden, um eine 50 % Hemmung der PfAQP-Funktion zu erzielen.

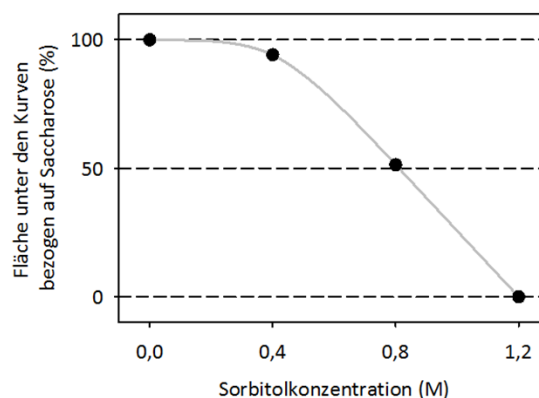


Abbildung 4.24: Aufgetragen wurden die molaren Sorbitolkonzentrationen in den verschiedenen Saccharose/Sorbitol-Verhältnissen gegen die Flächen unter den Kurven, bezogen auf Saccharose.

4. Ergebnisse

4.2.4 Einfluss von Polyolen auf die Glycerolleitfähigkeit von PfAQP

Den experimentellen Teil dieses Kapitels wurde von dem Kollegen Jie Song durchgeführt.

Mit den Versuchen unter 4.3.2 und 4.3.3 wurde die Hemmung der Wasserleitfähigkeit von PfAQP durch Sorbitol mit einem IC_{50} -Wert von 0,81 M festgestellt. PfAQP hat aber die Besonderheit, nicht nur Wasser gut zu leiten, sondern auch Glycerol (Hansen 2002; Beitz *et al* 2003; Newby *et al.* 2008). Ob Sorbitol die Glycerolleitfähigkeit von PfAQP hemmen kann, war Gegenstand folgender Experimente.

Dafür wurden erneut Hefeprotoplasten mit PfAQP, EcGlpF und leerem Plasmid präpariert und auf die Glycerolleitfähigkeit getestet. EcGlpF als Prototyp der Aquaglyceroporine zeigte in mehreren Arbeiten Glycerolleitfähigkeit (Maurel *et al.* 1994 und Fu *et al.* 2000) und diente hier als Positivkontrolle. Dementsprechend dienten Protoplasten mit dem leeren Plasmid als Negativkontrolle. In der Literatur findet man keinen direkten Vergleich von PfAQP mit EcGlpF hinsichtlich ihrer Funktionen. Das ist insofern interessant, weil die Aminosäuresequenzen beider Aquaglyceroporine 35 % Identität, 50 % Gesamtähnlichkeit und 60 % Ähnlichkeit in den transmembranären Bereichen aufweisen (Beitz *et al.* 2003). Die Kristallstruktur beider Aquaglyceroporine (Fu *et al.* 2001; Newby *et al.* 2008) zeigen auch, dass der innere Bereich der Kanäle sehr ähnlich aufgebaut ist. Von daher wäre es interessant, beide Aquaglyceroporine direkt miteinander zu vergleichen.

Die Protoplasten wurden in einem Puffer mit 1,2 M Polyol (Saccharose, Sorbitol oder PEG300) präpariert. In der *stopped flow* Apparatur wurden sie mit einem Testpuffer mit 0,6 M Glycerol und 0,6 M Polyol (Saccharose, Sorbitol oder PEG300) in Verhältnis 1:1 gemischt. Somit wurden die Protoplasten einem chemischen Glycerol-Gradienten von 300 mOsm unterworfen, auf Grund dessen Glycerol in die Protoplasten durch das PfAQP bzw. EcGlpF transportiert wurde. Glycerol ist aber osmotisch aktiv und zieht Wasser mit sich in die Protoplasten. Beides führte zur Anschwellung der Protoplasten, die dann das eingestrahlte Licht schwächer streuten, was vom Detektor/Photomultiplier als eine exponentiell abfallende Kurve registriert, verstärkt und wiedergegeben wird.

In allen Polyolen zeigen beide Aquaglyceroporine, EcGlpF und PfAQP, deutliche Glycerolleitfähigkeit gegenüber der Negativkontrolle, die auf Grund der Isosmolarität des Inkubations- und Testpuffers und der langsamen Glyceroldiffusion keine Volumenänderung erfährt (Abb. 4.25). Während EcGlpF in allen Polyolen Glycerol mit identischer Ratenkonstante geleitet hat (Tab. 4.9), zeigte PfAQP die Abhängigkeit von dem eingesetzten Polyol. In Saccharose erfolgte der Glyceroltransport durch PfAQP mit der höchsten Ratenkonstante ($0,05 \text{ s}^{-1}$). In Sorbitol erfolgte der Glyceroltransport langsamer als in Saccharose, was sich als Verschiebung der in Saccharose gemessenen Kurve (gestrichelte Kurve in der Abbildung) bemerkbar macht. Die ermittelte Ratenkonstante von $0,01 \text{ s}^{-1}$ von

4. Ergebnisse

PfAQP in Sorbitol beträgt nur noch 20 % der Ratenkonstante in Saccharose. Einen ähnlichen Kurvenverlauf betrachtet man auch in PEG300.

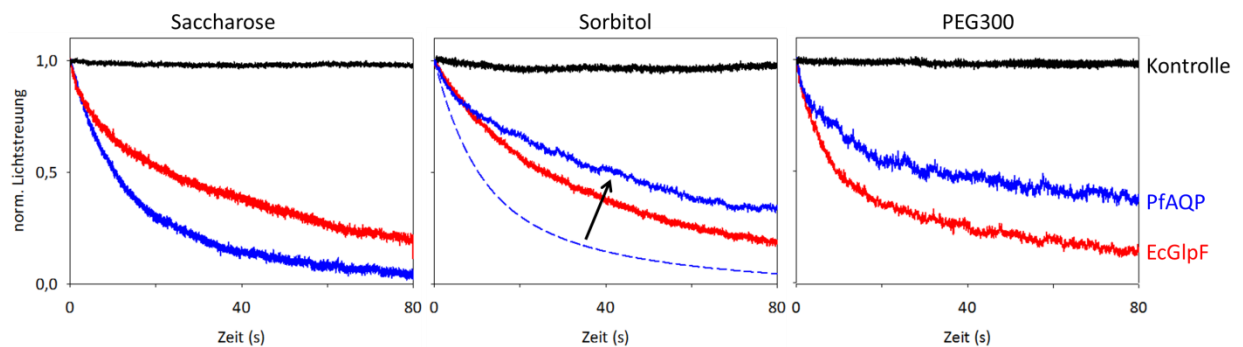


Abbildung 4.25: Glycerolleitfähigkeit von Protoplasten mit PfAQP (in Blau), EcGlpF (in Rot) und Negativkontrolle (in Schwarz) auf Grund eines chemischen Gradienten von 300 mOsm einwärts gerichtet.

Tabelle 4.9: Glycerolleitfähigkeiten von PfAQP und EcGlpF in Saccharose, Sorbitol und PEG300

	$k_{(\text{Saccharose})} \text{ s}^{-1}$	$K_{(\text{Sorbitol})} \text{ s}^{-1}$	$k_{(\text{PEG300})} \text{ s}^{-1}$
PfAQP	0,05	0,01	0,01
EcGlpF	0,021	0,022	0,026

Während Sorbitol zu einer 100 % Hemmung der Wasserleitfähigkeit durch PfAQP verursachen kann, führt es zu einer Abschwächung der Glycerolleitfähigkeit um 80 % unter den gleichen Testbedingungen. Dies macht deutlich, dass die Wahl der osmotisch aktiven Substanz bei *stopped flow* Messungen eine große Rolle spielt.

4.2.5 Molenbruch-Anomalie; können sich verschiedene Solute in ihrer Leitfähigkeit beeinflussen?

Den experimentellen Teil dieses Kapitels wurde von dem Kollegen Jie Song durchgeführt.

In den bisherigen Versuchen wurde getestet, ob die Wasser- bzw. Glycerolleitfähigkeit durch verschiedene Polyole beeinflusst werden kann. Nun haben wir uns die umgekehrte Frage gestellt: Können sich AQP-Substrate in einem Polyol hinsichtlich ihrer Leitfähigkeiten beeinflussen? Diese Frage ist insofern interessant, weil die physiologischen Flüssigkeiten nicht nur aus Wasser und Glycerol bestehen, sondern auch viele andere kleine Moleküle enthalten. Ein interessanter Kandidat ist Harnstoff, zumal seine Leitfähigkeit durch PfAQP beschrieben ist (Hansen *et al.* 2002; Pavlovic-Djuranovic *et al.* 2003) und, ähnlich wie Glycerol, in millimolaren Konzentrationen vorkommt. Dazu kommt auch, dass diese sog. Molenbruch-Anomalie (**A**nomalous **M**ole **F**raction **E**ffect, AMFE) für einige Kalium- und

4. Ergebnisse

Calcium-Kanäle bekannt ist (Nonner *et al.* 1998, Farokhi *et al.* 2000). Dabei hat man beobachtet, dass der Stromfluss von Ionengemischen kleiner ist als in reinen Lösungen.

Um diese Frage zu beantworten, wurde ein einfaches Modell aufgebaut und getestet. Hefeprotoplasten mit PfAQP wurden auf Grund der obigen Versuche in einem 1,2 M Saccharosepuffer präpariert. Die *stopped flow* Messung erfolgte durch 1:1 Mischung der Protoplasten mit einem Testpuffer, der

- 1) 0,6 M Saccharose + 0,6 M Glycerol/Harnstoff-Gemisch in den Verhältnissen: 1:0, 3:1, 1:1, 1:3, 0:1 oder
- 2) 1,2 M Saccharose + 0,6 M Glycerol/Harnstoff-Gemisch in den Verhältnissen: 1:0, 3:1, 1:1, 1:3, 0:1 enthält.

Im ersten Fall herrschte im Medium nach Mischen der Protoplasten mit dem Testpuffer ein chemischer Glycerol/Harnstoff-Gradient von 300 mOsm. Das führte zu Soluttransport in die Protoplasten, der Wasser mit sich zieht. Beide Transportvorgänge vergrößern das Protoplastenvolumen, die dann das eingestrahlte Licht schwächer streuen.

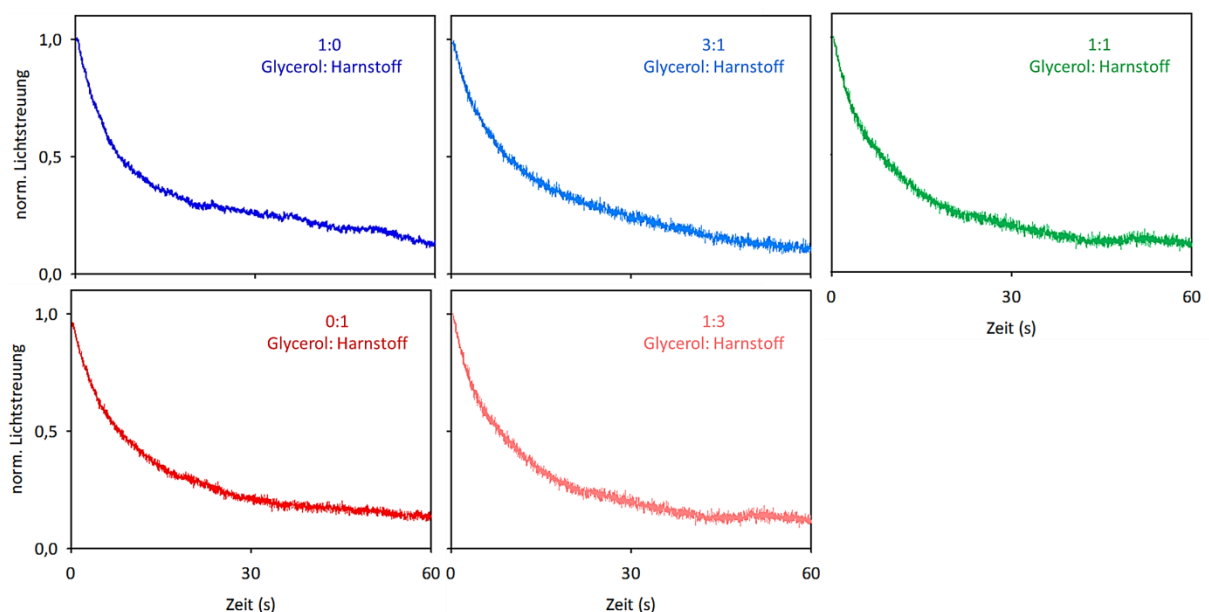


Abbildung 4.26: Isoosmotische Messung der Leitfähigkeit von Glycerol, Harnstoff oder in einem Gemisch mit verschiedenen Verhältnissen durch PfAQP-Protoplasten

Unabhängig von dem Glycerol/Harnstoff-Verhältnis zeigten alle Kurven bei isoosmotischer Messung einen identischen Verlauf mit identischen Ratenkonstanten von ca. $0,11 \text{ s}^{-1}$. Das bedeutet, dass sowohl Glycerol als auch Harnstoff mit derselben Leitfähigkeit unbeeinflusst transportiert wurden.

4. Ergebnisse

Tabelle 4.10: Ratenkonstante der gemischten Glycerol/Harnstoff-Leitfähigkeit

Verhältnis Glycerol:Harnstoff	k-Wert in s ⁻¹
1:0	0,14
3:1	0,11
1:1	0,10
1:3	0,10
0:1	0,10
$\bar{x} \pm \sigma_x$	$0,11 \pm 0,017$

Bei der Messung mit dem hyperosmotischen Puffer (1,2 M Saccharose + 0,6 M Glycerol/Harnstoff, Abb. 4.27) kam es zunächst zu Wasserausstrom aus den Protoplasten auf Grund des osmotischen Saccharose-Gradienten von 300 mOsm. Die Protoplasten schrumpften und die Lichtstreuung wurde größer. Da aber PfAQP für Glycerol und Harnstoff permeabel ist, setzte sich gleichzeitig der Glycerol/Harnstoff-Einstrom in die Protoplasten ein. Sekundär wurde auch Wasser hinein transportiert, wodurch die Protoplasten wieder anschwellen und die Lichtstreuung abnahm. Die Kurven zeigten einen Verlauf, der der Bateman-Funktion (Gl 11 unter 3.3.3.2) entspricht.

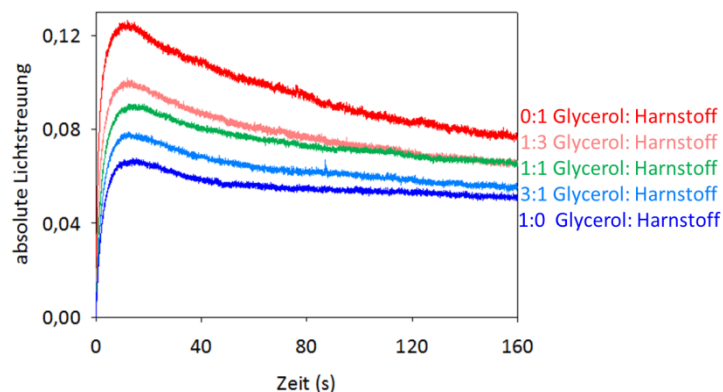


Abbildung 4.27: hyperosmotische Messung der Glycerol-, Harnstoff- oder Gemisch-Leitfähigkeit von Protoplasten mit PfAQP auf Grund eines auswärts gerichteten osmotischen Gradienten und einen einwärts gerichteten chemischen Gradienten von jeweils 300 mOsm.

In diesem Testsystem wurde die größte Volumenänderung der Protoplasten (d.h. die größte Amplitude) bei einem Glycerol:Harnstoff-Verhältnis von 0:1 (d.h. 100 % Harnstoff). Die kleinste Volumenänderung fand mit dem Glycerol:Harnstoff-Verhältnis von 1:0 (mit 100 % Glycerol) statt. Das bedeutet, mit 100 % Glycerol wurde der Wasseraustritt durch den schnellen Glyceroleintritt kompensiert. Mit 100 % Harnstoff war die Kompensation des Wasseraustritts schwächer, weil der Harnstoff langsamer in die Protoplasten transportiert wurde. Dieses Verhalten bestätigen auch die ermittelten Ratenkonstanten nach dem Kurvenfitting mit der Bateman-Funktion (Gl 11 unter 3.3.3.2).

4. Ergebnisse

Tabelle 4.11: Amplituden und Ratenkonstanten des Wasser- und Solut-Transports bei hyperosmotischer Messung

Verhältnis Glycerol:Harnstoff	Amplitude für Wasserausstrom (a)	$K_{(\text{Wasser})}$ s^{-1}	Amplitude für Soluteinstrom (b)	$K_{(\text{Solut})}$ s^{-1}
0:1	0,071	0,31	0,061	0,013
1:3	0,063	0,29	0,043	0,015
1:1	0,065	0,28	0,030	0,016
3:1	0,055	0,28	0,025	0,017
1:0	0,052	0,29	0,017	0,021

Die Ratenkonstanten des Wassertransports lagen unabhängig von dem Glycerol/Harnstoff-Verhältnis bei $0,29 \pm 0,012 \text{ s}^{-1}$. Die Ratenkonstanten für den Soluttransport nahmen mit steigendem Glycerol-Anteil zu, was bedeutet, dass Glycerol schneller transportiert wird als Harnstoff. Somit wird das Phänomen der Molenbruch-Anomalie, zumindest beschränkt auf PfAQP mit Glycerol und Harnstoff, ausgeschlossen, da eine kontinuierliche Abnahme der Ratenkonstante mit steigendem Anteil eines schlecht transportierbaren Soluten beobachtet wurde (Abb. 4.28)

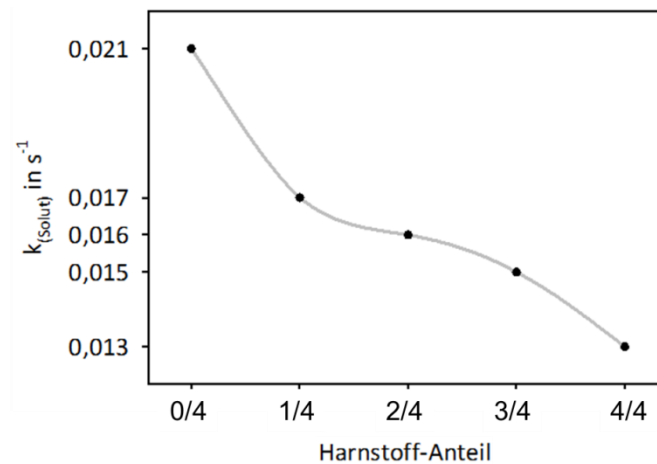


Abbildung 4.28: Abnahme der Solut-Ratenkonstante mit Zunahme des Harnstoff-Anteils im Gemisch

4. Ergebnisse

4.3 Ammoniak-Leitfähigkeit

4.3.1 Optimierung der *stopped flow* Messung

Die Messung der Ammoniakleitfähigkeit durch Aquaporine beruht auf Änderung der Fluoreszenz von Hefezellen, die zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladen worden sind (Zidi-Yahiaoui *et al.* 2005; Bertl *et al.* 2007).

Für diesen Test wurde der Hefestamm 310 Δ fps1 verwendet. In diesem Hefestamm sind das eigene Aquaglyceroporin (Fps1) und die Ammonium-Transporter (Mep 1-3) deletiert, so dass ein Ammoniaktransport über die Zellwand entweder durch einfache Diffusion oder durch ein heterolog produziertes Aqua-(glycero)-porin stattfinden kann. Die Hefezellen wurden, wie unter 3.3.3.3 beschrieben, vorbereitet. Während der Inkubation der Zellen mit dem pH-sensitiven Fluoresceindiacetat (FDA) im Ladepuffer, diffundiert der Fluoreszenzfarbstoff auf Grund seiner Lipophilie in die Zellen hinein. Die Estergruppen werden durch Esterasen gespalten, so dass das freie Fluorescein (F-1 Form in Abb. 4.29) entsteht. In der *stopped flow* Apparatur werden die beladenen Hefezellen mit einem Ammoniak enthaltenden Puffer gemischt. Auf Grund der höheren Konzentration gelangt Ammoniak in die Hefezellen, wodurch das Cytosol alkalisiert wird. Dadurch wird die phenolische OH-Gruppe (pKs-Wert ca. 10) deprotoniert und es entsteht die F -2 Form.

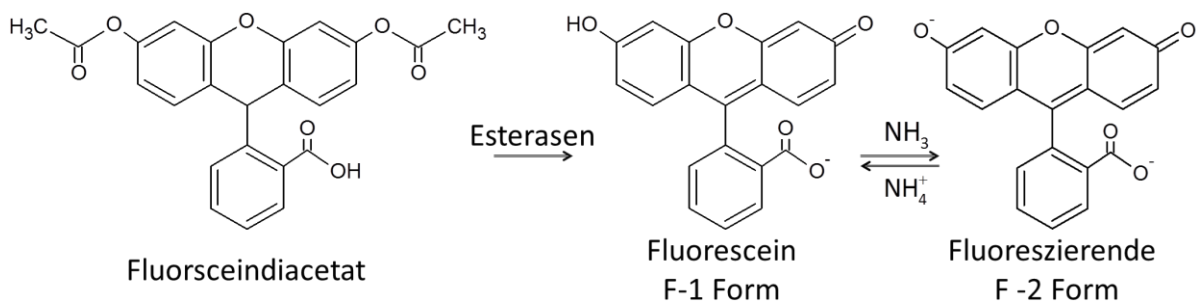


Abbildung 4.29: Umwandlung des Fluoresceindiacetats in die fluoreszierende Form F -2

Gleichzeitig werden die Hefezellen mit Licht der Wellenlänge 490 nm bestrahlt. Die zweifach negativ geladene Form (F -2) wird dadurch zur Fluoreszenz angeregt. Die Zunahme der Fluoreszenz während des Ammoniakeinstroms wird von dem Detektor/Photomultiplier registriert, verstärkt und als elektrisches Signal wiedergegeben.

4. Ergebnisse

4.3.1.1 Aufnahme des Absorptionsspektrums von FDA

Der erste Schritt zur Etablierung der Ammoniakmessung mit der *stopped flow* Apparatur war die Aufnahme eines Absorptionsspektrums von FDA. Dafür wurden zwei Tropfen 5 M NaOH zu 2 ml FDA-Lösung in DMSO (50 μ M) zugegeben und das Spektrum mit einem UV-Vis-Spektrometer gemessen.

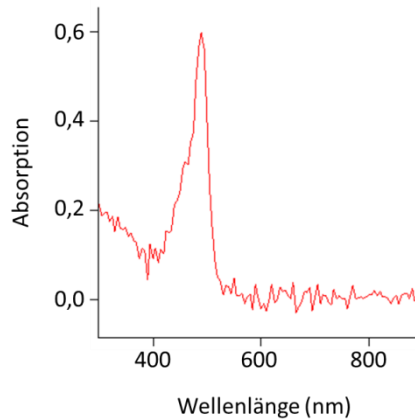


Abbildung 4.30: Absorptionsspektrum von FDA

4.3.1.2 Ammoniakgradient und Verstärkung des Photomultipliers

Im folgenden Versuch wurde die Ammoniakleitfähigkeit auf Grund eines chemischen Gradienten von 25 mM (rote Kurven) und 50 mM NH_4Cl (blaue Kurven) bei 400- und 500facher Photomultiplier-Verstärkung gemessen.

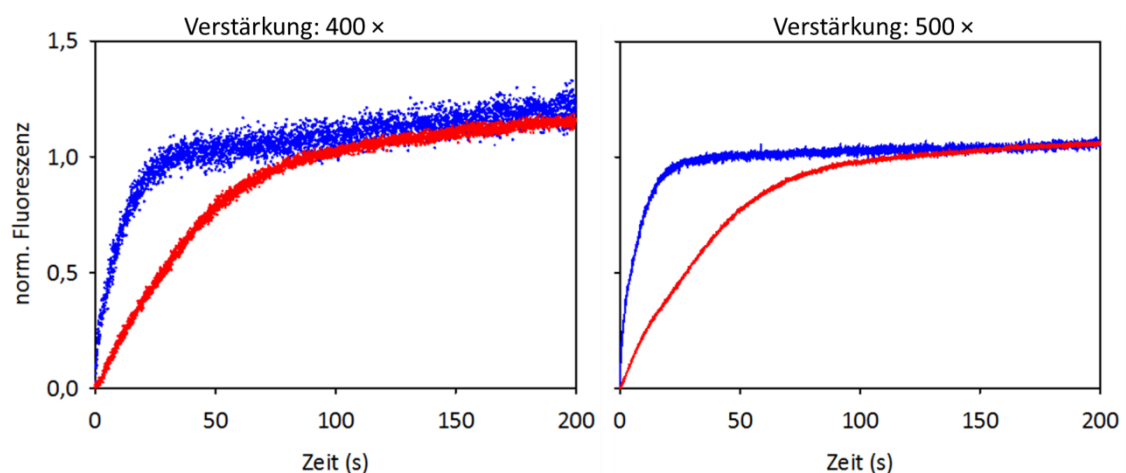


Abbildung 4.31: Messung der Ammoniak-Leitfähigkeit mit 25 mM (rote Kurven) oder 50 mM (blaue Kurven) NH_4Cl bei 400facher (links) und 500facher (rechts) Verstärkung des Photomultipliers

4. Ergebnisse

An Hand der Abbildung 4.31 sieht man den schnelleren Ammoniakestrom je höher der Ammoniak-Gradient ist. Außerdem führte eine höhere Verstärkung des Signals zu einer Reduktion des Rauschens. Der Ammoniak-Transport bleibt von der Verstärkung unbeeinflusst, da die Ratenkonstante bei der Messung mit 25 mM NH_4Cl $0,02 \text{ s}^{-1}$ und bei der Messung mit 50 mM NH_4Cl $0,09 \text{ s}^{-1}$ betrug. Auf Grund der höheren Leitfähigkeit und des geringen Rauschens wurden die folgenden Messungen mit einem chemischen Gradienten von 50 mM und 500facher Verstärkung durchgeführt.

4.3.1.3 Lagerfähigkeit von beladenen Hefezellen

Um die Lagerfähigkeit von beladenen Hefezellen zu testen, wurden die Hefezellen auf Eis über Nacht aufbewahrt und am nächsten Tag zentrifugiert, gewaschen und noch mal vermessen. Die blaue Kurve in Abbildung 4.32 wurde direkt nach der Beladung mit FDA gemessen und die rote Kurve einen Tag später. Im Gegensatz zu Hefeprotoplasten, die bis zu einer Woche haltbar sind, konnten die mit FDA beladenen Hefezellen nicht einen Tag auf Eis stehen gelassen werden. Die Ratenkonstante sank von $0,13$ auf $0,04 \text{ s}^{-1}$. Das starke Rauschen erschwert die Normierung der Kurve und somit die Bestimmung der kinetischen Parameter.

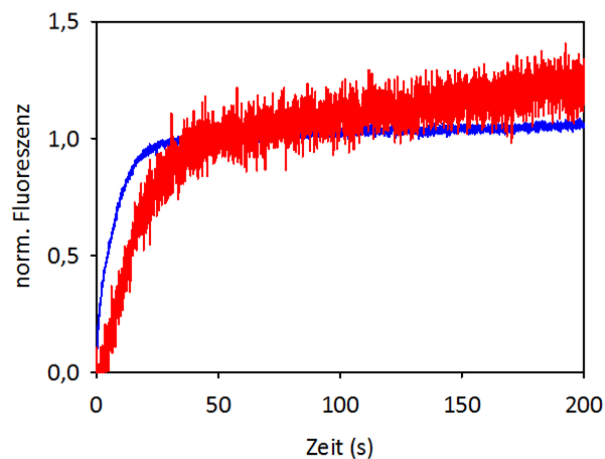


Abbildung 4.32: Lagerfähigkeit von beladenen Hefezellen. Die Zellen wurden direkt nach der Vorbereitung gemessen (blaue Kurve) und nach Inkubation über Nacht auf Eis (rote Kurve)

Außerdem war der Überstand stärker und die Zellen schwächer gelb gefärbt als am Vortag. Das bedeutet, dass Fluorescein aus den Zellen heraus gelangte, was die Qualität der Messung vermindert.

4. Ergebnisse

4.3.1.4 Einfluss der Temperatur

Da alle Transportvorgänge temperaturabhängig sind, wurde der Ammoniakstrom bei 10 und 20 °C verglichen. Bei 10 °C werden Diffusionsvorgänge verlangsamt und bei 20 °C ist die Zellmembran beweglicher und die Diffusion erleichtert. In welchem Ausmaß die Temperaturerhöhung die Ammoniakleitfähigkeit beeinflusst, zeigt die Abbildung 4.33.

Je höher die Temperatur ist, umso schneller fand der Ammoniakstrom statt. Bei 20 °C zeigte die Kurve stärkeres Rauschen, was die Ermittlung der Ratenkonstante nicht möglich macht. Außerdem konnte kein Übergang des exponentiellen Teils in den linearen Teil der Kurve festgestellt werden, was die Normierung der Kurve und Bestimmung der Ratenkonstante sehr schwierig machte. Da bei 10 °C die Diffusion durch die Zellmembran verringert ist, und auf Grund des besseren Kurvenverlaufs, wurde diese Temperatur für die folgenden Messungen festgelegt.

4.3.1.5 Messvolumen

Der letzte Schritt der Optimierung war die Bestimmung des optimalen Messvolumens. Die Messküvette umfasst ein Volumen von 50 µl. Trotzdem können größere Volumina injiziert werden. Hefezellen und der Testpuffer wurden 1:1 zu einem Gesamtvolumen von 202 oder 502 µl gemischt und dann der Ammoniakstrom gemessen. Abbildung 4.34 zeigt, dass das Messvolumen keinen Einfluss auf die Leitfähigkeit hat, allerdings je größer das Volumen ist, umso stärker ist das Rauschen.

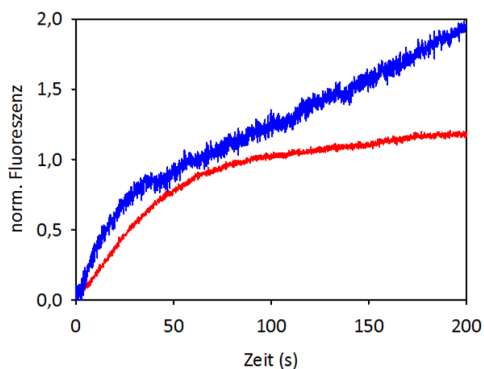


Abbildung 4.33:
Ammoniak-Leitfähigkeit bei 10 °C
(rote Kurve) und 20 °C (blaue Kurve)

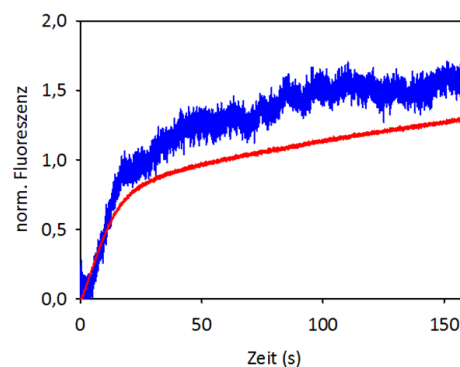


Abbildung 4.34:
Messung der Ammoniakleitfähigkeit in 202 µl
(rote Kurve) und 502 µl (blaue Kurve)

4. Ergebnisse

4.3.2 Messung der Ammoniakleitfähigkeit durch PfAQP und hAQP8

Nach Bestimmung der Methodenparameter in den vorigen Versuchen wurde die Ammoniakleitfähigkeit von beladenen Hefezellen mit PfAQP, hAQP8 und dem leeren Plasmid (Negativkontrolle) gemessen.

Ein Kollege, D. Krenc, hat in seinen Arbeiten die Ammoniakleitfähigkeit von verschiedenen Aqua-(glycero)-porinen auf festen Agar-Medium-Platten und in flüssigen Kulturen untersucht. Die Durchführung dieser Tests ist im Vergleich zur *stopped flow* Methode einerseits einfacher, aber andererseits kann man vergleichen, ob Hefezellen mit dem Aquaporin besser oder schlechter wachsen als Zellen ohne Aquaporin. Wie schnell die Aquaporine Ammoniak leiten, ist mit der Ammoniakmessung mittels *stopped flow* bestimmbar.

In der *stopped flow* Messung wurden die beladenen Hefezellen mit oder ohne Aquaporin einem chemischen Gradienten von 50 mM NH₄Cl bei pH 8 (bzw. 3,1 mM NH₃) ausgesetzt. Dabei kam es zu AmmoniakEinstrom in die Hefezellen, wodurch die Fluoreszenz zunächst exponentiell und nach Ausgleich des Gradienten linear gestiegen ist.

Abbildung 4.35 zeigt die verbesserte Leitfähigkeit, wenn Hefezellen hAQP8 oder PfAQP produzieren. hAQP8 erhöht die Ammoniakpermeabilität um das 3fache, während sie durch PfAQP verdoppelt wird (Tabelle 4.12).

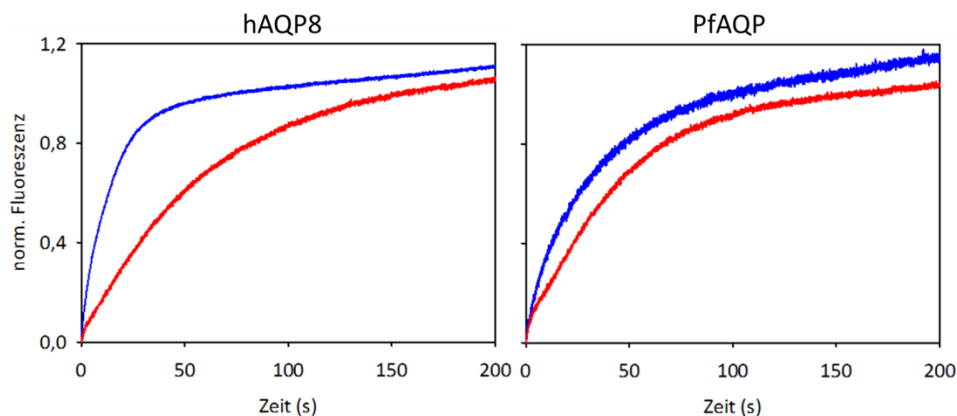


Abbildung 4.35: Ammoniak-Leitfähigkeit von Hefezellen mit Aquaporin (blaue Kurve) im Vergleich zu Hefezellen ohne Aquaporin (rote Kurve)

Tabelle 4.12: Ratenkonstanten der Ammoniak-Leitfähigkeit von Hefezellen mit hAQP8, PfAQP und Kontrolle

	k-Wert in s ⁻¹
hAQP8	0,06
PfAQP	0,04
Kontrolle	0,02

4. Ergebnisse

4.4 Wasserstoffperoxid-Leitfähigkeit durch Aqua-(glycero)-porine

4.4.1 H₂O₂-Leitfähigkeit von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen

Bienert *et al* haben 2006 gezeigt, dass das pflanzliche Aquaglyceroporin TIP1;1 und das humane Aquaporin 8 das Wachstum von Hefezellen in Anwesenheit von H₂O₂ vermindern können, während die gleichen Zellen mit dem wasserspezifischen hAQP1 genauso wie die Zellen ohne AQP gewachsen sind, was bedeutet, dass hAQP1 H₂O₂ nicht leiten kann.

Da in der Literatur wenige Daten über die direkte H₂O₂-Leitfähigkeit von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen vorhanden sind, sollte zunächst bestimmt werden, welche AQP-Gruppe H₂O₂ besser transportieren kann. Dafür wurden Hefezellen mit den orthodoxen Aquaporinen (hAQP8 & rAQP1) und den Aquaglyceroporinen (hAQP9 & PfAQP) auf festen Agar-Medium-Platten und in flüssigen Kulturen untersucht.

Es wurden mehrere Platten mit verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen hergestellt. Hefezellen mit oder ohne AQP wurden auf OD₆₀₀ von 1 eingestellt und daraus eine geometrische 1:10-Verdünnungsreihe hergestellt.

4 µl jeder Verdünnung wurden punktförmig auf jede H₂O₂-Platte pipettiert und 3 Tage bei 29 °C inkubiert (Abb. 4.36).

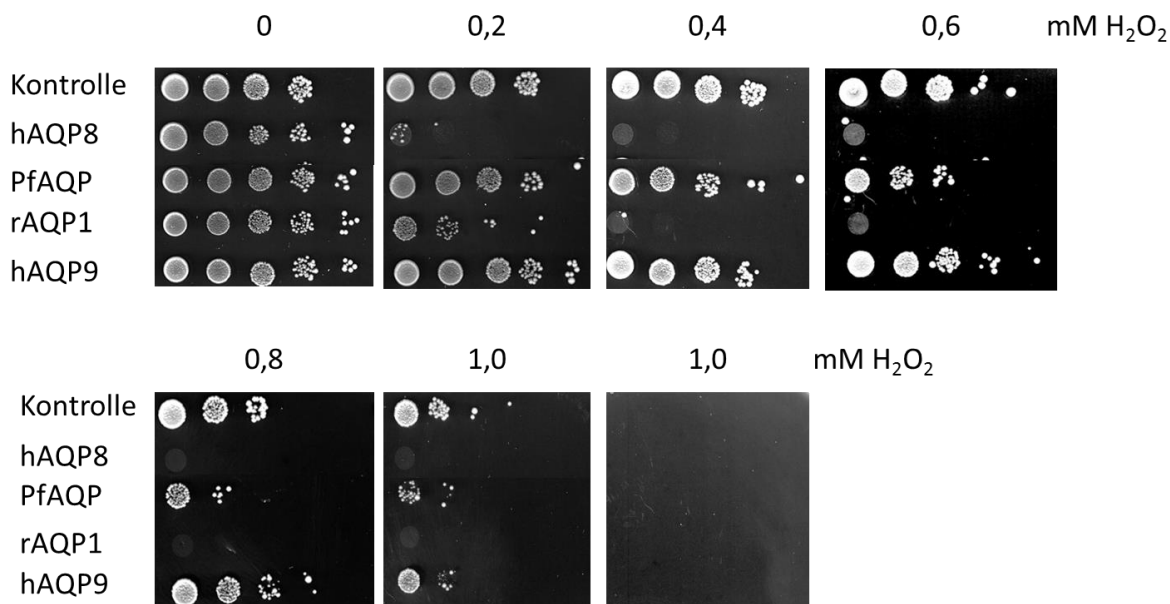


Abbildung 4.36: 4 µl Hefezellen mit dem leeren Plasmid (Kontrolle) oder mit einem Aqua-(glycero)-porin wurden in einer 1:10-Verdünnungsreihe auf Platten ohne oder mit H₂O₂ aufgetragen.

Abbildung 4.36 zeigt zwei Kontrollplatten. Auf der Medium-Platte ohne H₂O₂ (0 mM) sind alle Hefezellen der gleichen Verdünnung untereinander gleichmäßig gewachsen. Das heißt, dass das feste Medium geeignet ist und das Wachstum fördert. Die Platte ohne Hefezellen mit 1 mM H₂O₂ (untere Reihe rechts) wurde auch 3 Tage bei 29 °C inkubiert, um zu zeigen,

4. Ergebnisse

dass die Anwesenheit von H_2O_2 das Medium nicht beschädigt, was das Ergebnis verfälschen kann.

Hefezellen ohne Aquaporin (Kontrolle) konnten bis zu 0,4 mM H_2O_2 gut wachsen. Erst ab 0,6 mM wurde eine zunehmende Verringerung des Wachstums mit steigender H_2O_2 Konzentration beobachtet. Produzieren die Hefezellen hAQP8, so konnten sie bei 0,2 mM H_2O_2 kaum wachsen und ab 0,4 mM war kein Wachstum mehr sichtbar, was der Literatur entspricht (Bienert *et al.*, 2006).

PfAQP führte auch zur Verringerung des Wachstums von Hefezellen im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt wird aber erst ab 0,6 mM H_2O_2 deutlich, was auf eine schwächere Leitfähigkeit deutet als hAQP8.

Überraschend war, dass Zellen mit dem wasserspezifischen AQP1 aus der Ratte (rAQP1) bei kleinen Konzentrationen von 0,2 mM schwach gewachsen sind und ab 0,4 mM H_2O_2 total gehemmt waren. Das ist insofern überraschen, weil Bienert *et al.* gezeigt hat, dass das humane AQP1, welches mit dem rAQP1 gleichgesetzt wird, keine H_2O_2 -Leitfähigkeit hatte. Das Aquaglyceroporin hAQP9 zeigte in diesem Test eine sehr geringe H_2O_2 -Leitfähigkeit, die erst ab höheren Konzentrationen von 0,8 mM bemerkbar ist.

Die H_2O_2 -Leitfähigkeit der gleichen Kulturen wurde auch in flüssigem Medium mit Hilfe des Bioscreens geprüft. Dafür wurden in eine 100 well plate die Hefezellen mit oder ohne AQP mit flüssigem Medium so gemischt, dass eine OD_{600} von 0,1 und 0 / 0,3 / 0,6 / 0,8 mM H_2O_2 eingestellt wurden. Die 100 well plate wurde dann in den Bioscreen gelegt und das Wachstum der Hefezellen 4 Tage über die optische Dichte verfolgt (Abb. 4.37)

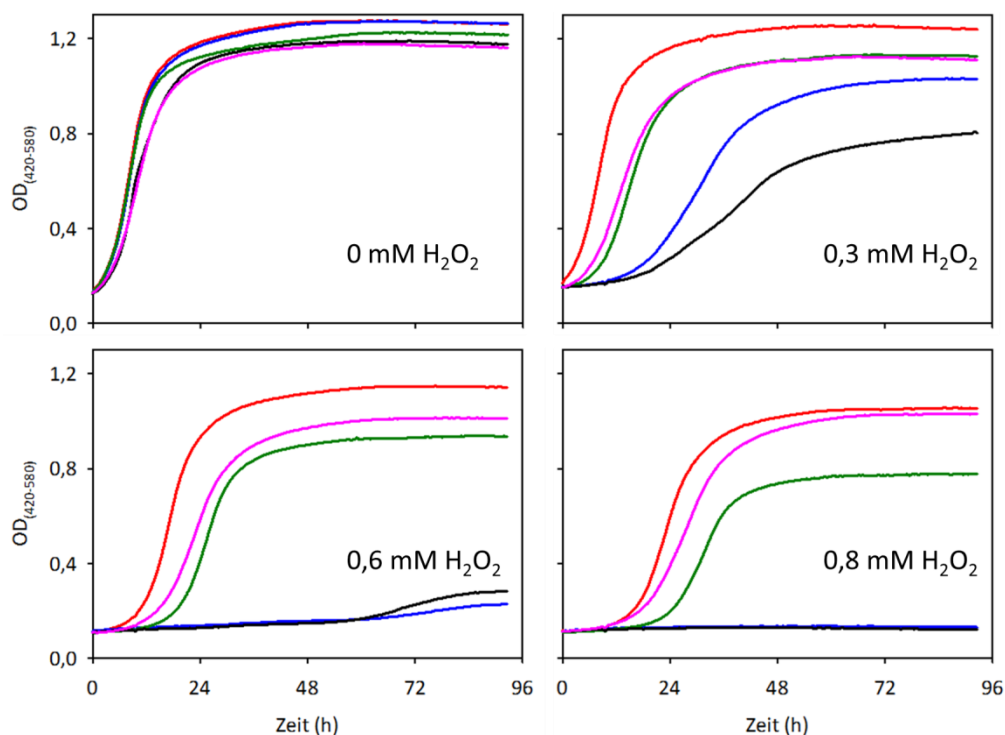


Abbildung 4.37: Wachstum von Hefezellen mit dem leeren Plasmid (rot), hAQP8 (blau), PfAQP (grün), rAQP1 (schwarz) und hAQP9 (rosa) bei 0 / 0,3 / 0,6 / 0,8 mM H_2O_2

4. Ergebnisse

Entsprechend dem Test auf festen Platten sind alle Zellen mit oder ohne AQP in Abwesenheit von H_2O_2 gleichmäßig gewachsen. In Anwesenheit von H_2O_2 führt die heterologe Produktion der Aquaglyceroporine hAQP9 (die Kurve in Rosa in Abb. 4.37) und PfAQP (grüne Kurve) zu Verschlechterung des Wachstums von Hefezellen, wobei dieser Effekt stärker wird, je höher die H_2O_2 -Konzentration ist. Den gleichen Effekt aber viel stärker betrachtet man bei Hefezellen, die die orthodoxen Aquaporine hAQP8 (in blau) und rAQP1 (in schwarz) produzierten. Schon mit 0,3 mM H_2O_2 wurden z. B. die lag-Phasen beider Zellkulturen um ca. 18 Stunden verschoben. Mit 0,6 und 0,8 mM H_2O_2 war das Wachstum fast total gehemmt.

Um das Ausmaß der Hemmung zu verdeutlichen, wurden die Flächen unter den Kurven mit 0,3 / 0,6 / 0,8 mM H_2O_2 berechnet und auf die Fläche unter der Kurve ohne H_2O_2 bezogen. Abbildung 4.38 zeigt das Balkendiagramm für die Kontrollzellen.

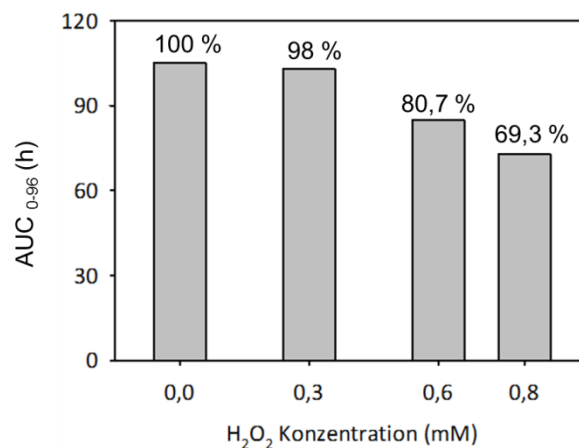


Abbildung 4.38: Abnahme der Flächen unter den Kurven der Kontrollzellen in Abhängigkeit von der H_2O_2 -Konzentration

Hierbei sieht man eine zunehmende Hemmung des Wachstums mit steigender H_2O_2 -Konzentration, was auf die einfache Diffusion von H_2O_2 zurückzuführen ist. Stärker fand die Hemmung statt, wenn die Zellen Aqua-(glycero)-porine haben.

4. Ergebnisse

Abbildung 4.39 zeigt die Balkendiagramme von Zellen mit den Aquaglyceroporinen hAQP9 und PfAQP. Die Abnahme des Wachstums mit steigender H_2O_2 -Konzentration ist deutlich. Allerdings führte PfAQP zu einer Hemmung als hAQP9, was eine höhere Leitfähigkeit bedeutet.

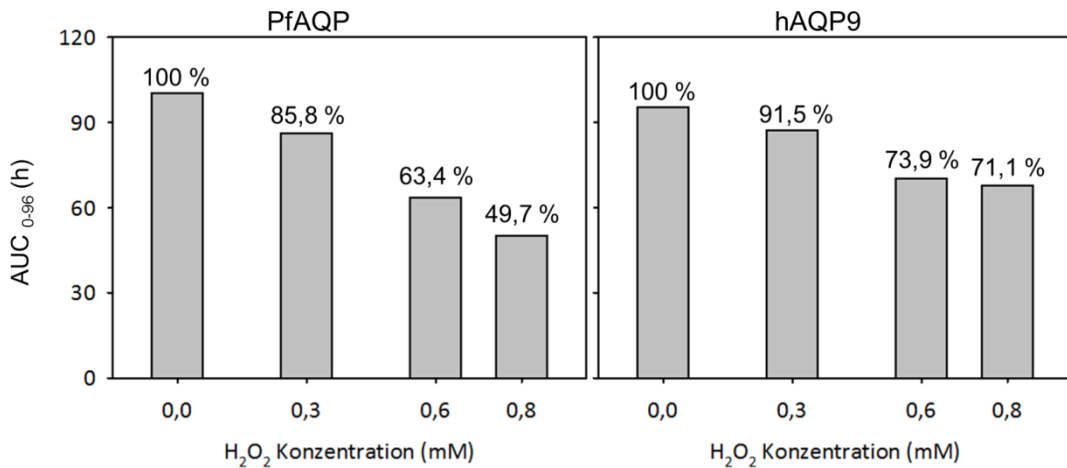


Abbildung 4.39: Abnahme des Wachstums von Zellen mit den Aquaglyceroporinen hAQP9 (rechts) und PfAQP (links)

In Abbildung 4.40 sind die Balkendiagramme für Zellen mit den orthodoxen hAQP8 und rAQP1. Hier betrachtet man eine stärkere Hemmung des Wachstums als mit den Aquaglyceroporinen, was auf bessere H_2O_2 -Leitfähigkeit der orthodoxen Aquaporine darstellt. Während 0,8 mM H_2O_2 das Wachstum von Zellen mit hAQP9 und PfAQP zu einer Hemmung von 30 bzw. 50 % verursacht hat, führte die gleiche Konzentration zur Hemmung des Zellwachstums mit hAQP8 und rAQP1 um mehr als 90 %.

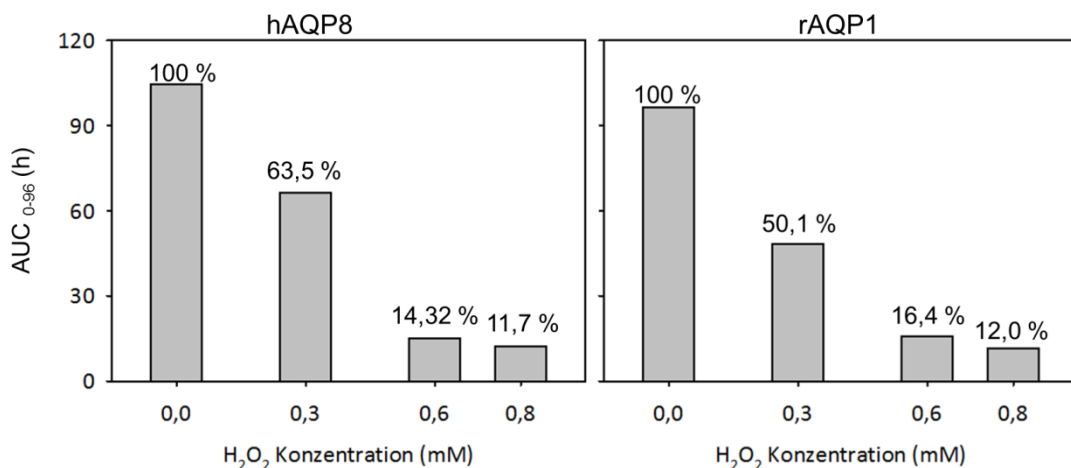


Abbildung 4.40: Abnahme des Wachstums von Zellen mit den orthodoxen Aquaporinen rAQP1 (rechts) und hAQP8 (links)

Somit konnte nachgewiesen werden, dass die besser Wasser leitenden Aquaporine auch besser H_2O_2 leiten als solche mit einer geringeren Wasserleitfähigkeit.

4. Ergebnisse

4.4.2 Vergleich der H₂O₂-Leitfähigkeit von rAQP1 und hAQP1

Dafür wurden Hefezellen ohne AQP, mit AQP oder AQP-Mutanten eingesetzt (Tab. 4.13):

AQP	Beschreibung
-	Negativkontrolle
hAQP8	Positivkontrolle
hAQP8 I200H	engere ar/R-Region
rAQP1	Es zeigte unter 4.5.1 hohe H ₂ O ₂ -Leitfähigkeit
rAQP1 H180A	größere ar/R-Region
rAQP1 H180F	kleinere ar/R-Region
hAQP1	Es zeigte bei Bienert <i>et al.</i> keine H ₂ O ₂ -Leitfähigkeit
hAQP1 H180A	entspricht rAQP1 H180A

Die Tests erfolgten genauso wie unter 4.4.1. Alle Hefezellen zeigten gleichmäßiges Wachstum auf der Platte ohne H₂O₂. Mit 0,2 mM H₂O₂ wuchsen die Zellen mit hAQP8 schwächer, als die Kontrolle und ab 0,4 mM war kein Wachstum sichtbar.

In der Mutante hAQP8 IH wurde die Aminosäure Isoleucin durch das größere Histidin ersetzt, so dass die ar/R-Region enger wird. Auf den Platten mit 0,2 und 0,4 mM H₂O₂ zeigten Hefezellen mit dieser Mutante besseres Wachstum als Zellen mit dem AQP8-Wildtyp, was auf eine schwächere H₂O₂-Leitfähigkeit hindeutet.

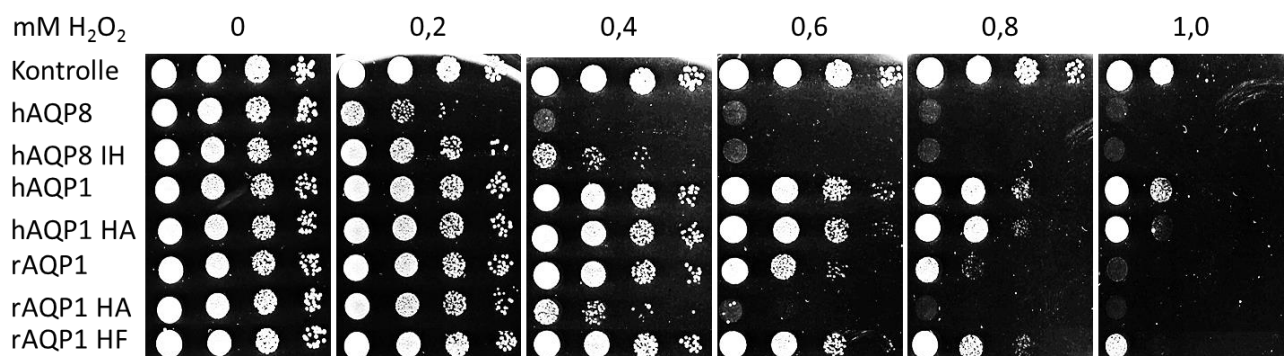


Abbildung 4.41: Wachstum von Hefezellen mit leerem Plasmid (Kontrolle) oder mit AQP/AQP-Mutanten

Hefezellen mit dem hAQP1 wuchsen auf allen Platten sehr ähnlich wie die Kontrolle. Ab 0,8 mM H₂O₂ kann man einen kleinen Unterschied bei kleinen OD₆₀₀-Werten erkennen und genauso verhielten sich Zellen mit der Mutante hAQP1 HA.

Interessant war, dass Hefezellen mit rAQP1 ab 0,6 mM H₂O₂ schwaches Wachstum zeigten und ab 0,8 mM gar nicht gewachsen sind. Noch deutlicher ist es bei Hefezellen mit der Mutante rAQP1 HA, die der Mutante hAQP1 HA entspricht. Die Zellen wuchsen schon bei 0,4 mM H₂O₂ schwächer als die Kontrolle und Zellen mit dem Wildtyp rAQP1 und ab 0,6 mM war das Wachstum nicht mehr sichtbar. Im Gegensatz zu rAQP1 HA konnten Zellen

4. Ergebnisse

mit der verkleinerten ar/R-Region der Mutante rAQP1 HF bei allen H_2O_2 -Konzentrationen besser wachsen. Eine gewisse H_2O_2 -Leitfähigkeit bleibt allerdings vorhanden, da die Zellen ab 0,6 mM H_2O_2 schwächer wachsen als die Kontrolle.

Die gleichen Ergebnisse lieferte die Messung in flüssigen Kulturen (Abb. 4.42).

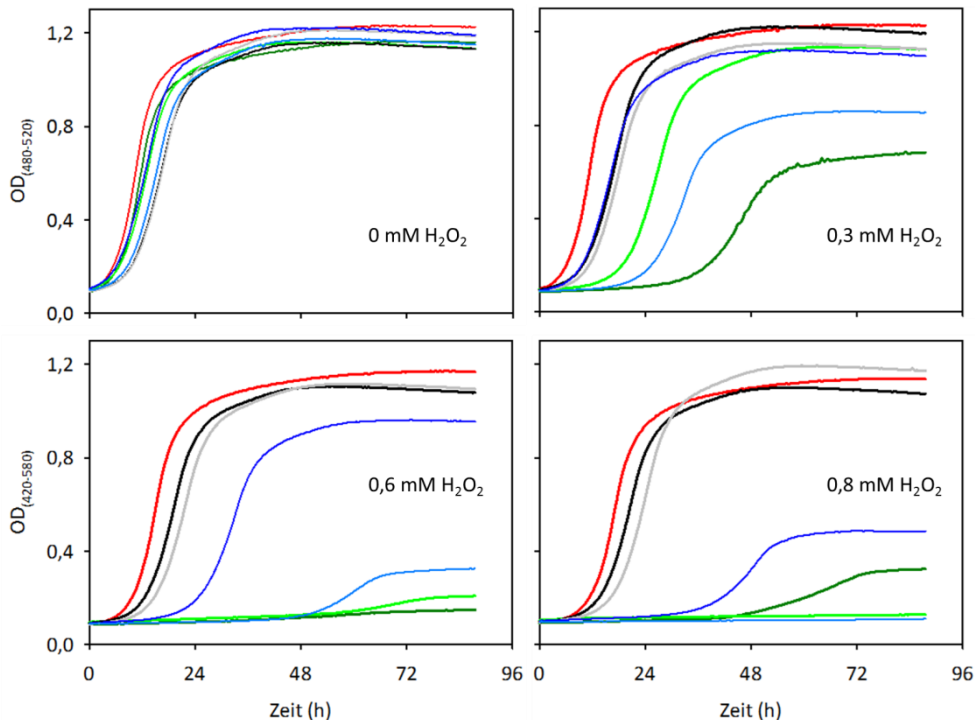


Abbildung 4.42: Wachstum der gleichen Zellen wie unter 4.41, aber in flüssigen Kulturen. Kontrolle: rote, hAQP8: dunkelgrün, hAQP8 IH: hellgrün, hAQP1: schwarz, hAQP1 HA: grau, rAQP1: dunkelblau, rAQP1 HA: hellblau

Ohne H_2O_2 sind alle Hefezellen mit oder ohne AQP gleichmäßig gewachsen. Die Kontrollzellen (rote Kurve) und Zellen mit hAQP8 (dunkelgrüne Kurve) verhielten sich genauso wie im oberen Versuch (siehe Abb. 4.37). Die Zellen mit der Mutante hAQP8 IH (hellgrün) konnten in 0,3 mM H_2O_2 besser und schneller wachsen als die Zellen mit dem hAQP8-Wildtyp, aber bei den höheren Konzentration war kein Wachstum zu sehen, entsprechend dem Test auf festem Medium (Abb. 4.41).

Zellen mit hAQP1 (schwarze Kurve) und der Mutante hAQP1 HA (graue Kurve) konnten bei allen H_2O_2 -Konzentrationen überleben und sind ähnlich gewachsen wie die Kontrollzellen. Hingegen wuchsen Zellen mit rAQP1 (dunkelblau) in 0,3 und 0,6 mM schwächer als die Kontrolle und Zellen mit hAQP1. In 0,8 mM war das Wachstum kaum sichtbar. Zellen mit der Mutante rAQP1 HA (hellblau) ist kaum bei 0,3 mM gewachsen und fast gar nicht bei 0,6 und 0,8 mM H_2O_2 , was auf eine höhere H_2O_2 -Leitfähigkeit hindeutet als für rAQP1-Wildtyp. Wie im vorigen Versuch wurden die AUC mit 0,3 / 0,6 / 0,8 mM H_2O_2 berechnet und auch die AUC ohne H_2O_2 bezogen.

4. Ergebnisse

Die Abbildungen 4.43 und 4.44 zeigen das Ausmaß der Wachstumshemmung von Hefezellen mit den Aquaporinen hAQP1, rAQP1 und den Mutanten.

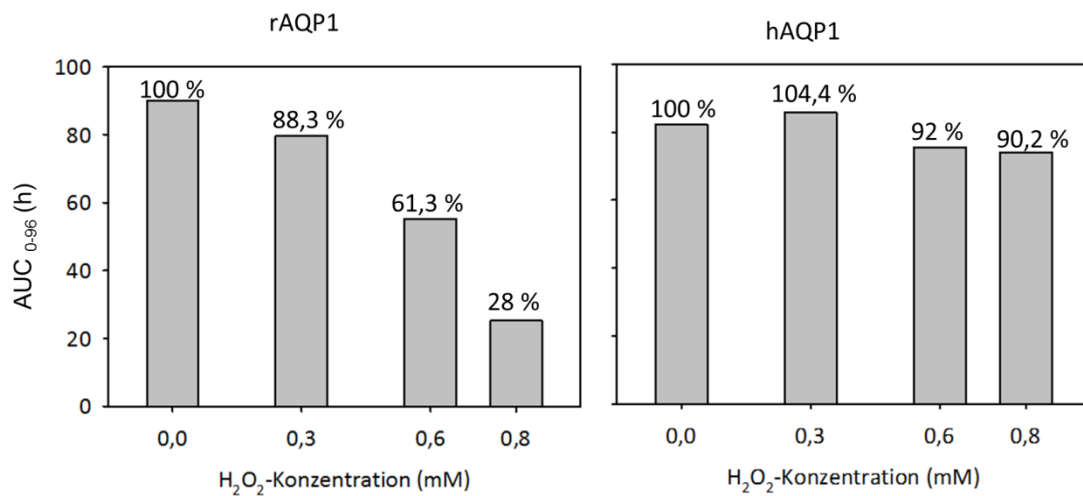


Abbildung 4.43: Hemmung des Wachstums als Maß für die H₂O₂-Leitfähigkeit von rAQP1 und hAQP1

Während Hefezellen mit dem humanen Aquaporin 1 bei allen H₂O₂-Konzentrationen unbeeinflusst wachsen konnten, waren diejenigen mit dem Ratte Aquaporin 1 sehr stark in ihrem Wachstum gehemmt. Den gleichen Effekt betrachtet man in den Zellen mit den entsprechenden Mutanten, wobei jede Mutante immer eine höhere H₂O₂-Leitfähigkeit gegenüber ihrem Wildtyp hatte.

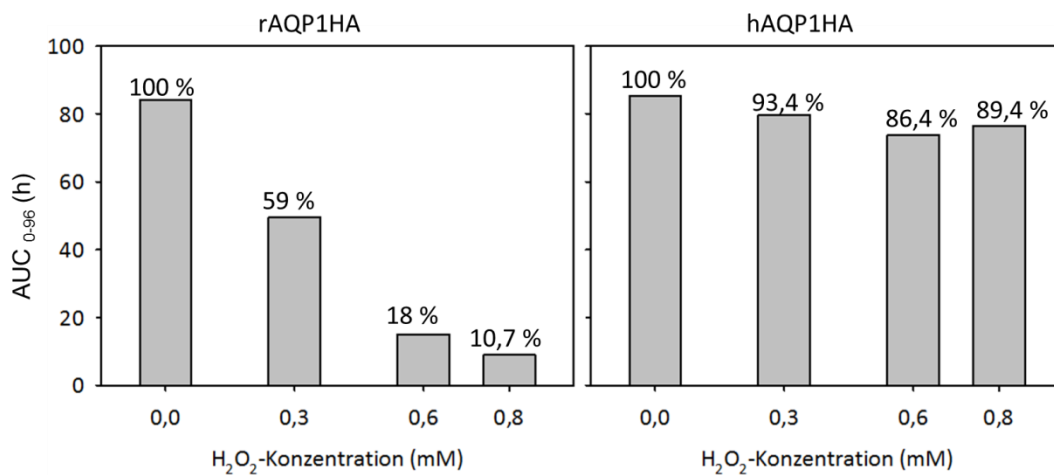


Abbildung 4.44: Hemmung des Wachstums als Maß für die H₂O₂-Leitfähigkeit von den Mutanten rAQP1HA und hAQP1HA

4. Ergebnisse

Mit den gleichen Kulturen wurde die Wasserleitfähigkeit von rAQP1, hAQP1 und der Negativkontrolle gemessen, um zu prüfen, ob diese mit der H_2O_2 -Leitfähigkeit korreliert. Dafür wurden Protoplasten präpariert, die einem auswärts gerichteten osmotischen Gradienten von 300 mOsm ausgesetzt wurden (Abb. 3.45).

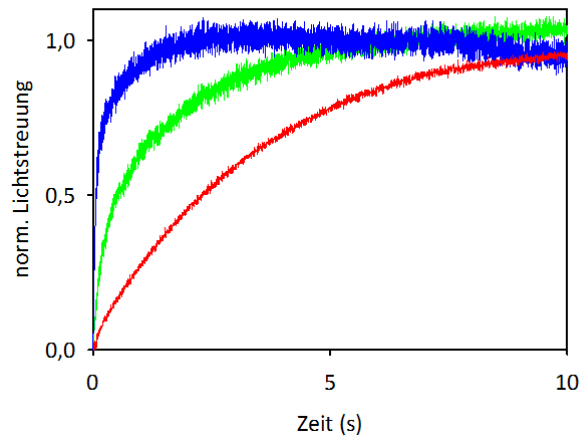


Abbildung 4.45: Wasserleitfähigkeit von Protoplasten mit rAQP1 (blaue Kurve), hAQP1 (grüne Kurve) und Negativkontrolle (rote Kurve)

Protoplasten mit dem rAQP1 leiteten Wasser sehr schnell. Die Ratenkonstante beträgt $12,46 \text{ s}^{-1}$. Hefeprotoplasten mit dem hAQP1 leiteten Wasser 6mal langsamer ($k = 2,21 \text{ s}^{-1}$) und die Kontrollprotoplasten zeigten die typische Leitfähigkeit mit einem k -Wert von $0,5 \text{ s}^{-1}$.

Im *Western Blot* konnte die Produktion der Aquaporine und die AQP-Mutanten qualitativ nachgewiesen werden.

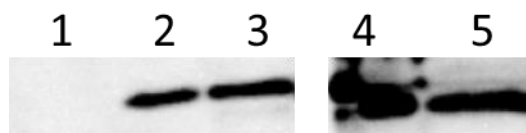


Abbildung 4.46: Western Blot Analyse von 1) Negativkontrolle, 2) hAQP1, 3) hAQP1HA, 4) rAQP1 und 5) rAQP1HA.

In der Spur 1 wurde die mikrosomale Proteinfraction aus den Kontrollzellen aufgetragen. In 2 und 3 sieht man hAQP1 und hAQP1HA, detektiert mit dem Antikörper gegen den N-terminalen HA-Tag. Unter 4 und 5 sieht man rAQP1 und rAQP1HA, detektiert mit dem rAQP1-Antikörper. Auffällig ist, dass die Banden für rAQP1 und rAQP1HA zwei- bis dreimal stärker sind. Leider konnte aus Zeitgründen keine qualitative Bestimmung durchgeführt werden.

5. Diskussion

5.1 Optimierung der *stopped flow* Methode zur Messung der Wasser- und Glyceroleitfähigkeit

Die *stopped flow* Methode ist die am meisten eingesetzte Methode zur Charakterisierung der Funktion von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen (Verkman 2000). Sie wurde zur Messung der Wasserpermeabilität von Erythrozyten (Mlekoday, Moore & Levitt, 1983), Vesikeln und Liposomen (Verkman, Dix & Seifter, 1985; van Hoek & Verkman, 1992; Dobbs et al., 1998) entwickelt. Das Prinzip der Messung beruht auf die schnelle Generierung eines osmotischen oder chemischen Gradienten über die Zellmembran. Durch Transport von Wasser oder Solut kommt es zu Änderung des Zellvolumens und dadurch der Lichtstreuung. Letzteres wird in zeitlicher Abhängigkeit registriert und als eine Exponentialkurve wiedergegeben. Mit Hilfe dieser registrierten Kurven können kinetische Parameter wie z. B. die Ratenkonstante, Relaxationszeit und die Transportgeschwindigkeit ermittelt werden. Weitere Vorteile dieser Methode sind die kleinen benötigten Messvolumina und die Fähigkeit (abhängig von der Gerät-Konstruktion) mehrere Solut-Puffer gleichzeitig einzusetzen, so dass die Leitfähigkeit eines Aqua-(glycero)-porins für mehrere Solute in einem Experiment zu testen.

Trotz des lang jährigen Einsatzes ist die Durchführung der *stopped flow* Messungen in den verschiedenen Laboren und Arbeitsgruppen nicht einheitlich. Bei Messung der Wasserleitfähigkeit verwenden die einen Sorbitol, die anderen Mannitol oder auch Sulfat, um den osmotischen Gradienten, der manchmal auswärts und manchmal einwärts gerichtet ist, zu generieren. Bei Messung der Leitfähigkeit von Glycerol oder Harnstoff werden manchmal isoosmotische oder hyperosmotische, Solut haltige Puffer eingesetzt. Der osmotische oder chemische Gradient ist auch in jeder Arbeitsgruppe unterschiedlich. Während Arbeitsgruppen mit 150 mOsm messen, führen andere Gruppen die Messung mit 20 mOsm durch.

Das alles erschwert den direkten Vergleich der Ergebnisse verschiedener Publikationen und hat sogar dazu gebracht, dass die Funktion von PfAQP als Wasserkanal fünf Jahre umstritten blieb. Deswegen war es wichtig, durch gezielte Versuche ein optimales Durchführungsprotokoll zu finden, mit dem richtige und reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden.

Angefangen wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Vorbereitung der Hefezellen. Die Messung erfolgt mit Hefeprotoplasten, die durch Verdau der Zellwand mit Zymolyase20T präpariert werden (3.3.3.1). Durch den Einsatz verschiedener Zymolyase-Konzentration (4.2.1) konnte ein Optimum von 200 U pro Gramm Hefe gefunden werden. Geringere Mengen lieferten einen langsameren Transport und größere Mengen führten zu einem

5. Diskussion

größeren Rauschen, was auf einen übermäßigen Verdau der Zellwand und der Zellproteine (wie z. B. Aquaporine) zurückzuführen sein kann (Abb. 4.10).

Zur Vereinfachung der Messung wurde auch die Lagerfähigkeit von Hefeprotoplasten (4.2.2) bestimmt. Eine Woche lang konnten die Protoplasten bei 4 °C im Kühlschrank in einem sterilen Gefäß aufbewahrt werden, ohne eine bemerkbare Beeinträchtigung ihrer Eigenschaften zu befürchten (Abb. 4.11).

Hefeprotoplasten kann man nicht nur zum Schrumpfen durch einen hyperosmotischen Schock zwingen, sondern auch zum Anschwellen bringen, wenn sie einem hypoosmotischen Gradienten ausgesetzt werden (4.2.3). Beide Fälle sind machbar und liefern identische Ergebnisse (Abb. 4.12). Ob Wasseraustritt oder –eintritt; es wird in jedem Fall die gleiche Wassermenge mit der gleichen Ratenkonstante transportiert. Deswegen lag der Schnittpunkt beider Schrumpf- und Schwell-Kurve bei 50 %.

Den größten Einfluss spielt der osmotische Druck. Verglichen wurden 150 und 300 mOsm (4.2.4). Während mit 300 mOsm der Wassertransport nach 36,3 s beendet war, dauerte der Transport der gleichen Wassermenge mit 150 mOsm fast doppelt so lang (63,8 s). Das ist logisch, denn je höher der osmotische Druck ist, umso schneller wird Wasser transportiert. Die Ratenkonstante betrug aber in beiden Fällen $1,2 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$. Diese Konstante beschreibt lediglich eine Änderung pro Zeiteinheit, die erst nach Normierung der Kurven (3.3.3.1) erhalten werden kann. Durch die Normierung werden Faktoren (wie der angesprochene Gradient, Volumen und Oberfläche der Protoplasten) ausgeschlossen, so dass sie keinen Einfluss auf das Ergebnis ausüben können.

Mit diesen Einstellungen wurde die Wasser- und Glyceroleitfähigkeit des umstrittenen PfAQP untersucht.

5.2 Einfluss von Polyolen auf die Funktion von PfAQP und EcGlpF

5.2.1 Wasserleitfähigkeit von PfAQP

Die Wasserleitfähigkeit von Aquaglyceroporinen, die einen weiten Filter zur Größenselektion in der ar/R-Region haben, wird seit Jahren diskutiert. Während experimentelle Daten schwache bis fehlende Wasserleitfähigkeit von EcGlpF zeigen (Maurel *et al.*, 1994 & Fu *et al.*, 2000), sagen Computersimulationen eine hohe Wasserpermeabilität vorher (Hashido *et al.*, 2005 & Aponte-Santamaría *et al.*, 2010). Die Diskussion wurde dann stärker als sich experimentelle Daten über die Wasserleitfähigkeit von PfAQP widersprachen.

Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktion von PfAQP und EcGlpF in Puffern mit verschiedenen Polyolen untersucht. Dies hat zwei Vorteile; zum einen wurde durch die Versuche in dieser Arbeit die Wasserleitfähigkeit von PfAQP nachgewiesen und die

5. Diskussion

fehlende Leitfähigkeit von EcGlpF bestätigt. Zum anderen wurde die Zusammensetzung der *stopped flow* Puffer dadurch im Rahmen der Methodenoptimierung verbessert, so dass die Funktion weiterer Aqua-(glycero)-porine zuverlässig bestimmt werden kann.

Durch Präparation in Sorbitolpuffern konnte keine Verbesserung der Wasserpermeabilität von Protoplasten mit EcGlpF oder PfAQP im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden (4.3.2; Abb. 4.16 & Tab. 4.3). Die 26fach höhere Wasserleitfähigkeit von Protoplasten mit rAQP1 in dem Sorbitolpuffer ist ein klares Zeichen, dass die Methode einwandfrei funktionierte.

Durch Präparation in Saccharosepuffern zeigten Protoplasten mit PfAQP eine fünffach höhere Wasserpermeabilität als die Kontrolle, während Protoplasten mit EcGlpF auf dem Niveau der Kontrolle lagen. (4.3.2; Abb. 4.17 & Tab. 4.4).

Somit wurde bewiesen, dass das eingesetzte Polyol einen Einfluss auf die Funktion von PfAQP hat. Außerdem beweisen diese Experimente wiederholt, dass EcGlpF in Hefeprotoplasten keine Wasserleitfähigkeit besitzt.

Saccharose ist ein großes cyclisches Disaccharid. Auf Grund der Molekülgröße ($289,15 \text{ \AA}^3$) ist Saccharose nicht in der Lage, mit dem PfAQP-Kanal in Wechselwirkung zu treten, so dass der Kanal während der Inkubation und Messung frei für die Wassermoleküle steht. Dagegen ist Sorbitol ($165,04 \text{ \AA}^3$) eine lineare Kette mit sechs OH-Gruppen. Dadurch kann Sorbitol mit dem PfAQP interagieren und über die OH-Gruppen starke Bindungen zu den Aminosäuren bilden, was der Wassertransport zu 100 % blockiert hat.

PEG300 ($277,52 \text{ \AA}^3$) führte zu 44 % Hemmung der Wasserpermeabilität von PfAQP. Es ist, ähnlich wie Sorbitol, eine lineare aber längere Kette mit nur zwei OH-Gruppen. Die Länge und die Zickzack-Struktur der PEG300-Kette erlauben eine geringere Beweglichkeit des Moleküls. Außerdem kann PEG300 über die beiden OH-Gruppen schwächer mit dem Kanal in Wechselwirkung treten als Sorbitol mit den sechs Gruppen.

In Glycerol wurde die Wasserleitfähigkeit von PfAQP um ca. 95 % erniedrigt. Es ist aber bekannt, dass PfAQP Glycerol leiten kann (Hansen *et al.*, 2002). Deswegen wird vermutet, dass während der Inkubation der Protoplasten in dem Glycerolpuffer zu Glyceroltransport gekommen ist, so dass nach dem Mischen in der *stopped flow* Apparatur kein oder nur ein schwacher Gradient aufgebaut werden konnte, auf Grund dessen der Wassertransport betrieben wird (Abb. 4.20 & Tab. 4.7).

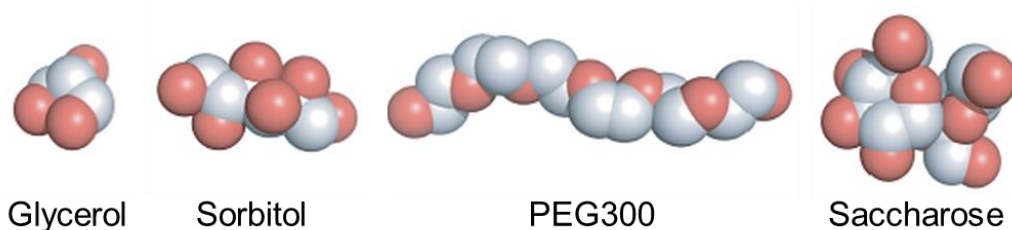


Abbildung 5.1: Struktur und Größe der eingesetzten Polyole

5. Diskussion

5.2.2 Warum leitet PfAQP Wasser, EcGlpF jedoch nicht?

Die Aminosäuresequenz von PfAQP zeigt 35 % Identität, 50 % Gesamtähnlichkeit und 60 % Ähnlichkeit in den transmembranären Bereichen zu EcGlpF (Beitz *et al.*, 2003). Trotzdem zeigen beide Aquaglyceroporine unterschiedliche Wasserpermeabilitäten. Dafür sind Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren in der Schleife C von PfAQP mit dem Arginin der ar/R-Region verantwortlich.

In PfAQP tritt ein negatives Glutamat (E125) mit der positiven Seitenkette von Tryptophan (W212) in Wechselwirkung, die zur Stabilisierung der C-Schleife nahe dem Poreneingang des Kanals führt. Dadurch können die Seitenketten von Tryptophan (W124) und Serin (S200) in dieser Schleife mehrere H-Brücken zu den NH₂-Gruppen des Arginins (R196) in der ar/R-Region bilden. In EcGlpF ist nur eine H-Brücke zwischen dem Phenylalanin (F135) und dem Arginin (R206) vorhanden (Newby *et al.*, 2008). Die zusätzlichen H-Brücken zu dem Arginin in PfAQP führen zur Erniedrigung der Aktivierungsenergie von 7,5 auf 3,5 kcal·mol⁻¹ (Beitz *et al.*, 2003). Außerdem zeigen dynamische Simulationen auch, dass in EcGlpF der Bereich der ar/R-Region zwischen Tryptophan (W48) und Phenylalanin (F200) kaum von Wassermolekülen besetzt ist (Fu *et al.*, 2000; Tajkhorshid *et al.*, 2002). Wenn W48 durch Phenylalanin und F200 durch ein Threonin ersetzt werden, wird dieser Bereich breiter und hydrophiler, so dass die Belegung mit Wasser besser wird und sich die Wasserleitfähigkeit einer solchen EcGlpF Mutante erhöht.

5.2.3 Hemmung des PfAQP durch Sorbitol

Durch sofortiges Mischen der PfAQP-Protoplasten mit einem Sorbitol haltigen Puffer war die Wasserleitfähigkeit unbeeinflusst. Erst nach Inkubation für mehrere Stunden oder durch die direkte Präparation der Protoplasten in dem Sorbitolpuffer konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung nachgewiesen werden (Abb. 4.22 und 4.23). Dies bedeutet, dass die Sorbitolmoleküle eine gewisse Zeit brauchen, um die Wassermoleküle aus dem PfAQP-Kanal zu verdrängen.

Durch Verwendung von mehreren Saccharose/Sorbitol-Mischungen konnte ein IC₅₀-Wert von 0,81 M Sorbitol ermittelt werden (Abb. 4.24). Das zeigt einen schwachen Hemmungseffekt im Vergleich zu Wirkstoffen. Außerdem ist ein hoher Sorbitolanteil notwendig, um eine 100 % Hemmung zu erzielen.

5.2.4 Glycerolleitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF

Nachdem der Einfluss des eingesetzten Polyols auf die Wasserleitfähigkeit von PfAQP bewiesen wurde, wurde die Glycerolleitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF untersucht.

5. Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass das Polyol keinen Einfluss auf den Glyceroltransport von EcGlpF hat. In Saccharose, Sorbitol und PEG300 leitete EcGlpF Glycerol mit einer Ratenkonstante von $0,023 \pm 0,0026 \text{ s}^{-1}$ (Abb. 4.25 und Tab. 4.9).

Im Gegensatz dazu zeigte PfAQP eine Polyol abhängige Glycerolleitfähigkeit. Während PfAQP in Saccharose Glycerol besser leitete als EcGlpF, fand in Sorbitol und PEG300 eine Verringerung um 80 % statt. Es konnte aber keine 100 % Hemmung erzielt werden, wie es der Fall der Wasserleitfähigkeit war.

5.2.5 Warum hemmt Sorbitol nur PfAQP? Warum wird die Wasserleitfähigkeit stärker gehemmt als die Glycerolleitfähigkeit?

Die Kanalbereiche von PfAQP und EcGlpF sind nahezu identisch. Zwei Unterschiede liegen in dem Bereich zwischen der ar/R-Region und den NPA-Motiven: Met24 in PfAQP an Stelle Ile22 in EcGlpF und Leu192 in PfAQP an Stelle Met202 in EcGlpF. Die genannten Aminosäuren sind unpolar mit ähnlicher Größe. Somit ist die Ladungsverteilung in beiden Kanälen nur wenig unterschiedlich. Dementsprechend sollten sich die Wasser- und Glycerolleitfähigkeiten beider Aquaglyceroporine ähnlich verhalten. Die Ergebnisse zeigen aber einen höheren Wasser- und Glyceroltransport durch PfAQP als EcGlpF. Betrachtet man aber die Kristallstruktur beider Aquaglyceroporine, so sieht man mehr Glycerolmoleküle in PfAQP als in EcGlpF, obwohl beide Proteine unter gleichen Bedingungen (15 % Glycerol) kristallisiert wurden.

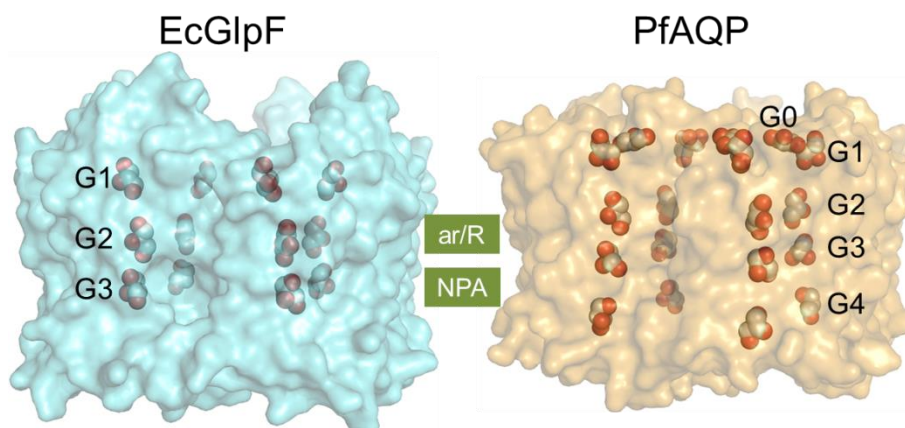


Abbildung 5.2: Seitenansicht von EcGlpF (nach PDB 1FX8) und PfAQP (nach PDB 3CO2). In der PfAQP-Kristallstruktur sind fünf Glycerolmoleküle (G0-G4) vorhanden, während in der des EcGlpF nur drei (G1-G3) sind.

Die Glycerolmoleküle G1, G2 und G3 befinden sich in ähnlichen Positionen in beiden Kanälen. G1 ist in dem unteren Teil der Kanal-Einmündung, G2 in der ar/R-Region und G3 in der NPA-Region. Die beiden Glycerolmoleküle in PfAQP G0 und G4 weisen auf eine höhere Bindungsaffinität des PfAQP-Kanals als die des EcGlpF. G4 ist im unteren Teil und G0 liegt in dem oberen Einmündungsbereich des Kanals.

5. Diskussion

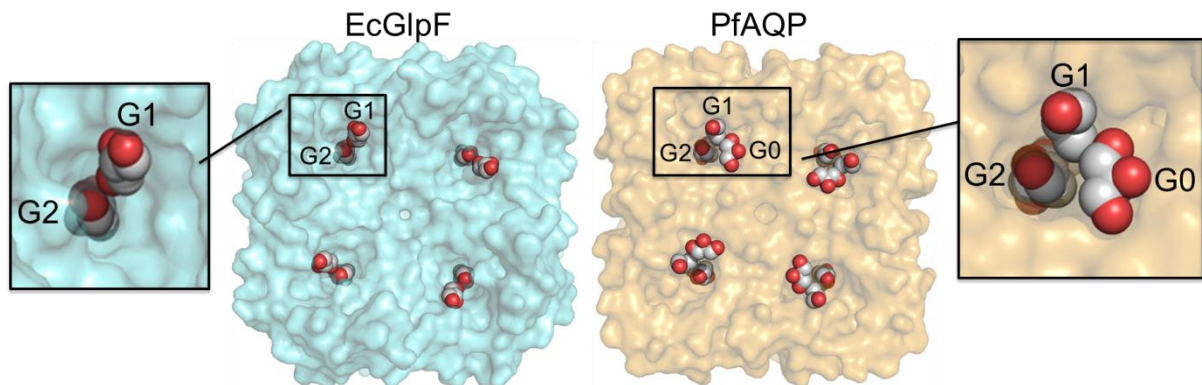


Abbildung 5.3: Aufsicht von EcGlpF und PfAQP. In dieser Darstellung sieht man das liegende G0 in PfAQP auf dem Einmündungsbereich des Kanals.

An Hand der Vergrößerung sieht man, dass der Einmündungsbereich in PfAQP größer ist als in EcGlpF. PfAQP besitzt eine Art Bindungstasche an der Einmündung, wo G0 genau hinein passt. Würde man die Glycerolmoleküle G0 und G1 entfernen, würde an deren Stelle ein Sorbitolmolekül setzen. Deswegen wird vermutet, dass das Sorbitolmolekül nicht in den Kanal hinein dringt und den Kanal „verstopft“ sondern den Einmündungsbereich teilweise bedeckt. Dies verhindert den Transport von Wasser, kann aber den Transport von Glycerol nur vermindern, da Glycerol auf Grund seiner Struktur und Geometrie höhere Affinität zum Kanal hat als Sorbitol.

Der Bereich, wo sich G0 und G1 in PfAQP befinden, ist in EcGlpF nicht vorhanden. Somit besitzt Sorbitol keine Interaktionsfläche, um den Glyceroltransport von EcGlpF zu beeinflussen, was die gleich bleibende Glycerolleitfähigkeit in Saccharose, Sorbitol oder PEG300 erklärt.

5.2.6 Molenbruch-Anomalie von PfAQP

Durch zwei Testsysteme wurde die Molenbruch-Anomalie untersucht. Damit sollte gezeigt werden, ob sich Solute in ihren die Leitfähigkeiten beeinflussen können, was von einigen Ca^{2+} - und K^{+} -Kanälen bekannt ist.

In dem isoosmotischen System (0,6 M Saccharose + 0,6 M Glycerol/Harnstoff-Verhältnis von 1:0, 2:1, 1:2 oder 0:1) war die gemischte Leitfähigkeit unverändert geblieben. Glycerol und Harnstoff wurden in allen Verhältnissen mit der gleichen Ratenkonstante von $0,11 \pm 0,017 \text{ s}^{-1}$ transportiert (Abb. 4.26 und Tab. 4.10).

Erst in dem hyperosmotischen Testsystem (1,2 M Saccharose + 0,6 M Glycerol/Harnstoff-Verhältnis von 1:0, 2:1, 1:2 oder 0:1) konnte ein Unterschied in den Leitfähigkeiten beobachtet werden. Der anfängliche osmotische Gradient von 300 mOsm Saccharose führte zu Wassertransport aus den Protoplasten, wodurch sich das Volumen verkleinert hat und die Lichtstreuung zunahm. Gleichzeitig setzte sich ein chemischer Glycerol/Harnstoff-Gradient von 300 mOsm. Die Solute wurden in die Protoplasten transportiert und sie zogen

5. Diskussion

Wasser mit sich, wodurch sich das Volumen wieder zunahm und die Lichtstreuung abnahm. Das heißt, der chemisch betriebene Soluttransport kompensierte den osmotisch betriebenen Wasseraustritt aus den Protoplasten. Da Glycerol schneller in die Protoplasten transportiert wurde (Abb. 4.27) war die gesamte Amplitude am kleinsten. Mit steigendem Anteil an dem schlechter transportierbaren Harnstoff nahm die Amplitude zu und die Ratenkonstante ab.

Eine langsamere Leitfähigkeit einer Glycerol/Harnstoff-Mischung als die reinen Lösungen liegt unter den herrschenden Testbedingungen nicht vor. Das Experiment zeigt, dass eine bessere Leitfähigkeit für Glycerol als für Harnstoff.

5.2.7 Zusammenfassung I

In dieser Arbeit konnte die *stopped flow* Methode verbessert werden. Mit der Saccharose als osmotisch aktiver Substanz kann die Funktion weiterer Aquaporine und Aquaglyceroporine zuverlässig untersucht werden. Die Diskussion um die umstrittene Wasserleitfähigkeit von PfAQP konnte geklärt werden. PfAQP leitet eindeutig Wasser. Auch die Glycerolleitfähigkeit konnte charakterisiert werden. Somit ist PfAQP ein Aquaglyceroporin, welches für Wasser und Glycerol gut permeabel ist. Die fehlende Wasserleitfähigkeit und die Glycerolleitfähigkeit von EcGlpF wurden in dem Protoplastensystem bestätigt. Das Phänomen der Molenbruch-Anomalie trifft für Aquaporine in Hefeprotoplasten unter den Versuchsbedingungen nicht zu. Dies bedarf aber weiterer Untersuchungen.

5. Diskussion

5.3 Messung der Ammoniakleitfähigkeit

5.3.1 Etablierung der *stopped flow* Methode

Einige Aquaglyceroporine können neben Wasser auch Ammoniak leiten. Die meisten Untersuchungen der Ammoniakleitfähigkeit von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen wurden auf festen Medien oder in Flüssigkulturen durchgeführt. Genauso wie Messung der Glyceroleitfähigkeit durch PfAQP mit der *stopped flow* Methode (4.3.4) wurde versucht die Ammoniakleitfähigkeit auf Grund eines chemischen Gradienten von 300 mOsm in Saccharose-Puffer durchzuführen. Dies war auch nicht möglich; denn auf Grund der hohen Lipophilie kann Ammoniak sehr schnell durch Zellmembranen diffundieren. Mit der *stopped flow* Apparatur können nicht nur Änderungen der Lichtstreuung verfolgt werden, sondern auch Fluoreszenzänderungen. Deswegen wurde diese Methode im Arbeitskreis etabliert und damit die Leitfähigkeiten von PfAQP und hAQP8 gemessen.

Im Gegensatz zu der Wasser- und Glycerolmessung wurden bei der Ammoniakmessung intakte Hefezellen eingesetzt. Falls sich das Volumen der Protoplasten ändern sollte, dann bleibt das in geringem Rahmen, weil die Zellwand dafür zu rigide ist.

Bei Einstrom des Ammoniaks in den mit FDA beladenen Zellen wird das Cytosol alkalisiert. Dadurch ändert sich das Fluorophor von FDA und führt zur Steigerung der Fluoreszenz, die registriert wird.

Durch die Versuche 4.4.1.1 bis 4.4.1.5 konnte die Methode etabliert werden. Im Gegensatz zu Hefeprotoplasten, die eine Woche lang aufbewahrt werden können, konnten die beladenen Hefezellen nicht einen Tag inkubiert werden (Abb. 4.32). Der Inkubationspuffer war stärker gelb gefärbt als die Hefezellen. Es scheint, dass Fluorescein aus den Zellen aktiv über z. B. ABC-Transporter gepumpt wurde. Der Hersteller konnte auch zeigen, dass humane Lymphoidzellen innerhalb von zwei Stunden ca. 90 % des Farbstoffs verlieren. Trotzdem war Fluoresceindiacetat der empfohlene Farbstoff zur Beladung von Hefezellen und zur Messung der Ammoniakleitfähigkeit.

Durch Änderung der Messtemperatur wurde ein Optimum bei 10 °C gefunden. Bei dieser Temperatur sind Diffusionsvorgänge und die Membranfluidität minimiert. Außerdem ist der Transport bei niedrigen Temperaturen langsamer, so dass die Kurve geringes Rauschen und besseren Verlauf hatte (Abb. 4.33). Das Messvolumen spielt auch eine Rolle. Je größer das Volumen ist, um stärker war das Rauschen. Mit 502 µl konnte die Ratenkonstante nicht bestimmt werden. Erst durch Messung bei 202 µl konnte eine auswertbare Kurve registriert werden. Das liegt daran, dass sich die Hefezellen schnell absetzen und dabei Agglomerate bilden können. Deswegen musste die Hefesuspension ständig aus der Spritze entfernt, resuspendiert und wieder in die Spritze gezogen werden. Um dieses Problem zu umgehen kann die Viskosität des Inkubations- und Testpuffers durch Saccharose erhöht werden.

5. Diskussion

Eine entscheidende Rolle spielt der pH-Wert. Ammoniak ist eine Base mit einem pK_s -Wert von 9,21. Änderung des pH-Wertes der Puffer um eine Einheit führt zu Verschiebung des Ammoniak/Ammonium-Gleichgewichtes um den Faktor 10.

Die Messung der Ammoniakleitfähigkeit wurde bei pH 7 (Daten nicht gezeigt) und bei pH 8 durchgeführt. Bei pH 7 und 50 mM NH_4Cl herrschte im Medium eine NH_3 -Konzentration von 0,31 mM. Diese Konzentration war nicht genug, um eine ausreichend detektierbare Fluoreszenzänderung zu erzielen. Deswegen wurde die Messung mit pH 8 und 50 mM NH_4Cl (3,1 mM NH_3) durchgeführt.

5.3.2 Messung der Ammoniakleitfähigkeit von PfAQP und hAQP8

Mit der etablierten *stopped flow* Methode zur Messung der Fluoreszenzänderung wurde die Ammoniakleitfähigkeit von hAQP8 und PfAQP bestimmt.

Der Durchmesser der ar/R-Region von hAQP8 beträgt ca. 3,2 Å (kalkuliert basierend auf die Struktur des bovinen AQP1). Dieser Durchmesser entspricht demjenigen von Aquaglyceroporinen, die im Allgemeinen gute Glycerol- aber schlechte bis fehlende Wasserleitfähigkeit haben. hAQP8 ist eine interessante Ausnahme. Trotz der weiten ar/R-Region leitet hAQP8 kein Glycerol aber gut Wasser; es ist das Gegenstück der Aquaglyceroporine. Seine Wasserleitfähigkeit ist sogar mit der des orthodoxen AQP1 vergleichbar. Ein Kollege, (D. Krenc, Dissertation Dezember 2012), hat in seiner Arbeit Mutationen in die ar/R-Region von hAQP8 und rAQP1 eingeführt, um die Ammoniakleitfähigkeit der Wildtypen und Mutanten zu charakterisieren. Die Tests wurden auf festen und in flüssigen Kulturen durchgeführt. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Ammoniakleitfähigkeit von hAQP8 und PfAQP mit Hilfe der biophysikalischen *stopped flow* Methode bestimmt.

Die heterologe Produktion von hAQP8 erhöhte die Ammoniakleitfähigkeit von Hefezellen um das 3fache und mit PfAQP wurde eine 2fache Steigerung gemessen (4.4.2, Abb. 4.35 & Tab. 4.12). Betrachtet man das Verhältnis der ar/R-Region von hAQP8-Modell zu rAQP1 und das Verhältnis der Moleküloberfläche oder des Molekülvolumens von Ammoniak zu Wasser kommt man auf interessante Korrelationen:

$$\text{Verhältnis der ar/R-Region von hAQP8 zu hAQP1: } \frac{3,2 \text{ \AA}}{2,8 \text{ \AA}} = \underline{\underline{1,14}}$$

$$\text{Verhältnis der Moleküloberfläche von } NH_3 \text{ zu } H_2O: \frac{40,85 \text{ \AA}^2}{35,60 \text{ \AA}^2} = \underline{\underline{1,14}}$$

$$\text{Verhältnis des Molekülvolumens von } NH_3 \text{ zu } H_2O: \frac{22,86 \text{ \AA}^3}{19,51 \text{ \AA}^3} = \underline{\underline{1,17}}$$

(Die Werte wurden mit <http://www.chemicalize.org/> ermittelt)

5. Diskussion

Außerdem scheint es, dass die Aminosäuren in der ar/R-Region eine Rolle spielen. Basierend auf die Kristallstruktur von AQP1 (PDB 1J4N) besteht die ar/R-Region von AQP8 aus His74, Ile200, Gly208, Cys210 und Arg215. Histidin und Isoleucin in den diesen Positionen sind charakteristisch für tierische Aquaporine und pflanzliche *tonoplast intrinsic proteins*, deren Ammoniakleitfähigkeit nachgewiesen wurde.

Auf der anderen Seite ist eine Steigerung der Ammoniakpermeabilität von Zellen um das 3- oder 2fache nicht besonders großartig. Der Kollege, D. Krenc, hat in seiner Arbeit eine 18fach höhere Wasserleitfähigkeit von Hefeprotoplasten mit hAQP8 gegenüber der Negativkontrolle gemessen. Ob die Leitfähigkeit für Wasser, Glycerol oder Ammoniak gut oder schlecht ist, hängt nicht nur von der Größe und den Aminosäuren der ar/R-Region ab sondern von dem ganzen Aufbau des AQP-Kanals.

Da Menschen, Hefe und Bakterien spezielle Ammoniumtransporter haben (humane Rhesus-Glykoproteine, MEP und Amt) wird vermutet, dass die Ammoniakleitfähigkeit deren Aquaporine von untergeordneter Rolle ist. Trotzdem ist das von Vorteil. hAQP8 ist vor allem in dem Gehirn, der Leber und der Niere lokalisiert. In der Leber werden die Proteine und Aminosäuren abgebaut und dadurch große Mengen an Ammoniak gebildet. In der Niere findet die Harnkonzentrierung, wo auch große Mengen an Ammoniak und Harnstoff transportiert werden. Falls die menschlichen $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Transporter z. B. durch Mutationen nicht funktionell sind, dann könnten die Aquaporine einen Beitrag leisten.

Im Gegensatz dazu besitzt *P. falciparum* keine Ammoniumtransporter, so dass PfAQP trotz der geringen Leitfähigkeit der einzige Weg ist, um das ausfallende Ammoniak beim Befall der Erythrozyten auszuscheiden.

5.3.3 Zusammenfassung II

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit konnte die Messung von Fluoreszenzänderungen mit Hilfe der *stopped flow* Methode etabliert werden. Zur weiteren Verbesserung sollen Ammoniaktransporter eingesetzt werden.

Mit den bestimmten Parametern konnte die Ammoniakleitfähigkeit von hAQP8 und PfAQP nachgewiesen werden. Beide Aquaporine leiten, aber langsam, Ammoniak. Es scheint, die Rolle der humanen Aquaporine in dem Ammoniaktransport von untergeordneter Bedeutung zu sein, da Menschen die Rhesusglykoproteine dafür haben. Die Größe und Konstruktion der ar/R-Region haben einen Einfluss, sind aber nicht ausschlaggebend.

Da hAQP8 Wasser und Ammoniak aber kein Glycerol leitet, sollten die Familie der Aquaporine in 3 Gruppen geteilt: orthodoxe Aquaporine, Aquaglyceroporine und Aquaamminoporine.

5. Diskussion

5.4 H₂O₂-Leitfähigkeit

5.4.1 Wer leitet besser, Aquaporine oder Aquaglyceroporine?

Obwohl H₂O₂ ähnliche Eigenschaften zu Wasser hat, ist seine Leitfähigkeit durch Aquaporine und Aquaglyceroporine kaum untersucht. H₂O₂ und andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind für ihre schädigende Wirkung bekannt. Neuere Untersuchungen zeigen, dass H₂O₂ die Aktivität von vielen Enzymen regulieren kann. Beispiele dafür sind Isoenzyme der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, Glykolyse), Aconitase (ACO, Citrat- und Glyoxylatzyklus) und 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (OGDC, Citratzyklus). Diese und viele andere sind an der Energiegewinnung beteiligt und werden direkt oder indirekt durch H₂O₂ modifiziert (Halliwell *et al.*, 1999; Kristensen *et al.*, 2004 und Møller *et al.*, 2004).

H₂O₂ wird im menschlichen Körper vor allem in den Peroxisomen und in Pflanzen in den Glyoxysomen gebildet. Diese genannten Enzyme (GAPDH, ACO und OGDC) sind in der Leber tätig. Das heißt, H₂O₂ muss mindestens zwei Zellmembranen durchqueren, um vom Ort der Bildung zum Ort der Wirkung zu gelangen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen im Allgemeinen, dass die schnell wasserleitenden Aquaporine (rAQP1, hAQP8) eine bessere H₂O₂-Leitfähigkeit haben als die Aquaglyceroporine wie z. B. hAQP9 und PfAQP (Abb. 4.36 bis 4.44). Anscheinend sind der Aufbau und die Struktur der wasserleitenden Aquaporine für den Transport von H₂O₂ optimal. rAQP1 und hAQP8, die schnellsten H₂O₂-Transporter (Abb. 4.37 und 4.40), sind bekannt für ihre hohe Wasserleitfähigkeit (Abb. 4.17 und D. Krenc, Dissertation 2012). Das Aquaglyceroporin PfAQP leitet Wasser langsamer als rAQP1 (Abb. 4.17) aber besser als hAQP9. Dementsprechend verhielte sich auch seine H₂O₂-Leitfähigkeit. PfAQP war schlechter permeabel als rAQP, aber besser als hAQP9 (Abb. 4.37 und 4.39).

Bei dem H₂O₂-Transport scheint die ar/R-Region wieder eine Rolle zu spielen. In der Mutante hAQP8I200H wurde diese Region durch das Histidin enger. Dementsprechend sank auch die H₂O₂-Leitfähigkeit (Abb. 4.41 und 4.42). In den Mutanten hAQP1H180A und rAQP1H180A vergrößert der Austausch von Histidin gegen Alanin die ar/R-Region um den Faktor 4,3 (Beitz *et al.*, 2006). Mit 0,3 mM H₂O₂ wurde das Wachstum von Hefezellen mit rAQP1 um 11,7 % (Abb. 4.43) und das Wachstum von Hefezellen mit der Mutante rAQP1H180A um 41 %. Setzt man beide Werte in Verhältnis, so erhält man eine Erhöhung der Wachstumshemmung durch die Mutante um den Faktor 3,5.

5. Diskussion

Es bleibt noch die Frage offen, warum rAQP1 H_2O_2 schneller leiten kann als hAQP1. Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen beider Proteine wurden nur 18 Unterschiede festgestellt:

Tabelle 5.1: Unterschiede in den Aminosäuresequenzen von hAQP1 und rAQP1

Position	hAQP1	rAQP1	Lokalisation	
5	Phenylalanin	Isoleucin	N-Terminus	
21	Threonin	Methionin	Helix 1	liegt fast im Kanal
36	Lysin	Asparagin	Helix 1	
39	Valin	Leucin	Schleife A	
40	Glycin	Glutamat	Schleife A	
41	Asparagin	Arginin	Schleife A	
45	Alanin	Leucin	Schleife A	
92	Phenylalanin	Leucin	Schleife B	
95	Leucin	Valin	Helix 3	
109	Threonin	Serin	Helix 3	liegt fast im Kanal
120	Threonin	Leucin	Schleife C	
121	Glycin	Glutamat	Schleife C	
131	Aspartat	Arginin	Schleife C	
202	Isoleucin	Leucin	Schleife E	
204	Histidin	Arginin	Schleife E	
220	Glycin	Serin	Helix 6	
238	Leucin	Phenylalanin	C-Terminus	
242	Valin	Methionin	C-Terminus	

Die meisten Positionen sind außerhalb des Kanals oder in den verbindenden Schleifen. Das dürfte die Funktion eines Aquaporins nicht in so einem starken Maße beeinflussen. Die Positionen 21 und 109 sind nah an dem Kanal. Threonin und Serin in Position 109 sind unpolare und ungeladene Aminosäuren mit ähnlicher Größe. Dadurch werden die Ladenverteilung und Polarität des AQP-Kanals nicht verändert. Methionin in Position 21 ist eine hydrophobe und unpolare Aminosäure. Das Schwefelatom ist durch den +I-Effekte ein schlechter H-Brückendonator bzw. -akzeptor.

Von daher kann die unterschiedliche H_2O_2 -Leitfähigkeit nicht auf Grund struktureller Unterschiede in den beiden Proteinen erklärt werden. Deswegen wurde mit den gleichen Kulturen, die für die Messung der H_2O_2 -Leitfähigkeit eingesetzt wurden (Abb. 4.42, 4.43 und 4.44), die Wasserleitfähigkeit gemessen und eine *Western Blot* Analyse durchgeführt. An Hand der Wasserkurven sieht man auch eine höhere Wasserleitfähigkeit von rAQP1 gegenüber hAQP1, aber im *Western Blot* sieht man eine zwei- bis dreifach höhere Intensität für rAQP1 als für hAQP1. Von daher wird die geringere H_2O - und H_2O_2 -Leitfähigkeit auf eine schwächere heterologe Produktion zurückgeführt wird, denn je mehr

5. Diskussion

Aquaporine in einer Zelle vorhanden sind, umso schneller kann Wasser, H_2O_2 , Glycerol ...etc. transportiert werden.

5.4.2 Fazit III

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die H_2O_2 -Leitfähigkeit von verschiedenen Aquaporinen und Aquaglyceroporinen verglichen. Die schnell wasserleitenden Aquaporine sind in der Lage, ebenfalls H_2O_2 schneller zu transportieren als diejenigen, die eine größere ar/R-Region haben. Trotzdem scheint diese Region eine Rolle zu spielen, ist aber nicht ausschlaggebend, ähnlich wie bei der Ammoniakleitfähigkeit.

Hefezellen als Testorganismus haben sich immer bewährt. Da aber hAQP1 schwächer produziert wird, sollte vielleicht ein anderes System gewählt werden wie z. B. Oozytensystem oder die zellfreie Proteinsynthese.

6. Ausblick

Nachdem die *stopped flow* Methode für die Messung der Wasserleitfähigkeit optimiert wurde, wäre es interessant andere Aquaglyceroporine (hAQP3, hAQP9 oder BccGlpF) zu testen, um die Problematik ihrer geringen Wasserpermeabilität zu klären.

Unabhängig vom eingesetzten Polyol leitet EcGlpF kein Wasser, obwohl der Kanal dem von PfAQP sehr ähnelt. Es wäre sinnvoll EcGlpF-Mutanten zu generieren, so dass der PfAQP-Kanal imitiert wird. Dadurch können Funktions-Struktur-Beziehungen sehr gut studiert werden.

Im Hinblick auf die Messung der Ammoniakleitfähigkeit mittels Fluoreszenzänderung sollte die Methode weiter verfolgt werden. Es sollten auch Ammoniaktransporter eingesetzt werden, um bessere und stärkere Signale zu erhalten und dadurch eventuell weitere Verbesserungen zu erzielen. Ein Ammoniaktransporter (RhCG) wurde in das Plasmid pRS426 kloniert und steht als *glycerol stock* in *E. coli*- und *S. cerevisiae*-Zellen zur Verfügung (siehe *glycerol stock* Liste im Anhang). Um die Messzeiten zu verkürzen und den Aufwand gering zu halten, kann die Viskosität der eingesetzten Puffer durch Zusatz von Saccharose erhöht wird, so dass das störende Absetzen der Hefezellen während der Messung verhindert wird.

Die Ammoniakleitfähigkeit von Aqua-(glycero)-porinen ist ein wichtiges Thema. Viele pflanzliche Aquaporine leiten Ammoniak. Ein Vergleich der Struktur von pflanzlichen mit den menschlichen Aquaporinen und die Generierung von Mutanten wären auch in diesem Zusammenhang sinnvoll. Einige Fragen bleiben allerdings offen:

Warum leiten die Aquaporine Ammoniak überhaupt? Werden ammoniakleitende Aquaporine (z. B. hAQP8, oder TIP2;2) in *knock out* Stämmen stärker produziert? Können Aquaporine die Ammoniaktransporter ersetzen?

Die H₂O₂-Leitfähigkeit von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen ist ein neues Gebiet. Bislang wurden wenige Aqua-(glycero)-porine auf die H₂O₂-Permeabilität getestet, um eine sichere Aussage über die beiden AQP-Gruppen zu treffen.

Es wäre sehr sinnvoll und hilfreich, die *stopped flow* Methode zur Messung des H₂O₂-Transports zu optimieren. Die Durchführung wäre analog zur Ammoniakmessung (3.3.3.3) mit dem Unterschied, dass bei der H₂O₂-Messung nicht das pH-sensitive Fluoresceindiacetat, sondern der oxidationsempfindliche 5-(und-6)-chloromethyl-2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein-diacetate-acetyl-ester (CM-H2DCFDA, Molecular Probes®) eingesetzt wird. Der Farbstoff wurde erworben und bei -20 °C gelagert. Aus Zeitgründen konnte leider keine Versuche durchgeführt werden.

7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit behandelte drei Themen:

- 1) Klärung der umstrittenen Wasserleitfähigkeit von PfAQP,
- 2) Ammoniakleitfähigkeit von Aquaglyceroporinen am Beispiel von hAQP8 und PfAQP und
- 3) H₂O₂-Permeabilität von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen.

Durch den Einsatz verschiedener Polyole (Saccharose, Sorbitol, PEG300 und Glycerol) konnte die Wasserleitfähigkeit von PfAQP und EcGlpF geklärt werden. EcGlpF, wie viele Aquaglyceroporine, kann Glycerol aber praktisch kein Wasser transportieren. Die Wasserleitfähigkeit von PfAQP ist von dem eingesetzten Polyol abhängig. In der großen cyclischen Saccharose kann PfAQP sowohl Wasser als auch Glycerol gut leiten. Dagegen hemmt Sorbitol den Wassertransport ($IC_{50} = 0,81 \text{ M}$) und erniedrigt die Glycerolpermeabilität um 80 %.

Der Hemmeffekt von Sorbitol beruht nicht auf das Eindringen und Verschließen des Kanals sondern auf die Interaktion mit dem Einmündungsbereich.

Glycerol wird durch PfAQP besser transportiert als Harnstoff, auch wenn beide Solute in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt sind. Somit trifft die Molenbruch-Anomalie für die Aquaporine unter den herrschenden Testbedingungen nicht zu.

Es konnte experimentell ein Protokoll zur Beladung von Hefezellen mit dem pH-sensitiven Fluoresceindiacetat (FDA) etabliert werden, mit dessen Hilfe die Ammoniakleitfähigkeit von Aquaporinen und Aquaglyceroporinen gemessen werden kann.

Damit wurde die Ammoniakpermeabilität von hAQP8 und PfAQP gemessen. Beide Aquaporine erhöhten die Ammoniakpermeabilität um das drei- bzw. zweifache gegenüber den Kontrollzellen.

Im letzten Teil wurde die H₂O₂-Leitfähigkeit beider AQP-Subfamilien gegenübergestellt. Die schnell wasserleitenden Isoformen (hAQP1, rAQP1 und hAQP8) sind in der Lage H₂O₂ schneller zu transportieren als die glycerolleitenden hAQP9 und PfAQP.

Die Mutante rAQP1 H180A besitzt eine 4mal größere ar/R-Region als der Wildtyp. Um den gleichen Faktor erhöhte sich die H₂O₂-Leitfähigkeit dieser Mutante. Im Gegensatz dazu verringerte sich die H₂O₂-Leitfähigkeit von Mutanten, in denen die ar/R-Region verkleinert wurde wie z. B. hAQP8 I200H und rAQP1 H180F.

8. Summary

This present work deals with three topics:

- 1) Clarification of the controversial water conductivity of PfAQP exemplifies the aquaglyceroporins,
- 2) Ammonia conductivity of aquaglyceroporins on the example of hAQP8 and PfAQP and
- 3) H₂O₂ permeability of aquaporins and aquaglyceroporins.

Through the use of different polyols (sucrose, sorbitol, glycerol and PEG300), the water conductivity of PfAQP EcGlpF was clarified. EcGlpF, like many aquaglyceroporins, could transport glycerol but no water. The water permeability of PfAQP is dependent on the used polyol. In the large cyclic sucrose, PfAQP could transport both water and glycerol. However, sorbitol inhibits the water transport (IC₅₀ = 0.81 M) and reduced the glycerol permeability by 80 %.

The inhibitory effect of sorbitol is not based on the penetration and closing of the channel but on the interaction with the channel vestibule.

Glycerol is transported through PfAQP better than urea, even when both solutes are mixed in different ratios. Thus, the mole fraction anomaly does not apply for aquaporins under the prevailing test conditions.

A protocol for loading of yeast cells with the pH-sensitive fluorescein diacetate (FDA) was established to determine the ammonia and conductivity.

hAQP8 and PfAQP could increase the ammonia permeability about 2 to 3 times compared to control cells.

In the last part of this work, H₂O₂ conductivity of both AQP subfamilies was compared. The fast water conducting isoforms (hAQP1, rAQP1 and hAQP8) could transport H₂O₂ faster than the others such as hAQP9 and PfAQP.

The mutant rAQP1 H180A has a 4 times larger ar/R region than the wild type. By the same factor, the H₂O₂ conductance of this mutant was increased. In contrast, mutants with a smaller ar/R region such as hAQP8 I200H and rAQP1 H180F showed a slower H₂O₂ permeability.

9. Literaturverzeichnis

Gorelick, Daniel A.; Praetorius, Jeppe; Tsunenari, Takashi; Nielsen, Søren; Agre, Peter (2006). In: BMC Biochem 7 (1), S. 14.

Agre, P. (2006): The Aquaporin Water Channels. In: Proceedings of the American Thoracic Society 3 (1), S. 5–13.

Ai, Hui-wang; Henderson, J. Nathan; Remington, S. James; Campbell, Robert E. (2006): Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of Clavularia cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging. In: Biochem. J. 400 (3), S. 531.

Alekseeva, I. G.; Lapina, G. P.; Tulovskaia, Z. D.; Izmaïlova, V. N. (1975): Structure formation in interphase adsorption layers of lysozyme at liquid boundaries. In: Biofizika 20 (4), S. 566–569.

Anai, M.; Mihara, T.; Yamanaka, M.; Shibata, T.; Takagi, Y. (1975): A nucleoside triphosphate-dependent deoxyribonuclease from *Bacillus laterosporus*. Purification and characterization of the enzyme. In: J. Biochem. 78 (1), S. 105–114.

Anderson, T. R.; Slotkin, T. A. (1975): Maturation of the adrenal medulla--IV. Effects of morphine. In: Biochem. Pharmacol. 24 (16), S. 1469–1474.

Antonovski, L.; Ljatkova, K.; Sukarov, L. L.; Brenner, W. E.; Edelman, D. A.; Bernard, R. P. (1975): A comparative study of metal and plastic (Karman) cannulae for first trimester abortion by suction curettage. In: Int J Gynaecol Obstet 13 (1), S. 33–38.

Aponte-Santamaría, Camilo; Hub, Jochen S.; Groot, Bert L. de (2010): Dynamics and energetics of solute permeation through the *Plasmodium falciparum* aquaglyceroporin. In: Phys. Chem. Chem. Phys. 12 (35), S. 10246.

Aponte-Santamaría, Camilo; Hub, Jochen S.; Groot, Bert L. de (2010): Dynamics and energetics of solute permeation through the *Plasmodium falciparum* aquaglyceroporin. In: Phys. Chem. Chem. Phys. 12 (35), S. 10246.

9. Literaturverzeichnis

Arifin, Aimi Aishah; Don, Mashitah Mat; Uzir, Mohamad Hekarl (2011): The feasibility of growing cells of *Saccharomyces cerevisiae* for citronellol production in a continuous-closed-gas-loop bioreactor (CCGLB). In: *Bioresource Technology* 102 (19), S. 9318–9320.

Arimura, H. (1975): Correlation between molecular size and interferon-inducing activity of poly I:C. In: *Acta Virol.* 19 (6), S. 457–466.

Aroca, R. (2005): The Role of Aquaporins and Membrane Damage in Chilling and Hydrogen Peroxide Induced Changes in the Hydraulic Conductance of Maize Roots. In: *PLANT PHYSIOLOGY* 137 (1), S. 341–353.

Arosio, Daniele; Ricci, Fernanda; Marchetti, Laura; Gualdani, Roberta; Albertazzi, Lorenzo; Beltram, Fabio (2010): Simultaneous intracellular chloride and pH measurements using a GFP-based sensor. In: *Nat Meth* 7 (7), S. 516–518.

Arosio, Daniele; Ricci, Fernanda; Marchetti, Laura; Gualdani, Roberta; Albertazzi, Lorenzo; Beltram, Fabio (2010): Simultaneous intracellular chloride and pH measurements using a GFP-based sensor. In: *Nat Meth* 7 (7), S. 516–518.

Baghurst, P. A.; Nichol, L. W. (1975): The binding of organic phosphates to human methaemoglobin A. Perturbation of the polymerization of proteins by effectors. In: *Biochim. Biophys. Acta* 412 (1), S. 168–180.

Bahamontes-Rosa, N.; Robin, A.; Ambrosio, A.R; Messias-Reason, I.; Beitz, E.; Flitsch, S.L; Kun, J.F.J (2008): Monoquaternary ammonium derivatives inhibit growth of protozoan parasites. In: *Parasitology International* 57 (2), S. 132–137.

Bair, Warner B.; Cabello, Christopher M.; Uchida, Koji; Bause, Alexandra S.; Wondrak, Georg T. (2010): GLO1 overexpression in human malignant melanoma. In: *Melanoma Research* 20 (2), S. 85–96.

Baker, R. R.; Dowdall, M. J.; Whittaker, V. P. (1975): The involvement of lysophosphoglycerides in neurotransmitter release; the composition and turnover of phospholipids of synaptic vesicles of guinea-pig cerebral cortex and Torpedo electric organ and the effect of stimulation. In: *Brain Res.* 100 (3), S. 629–644.

Baker, N.; Glover, L.; Munday, J. C.; Aguinaga Andres, D.; Barrett, M. P.; Koning, H. P. de; Horn, D. (2012): Aquaglyceroporin 2 controls susceptibility to melarsoprol and pentamidine in African trypanosomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (27), S. 10996–11001.

9. Literaturverzeichnis

Balerna, M.; Fosset, M.; Chicheportiche, R.; Romey, G.; Lazdunski, M. (1975): Constitution and properties of axonal membranes of crustacean nerves. In: *Biochemistry* 14 (25), S. 5500–5511.

Barten, G.; Retzke, U.; Schwarz, R. (1976): Einfluss von niedermolekularem Dextran auf den Säure-Basenhaushalt von Mutter und Fetus. In: *Zentralbl Gynakol* 98 (1), S. 30–33.

Barth, R. F.; Singla, O.; Liu, C. (1975): Suppressor T cells and host resistance to tye 111 pneumococcus after treatment with antilymphocyte serum. In: *Infect. Immun.* 12 (6), S. 1307–1312.

Barthel, W.; Markwardt, F. (1975): Aggregation of blood platelets by adrenaline and its uptake. In: *Biochem. Pharmacol.* 24 (20), S. 1903–1904.

Bennett, T.; Malmfors, T. (1975): Characteristics of the noradrenergic innervation of the left atrium in the chick (*Gallus gallus domesticus*, L.). In: *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol.* 52 (1), S. 47–49.

Bertl, Adam; Kaldenhoff, Ralf (2007): Function of a separate NH₃-pore in Aquaporin TIP2;2 from wheat. In: *FEBS Letters* 581 (28), S. 5413–5417.

Bienert, G. P.; Moller, A. L. B.; Kristiansen, K. A.; Schulz, A.; Moller, I. M.; Schjoerring, J. K.; Jahn, T. P. (2006): Specific Aquaporins Facilitate the Diffusion of Hydrogen Peroxide across Membranes. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (2), S. 1183–1192.

Bienert, Gerd P.; Schjoerring, Jan K.; Jahn, Thomas P. (2006): Membrane transport of hydrogen peroxide. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758 (8), S. 994–1003.

Bizzarri, Ranieri; Arcangeli, Caterina; Arosio, Daniele; Ricci, Fernanda; Faraci, Paolo; Cardarelli, Francesco; Beltram, Fabio (2006): Development of a Novel GFP-based Ratiometric Excitation and Emission pH Indicator for Intracellular Studies. In: *Biophysical Journal* 90 (9), S. 3300–3314.

Blomberg, Anders (2011): Measuring growth rate in high-throughput growth phenotyping. In: *Current Opinion in Biotechnology* 22 (1), S. 94–102.

Bollmann, V.; Issel, E. P.; Halle, H.; Ballauf, D.; Füssel, C. (1976): Befunde der subpartalen Überwachung, der Zustand des Neugeborenen und die Bewertung der Kardiotokogrammbefunde. In: *Zentralbl Gynakol* 98 (1), S. 3–9.

9. Literaturverzeichnis

Bose, K. S.; Sarma, R. H. (1975): Delineation of the intimate details of the backbone conformation of pyridine nucleotide coenzymes in aqueous solution. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66 (4), S. 1173–1179.

Bowen, D. M.; Smith, C. B.; White, P.; Davison, A. N. (1976): Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. In: *Brain* 99 (3), S. 459–496.

Bowers, G. N.; McComb, R. B. (1975): Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. In: *Clin. Chem.* 21 (13), S. 1988–1995.

Breslin, P. W. (1975): The psychological reactions of children to burn traumata: a review. In: *IMJ III Med J* 148 (5), S. 519-24 contd.

Bresters, T. W.; Kok, A. de; Veeger, C. (1975): The pyruvate-dehydrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*. 2. Regulation of the activity. In: *Eur. J. Biochem.* 59 (2), S. 347–353.

Burykin, Anton; Warshel, Arieh (2004): On the origin of the electrostatic barrier for proton transport in aquaporin. In: *FEBS Letters* 570 (1-3), S. 41–46.

Butler, J.; Jayson, G. G.; Swallow, A. J. (1975): The reaction between the superoxide anion radical and cytochrome c. In: *Biochim. Biophys. Acta* 408 (3), S. 215–222.

Butzloff, Sabine; Groves, Matthew R.; Wrenger, Carsten; Müller, Ingrid B. (2012): Cytometric quantification of singlet oxygen in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. In: *Cytometry* 81 (8), S. 698–703.

Byerts, T. O. (1976): Symposium: the city: a viable environment for the elderly? Phase III: planning and delivery of health services. Background. In: *Gerontologist* 16 (1 Pt1), S. 11–12.

Caras, I.; Shapiro, B. (1975): Partial purification and properties of microsomal phosphatidate phosphohydrolase from rat liver. In: *Biochim. Biophys. Acta* 409 (2), S. 201–211.

Cassatt, J. C.; Marini, C. P.; Bender, J. W. (1975): The reversible reduction of horse metmyoglobin by the iron(II) complex of trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N,n-tetraacetate. In: *Biochemistry* 14 (25), S. 5470–5475.

Chaconas, George (2005): Hairpin telomeres and genome plasticity in *Borrelia*. All mixed up in the end. In: *Molecular Microbiology* 58 (3), S. 625–635.

9. Literaturverzeichnis

Chan, W. F.; Ong, H. C.; Wong, W. P. (1975): Acute bacterial myositis following septic abortion. An unusual complication. In: *Int J Gynaecol Obstet* 13 (1), S. 6–8.

Chegwidden, W. R.; Watts, D. C. (1975): Kinetic studies and effects of anions on creatine phosphokinase from skeletal muscle of rhesus monkey (*Macaca mulatta*). In: *Biochim. Biophys. Acta* 410 (1), S. 99–114.

Chimenti, F.; Vomero, S. (1975): Sintesi di isoindoline N-sostituite. In: *Farmaco Sci* 30 (11), S. 884–890.

Chow, P. H.; Chan, D. K. (1975): The cardiac cycle and the effects of neurohumors on myocardial contractility in the Asiatic eel *Anguilla japonica*, Timm. & Schle. In: *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol.* 52 (1), S. 41–45.

Chow, Y. W.; Pietranico, R.; Mukerji, A. (1975): Studies of oxygen binding energy to hemoglobin molecule. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66 (4), S. 1424–1431.

Clegg, J. S. (1976): Interrelationships between water and metabolism in *Artemia* cysts--III. Respiration. In: *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 53 (1), S. 89–93.

Conner, Matthew T.; Conner, Alex C.; Brown, James E. P.; Bill, Roslyn M. (2010): Membrane Trafficking of Aquaporin 1 Is Mediated by Protein Kinase C via Microtubules and Regulated by Tonicity. In: *Biochemistry* 49 (5), S. 821–823.

Coon, R. L.; Rattenborg, C. C.; Kampine, J. P. (1975): Local control of pulmonary resistance and lung compliance in the canine lung. In: *J Appl Physiol* 39 (4), S. 580–589.

Coscia, L.; Causa, P.; Giuliani, E.; Nunziata, A. (1975): Pharmacological properties of new neuroleptic compounds. In: *Arzneimittelforschung* 25 (9), S. 1436–1442.

Crandall, M.; Caulton, J. H. (1975): Induction of haploid glycoprotein mating factors in diploid yeasts. In: *Methods Cell Biol.* 12, S. 185–207.

Crow, T. J.; Deakin, J. F.; Longden, A. (1975): Proceedings: Do anti-psychotic drugs act by dopamine receptor blockade in the nucleus accumbens. In: *Br. J. Pharmacol.* 55 (2), S. 295P-296P.

Devine, J. E.; Toom, P. M. (1975): The enzyme kinetics of phospholipase A. A student experiment. In: *J Chem Educ* 52 (12), S. 816–817.

9. Literaturverzeichnis

Di Ferrante, N.; Leachman, R. D.; Angelini, P.; Donnelly, P. V.; Francis, G.; Almazan, A. et al. (1975): Ehlers-Danlos type V (X-linked form): a lysyl oxidase deficiency. In: Birth Defects Orig. Artic. Ser. 11 (6), S. 31–37.

D'iachenko, P. K.; Serdiuk, I. A. (1975): Otkliuchennyĭ zhelchnyi puzyr' u bol'nykh kholetsistitom. In: Vestn. Khir. Im. I. I. Grek. 115 (10), S. 32–37.

Dobbelstein, H. (1975): Immunmechanismen bei Urämie. In: Klin. Wochenschr. 53 (10), S. 461–466.

Dobretsov, G. E.; Kharitonov, I. G.; Mishiev, V. E.; Vladimirov, Iu. A. (1975): Sviaz' mezhdru fluorestsentsieĭ i krugovym dikhroizmom kompleksa fluorestsentnogo zonda 4-dimetilaminokhalkona s syvorotochnym al'buminom. In: Biofizika 20 (4), S. 581–585.

Dumarey, C.; Sket, D.; Joseph, D.; Boquet, P. (1975): Etude d'une phospholipase basique du venin de *Naja nigricollis*. In: C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat. 280 (13), S. 1633–1635.

Dupont, J.; Dupont, J. C.; Milon, H.; Froment, A. (1975): Mortalité spontanée et lésions vasculaires dans 3 souches de rats sélectionnés par leur niveau tensionnel. In: C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat. 280 (13), S. 1637–1640.

Dynowski, Marek; Schaaf, Gabriel; Loque, Dominique; Moran, Oscar; Ludewig, Uwe (2008): Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂. In: Biochem. J. 414 (1), S. 53.

El Halawani, M. E.; Waibel, P. E. (1975): The relative importance of monoamine oxidase and catechol-O-methyl transferase on the physiologic response to administered norepinephrine in the turkey. In: Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. 52 (1), S. 35–39.

Elgart, E. S.; Gusovsky, T.; Rosenberg, M. D. (1975): Preparation and characterization of an enzymatically active immobilized derivative of myosin. In: Biochim. Biophys. Acta 410 (1), S. 178–192.

Elnaghy, M. A.; Megalla, S. E. (1975): Gluconic acid production by *Penicillium puberulum*. In: Folia Microbiol. (Praha) 20 (6), S. 504–508.

Esser, H. (1975): Infusionsbehandlung beim Schock. In: Infusionsther Klin Ernähr 2 (6), S. 424–428.

9. Literaturverzeichnis

Esterbauer, H.; Sanders, E. B.; Schubert, J. (1975): Isolation and characterization of an unsubstituted 2,3-unsaturated sugar, trans-2,3-dideoxy-D-glycero-pent-2-ene, produced by thermal dehydration of 2-deoxy-D-erythro-pentose. In: Carbohydr. Res. 44 (1), S. 126–132.

Fahnestock, S. R. (1975): Evidence of the involvement of a 50S ribosomal protein in several active sites. In: Biochemistry 14 (24), S. 5321–5327.

Fee, J. A.; Phillips, W. D. (1975): The behavior of holo- and apo-forms of bovine superoxide dismutase at low pH. In: Biochim. Biophys. Acta 412 (1), S. 26–38.

Frankle, R. T. (1976): Nutrition education in the medical school curriculum: a proposal for action: a curriculum design. In: Am. J. Clin. Nutr. 29 (1), S. 105–109.

Froese, A.; Schon, A. H. (1975): Kinetics of antibody–haptent reactions. In: Contemp Top Mol Immunol 4, S. 23–54.

Fry, M.; Ngaha, E. O.; Plummer, D. T. (1975): The protective effects of cephaloridine on rat kidney lysosomes in vitro. In: Biochem. Soc. Trans. 3 (5), S. 736–738.

Fu, D. (2000): Structure of a Glycerol-Conducting Channel and the Basis for Its Selectivity. In: Science 290 (5491), S. 481–486.

Fujimoto, M.; Mihara, S.; Okabayashi, T.; Sugase, T.; Tarui, S. (1975): Rapid radioimmunoassay for guanosine 3',5'-cyclic monophosphate using tritiated ligand. In: J. Biochem. 78 (1), S. 131–137.

Fukushima, T. (1975): [Monoamine oxidase (XXXVI). Characteristics of benzylamine oxidase in the dog serum]. In: Nippon Yakurigaku Zasshi 71 (5), S. 457–462.

Gibbs, D. (1976): Diseases of the alimentary system; Nausea and vomiting. In: Br Med J 2 (6050), S. 1489–1492.

Gietz, R. Daniel; Schiestl, Robert H. (2007): High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. In: Nat Protoc 2 (1), S. 31–34.

Gilbert, H. F.; O'Leary, M. H. (1975): Modification of arginine and lysine in proteins with 2,4-pentanedione. In: Biochemistry 14 (23), S. 5194–5199.

9. Literaturverzeichnis

Ginterová, A.; Janotková, O. (1975): A simple method of isolation and purification of cultures of wood-rotting fungi. In: *Folia Microbiol. (Praha)* 20 (6), S. 519–520.

Gmaj, P.; Hoppe, A.; Angielski, S.; Rogulski, J.; Metler, M. (1975): Effects of maleate on renal reabsorption of bicarbonate. In: *Curr Probl Clin Biochem* 4, S. 101–105.

Goeckermann, J. A.; Vigil, E. L. (1975): Peroxisome development in the metanephric kidney of mouse. In: *J. Histochem. Cytochem.* 23 (12), S. 957–973.

Gonen, Tamir; Walz, Thomas (2006): The structure of aquaporins. In: *Quart. Rev. Biophys.* 39 (04), S. 361.

Grundy, H. C.; Grundy, H. F. (1975): Proceedings: The mechanism of "adrenaline reversal" in the anaesthetized cat and rabbit. In: *Br. J. Pharmacol.* 55 (2), S. 282P–283P.

Guggenbichler, J. P.; Stickler, G. B. (1975): Alte und neue Erkenntnisse zu den Durchfallerkrankungen im Kindesalter II. Klinik und Therapie. In: *Infection* 3 (4), S. 189–201.

Gynn, R. W.; Pieklik, J. R. (1975): Dependence on dose of the acute effects of ethanol on liver metabolism in vivo. In: *J. Clin. Invest.* 56 (6), S. 1411–1419.

Hansen, M. (2001): A Single, Bi-functional Aquaglyceroporin in Blood-stage *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (7), S. 4874–4882.

Hansman, D. (1976): Penicillin-insensitive pneumococci. In: *Br Med J* 2 (6050), S. 1503–1504.

Hara-Chikuma, M.; Chikuma, S.; Sugiyama, Y.; Kabashima, K.; Verkman, A. S.; Inoue, S.; Miyachi, Y. (2012): Chemokine-dependent T cell migration requires aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide uptake. In: *Journal of Experimental Medicine* 209 (10), S. 1743–1752.

Hashido, Masanori; Ikeguchi, Mitsunori; Kidera, Akinori (2005): Comparative simulations of aquaporin family: AQP1, AQP2, AQP0 and GlpF. In: *FEBS Letters* 579 (25), S. 5549–5552.

Hattori, M.; Frazier, J.; Miles, H. T. (1975): Poly(8-aminoguanilyc acid): formation of ordered self-structures and interaction with poly(cytidylic acid). In: *Biochemistry* 14 (23), S. 5033–5045.

Havel, R. J. (1977): The origin and fate of chylomicrons and VLDL. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 82, S. 406–412.

9. Literaturverzeichnis

Haveman, J.; Lavorel, J. (1975): Identification of the 120 ms phase in the decay of delayed fluorescence in spinach chloroplasts and subchloroplast particles as the intrinsic back reaction. The dependence of the level of this phase on the thylakoids internal pH. In: *Biochim. Biophys. Acta* 408 (3), S. 269–38.

Hedfalk, Kristina; Pettersson, Nina; Öberg, Fredrik; Hohmann, Stefan; Gordon, Euan (2008): Production, characterization and crystallization of the *Plasmodium falciparum* aquaporin. In: *Protein Expression and Purification* 59 (1), S. 69–78.

Heijne, G. von (2007): The membrane protein universe: what's out there and why bother? In: *J Intern Med* 261 (6), S. 543–557.

Hendrickson, W. A.; Ward, K. B. (1975): Atomic models for the polypeptide backbones of myohemerythrin and hemerythrin. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66 (4), S. 1349–1356.

Hodgson, E. K.; Fridovich, I. (1975): The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. In: *Biochemistry* 14 (24), S. 5294–5299.

Hohmann, Stefan (2009): Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *FEBS Letters* 583 (24), S. 4025–4029.

Holm, Lars M.; Jahn, Thomas P.; Møller, Anders L. B.; Schjoerring, Jan K.; Ferri, Domenico; Klaerke, Dan A.; Zeuthen, Thomas (2005): NH₃ and NH₄⁺ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. In: *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 450 (6), S. 415–428.

Hooijmaijers, Cortwa; Rhee, Ji Ye; Kwak, Kyung Jin; Chung, Gap Chae; Horie, Tomoaki; Katsuhara, Maki; Kang, Hunseung (2012): Hydrogen peroxide permeability of plasma membrane aquaporins of *Arabidopsis thaliana*. In: *J Plant Res* 125 (1), S. 147–153.

Hultberg, B.; Lundblad, A.; Masson, P. K.; Ockerman, P. A. (1975): Specificity studies on alpha-mannosidases using oligosaccharides from mannosidosis urine as substrates. In: *Biochim. Biophys. Acta* 410 (1), S. 156–163.

Ikeda, M.; Andoo, A.; Shimono, M.; Takamatsu, N.; Taki, A.; Muta, K. et al. (2011): The NPC Motif of Aquaporin-11, Unlike the NPA Motif of Known Aquaporins, Is Essential for Full Expression of Molecular Function. In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (5), S. 3342–3350.

Imai, K.; Lehmann, H. (1975): The oxygen affinity of haemoglobin Tak, a variant with an elongated beta chain. In: *Biochim. Biophys. Acta* 412 (2), S. 288–294.

9. Literaturverzeichnis

Imre, K. (1975): Késve felismert idegentest kézen, illetve lábon. In: Magy Traumatol Orthop Helyreallito Seb 18 (4), S. 277–279.

Iriki, M.; Murata, S.; Nagai, M.; Tsuchiya, K. (1976): Effects of thermal stimulation to the spinal cord on heart rate in cyprinid fishes. In: Comp Biochem Physiol A Comp Physiol 53 (1), S. 61–63.

Isaac, O.; Thiemer, K. (1975): Biochemische Untersuchungen von Kamilleninhaltsstoffen. III. In-vitro-Versuche über die antipeptische Wirkung des (-)-alpha-Bisabolols. In: Arzneimittelforschung 25 (9), S. 1352–1354.

Isaacks, R. E.; Harkness, D. R.; Froeman, G. A.; Sussman, S. A. (1976): Studies on avian erythrocyte metabolism--I. Procedure for separation and quantitation of the major phosphorylated metabolic intermediates by anion exchange chromatography. In: Comp Biochem Physiol A Comp Physiol 53 (1), S. 95–99.

Itoh, Tomohiro; Rai, Tatemitsu; Kuwahara, Michio; Ko, Shigeru B.H; Uchida, Shinichi; Sasaki, Sei; Ishibashi, Kenichi (2005): Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. In: Biochemical and Biophysical Research Communications 330 (3), S. 832–838.

Iusupova, N. Ia (1975): Kliniko-funktsional'nye osobennosti dekompenirovannogo mitral'nogo poroka serdtsa v usloviiakh vysokogor'ia. In: Zdravookhr Kirg (2), S. 6–11.

Jaton, J. C.; Huser, H.; Blatt, Y.; Pecht, I. (1975): Circular dichroism and fluorescence studies of homogeneous antibodies to type III pneumococcal polysaccharide. In: Biochemistry 14 (24), S. 5308–5311.

Jaton, J. C.; Huser, H.; Braun, D. G.; Givol, D.; Pecht, I.; Schlessinger, J. (1975): Conformational changes induced in a homogeneous anti-type III pneumococcal antibody by oligosaccharides of increasing size. In: Biochemistry 14 (24), S. 5312–5315.

Jolly, R. D.; Thompson, K. G.; Winchester, B. G. (1975): Bovine mannosidosis--a model lysosomal storage disease. In: Birth Defects Orig. Artic. Ser. 11 (6), S. 273–278.

Kaizu, T.; Margolius, H. S. (1975): Studies on rat renal cortical cell kallikrein. I. Separation and measurement. In: Biochim. Biophys. Acta 411 (2), S. 305–315.

9. Literaturverzeichnis

Kalapos, Miklós Péter (2003): On the mammalian acetone metabolism: from chemistry to clinical implications. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1621 (2), S. 122–139.

Karavaeva, N. N.; Zakirov, M. Z.; Mukhiddinova, N. G. (1975): Chastichnaia ochistka i nekotorye svoïstva proteazy griba *Torula thermophila*. In: *Biokhimiia* 40 (5), S. 909–914.

Kiremidjian-Schumacher, L.; Stotzky, G. (1976): Influence of mono- and multivalent cations on the electrokinetic properties of normal human lymphoid and burkitt lymphoma cells. In: *Experientia* 32 (3), S. 312–314.

Kotyk, A.; Michaljanicová, D.; Veres, K.; Soukupová, V. (1975): Transport of 4-deoxy- and 6-deoxy-D-glucose in baker's yeast. In: *Folia Microbiol. (Praha)* 20 (6), S. 496–503.

Kunitake, E.; Ishinishi, N.; Kodama, Y. (1975): [Studies of the effects of aircraft noise causing mental fatigue during some intellectual performance (author's transl)]. In: *Nihon Eiseigaku Zasshi* 30 (3), S. 417–429.

Kurusu, M. (1975): [Impression on the 1975 General Meeting of the Japan Nursing Association. Need for more realistic attitude toward nursing]. In: *Hokenfu Zasshi* 31 (6), S. 342–343.

Ledbetter, M. L.; Hotchkiss, R. D. (1975): Recombination as a requirement for segregation of a partially diploid mutant of *Pneumococcus*. In: *Genetics* 80 (4), S. 679–694.

Lefkowitz, R. J. (1975): Identification of adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors with radiolabeled beta-adrenergic antagonists. In: *Biochem. Pharmacol.* 24 (18), S. 1651–1658.

Letic, S.; Szép, D.; Stojic, V.; Vukadinovic, S. (1975): Nyílt törések kezelésében szerzett tapasztalataink. In: *Magy Traumatol Orthop Helyreallito Seb* 18 (4), S. 272–276.

Li, Xiaofeng; Lei, Ting; Xia, Tao; Chen, Xiaodong; Feng, Shengqiu; Chen, Huaping et al. (2008): Molecular characterization, chromosomal and expression patterns of three aquaglyceroporins (AQP3, 7, 9) from pig. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 149 (3), S. 468–476.

Lick, J. R.; Unger, T. E. (1975): External validity of laboratory fear assessment: implications from two case studies. In: *J Consult Clin Psychol* 43 (6), S. 864–866.

9. Literaturverzeichnis

Lind, B.; Snyder, J.; Safar, P. (1975): Total brain ischaemia in dogs: cerebral physiological and metabolic changes after 15 minutes of circulatory arrest. In: *Resuscitation* 4 (2), S. 97–113.

Lipskaia, T. I.; Goloveshkina, V. G. (1975): Nekotorye svoïstva transportnoï sistemy kreatina i lokalizatsiia kreatinkinazy v mitokhondriakh skerltnykh myshts. In: *Biokhimiia* 40 (5), S. 942–950.

Liu, Zijuan; Carbrey, Jennifer M.; Agre, Peter; Rosen, Barry P. (2004): Arsenic trioxide uptake by human and rat aquaglyceroporins. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316 (4), S. 1178–1185.

Lurie, E.; Kalish, R. A.; Wexler, R.; Ansak, M. L. (1976): Symposium - the city: a viable environment for the elderly? Phase III: Planning and delivery of health services. On Lok Day Health Center; a case study. In: *Gerontologist* 16 (1 Pt1), S. 39–46.

Makar, A. B.; McMartin, K. E.; Palese, M.; Tephly, T. R. (1975): Formate assay in body fluids: application in methanol poisoning. In: *Biochem Med* 13 (2), S. 117–126.

Maneksha, S.; Harry, T. V. (1975): Lorazepam in sexual disorders. In: *Br J Clin Pract* 29 (7), S. 175–176.

Marriott, A. S.; Skingle, M.; Tyers, M. B. (1975): Proceedings: Evaluation of narcotic and narcotic antagonist analgesic drugs in the dog dental pulp stimulation test. In: *Br. J. Pharmacol.* 55 (2), S. 314P.

Martin, J. K.; Luthra, M. G.; Wells, M. A.; Watts, R. P.; Hanahan, D. J. (1975): Phospholipase A2 as a probe of phospholipid distribution in erythrocyte membranes. Factors influencing the apparent specificity of the reaction. In: *Biochemistry* 14 (25), S. 5400–5408.

Masyuk, Anatoliy I.; LaRusso, Nicholas F. (2006): Aquaporins in the hepatobiliary system. In: *Hepatology* 43 (S1), S. S75.

Mathews, J. B. (1975): Planning for HIS. In: *Mod Healthc (Short Term Care)* 4 (6), S. 36–38.

Matos, L. (1976): Késedelmes elsődleges sebellátás. In: *Magy Traumatol Orthop Helyreallito Seb* 19 (1), S. 77–78.

Maurel, Christophe; Verdoucq, Lionel; Luu, Doan-Trung; Santoni, Véronique (2008): Plant Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. In: *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 (1), S. 595–624.

9. Literaturverzeichnis

Mavric, Elvira; Wittmann, Silvia; Barth, Gerold; Henle, Thomas (2008): Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. In: *Mol. Nutr. Food Res.* 52 (4), S. 483–489.

McPhie, P. (1975): The origin of the alkaline inactivation of pepsinogen. In: *Biochemistry* 14 (24), S. 5253–5256.

Merin, R. G. (1975): The role of biotransformation in the action of drugs affecting the sympathetic nervous system. In: *Int Anesthesiol Clin* 13 (4), S. 117–125.

Michalopoulos, G.; Pitot, H. C. (1975): Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations. In: *Exp. Cell Res.* 94 (1), S. 70–78.

Michelson, E. H.; DuBois, L. (1975): Intraspecific variations in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata*, a snail host of *Schistosoma mansoni*. In: *Malacologia* 15 (1), S. 105–111.

Mier, P. D.; van den Hurk, J. J. (1975): Lysosomal hydrolases of the epidermis. I. Glycosidases. In: *Br. J. Dermatol.* 93 (1), S. 1–10.

Miyazawa, S.; Sakurai, T.; Shindo, Y.; Imura, M.; Hashimoto, T. (1975): The effect of tryptophan administration on fatty acid synthesis in the livers of rats under various nutritional conditions. In: *J. Biochem.* 78 (1), S. 139–147.

Mockrin, S. C.; Byers, L. D.; Koshland, D. E. (1975): Subunit interactions in yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In: *Biochemistry* 14 (25), S. 5428–5437.

Moroi, K.; Sato, T. (1975): Comparison between procaine and isocarboxamid metabolism in vitro by a liver microsomal amidase-esterase. In: *Biochem. Pharmacol.* 24 (16), S. 1517–1521.

Mubarakshina, M. M.; Ivanov, B. N.; Naydov, I. A.; Hillier, W.; Badger, M. R.; Krieger-Liszkay, A. (2010): Production and diffusion of chloroplastic H₂O₂ and its implication to signalling. In: *Journal of Experimental Botany* 61 (13), S. 3577–3587.

Musil, M. (1975): Serological differences between some isolates of bean yellow mosaic virus. In: *Acta Virol.* 19 (6), S. 473–480.

Neumcke, B. (1975): The action of uncouplers on lipid bilayer membranes. In: *Membranes* 3, S. 215–253.

9. Literaturverzeichnis

Newby, Zachary E. R.; O'Connell III, Joseph; Robles-Colmenares, Yaneth; Khademi, Shahram; Miercke, Larry J.; Stroud, Robert M. (2008): Crystal structure of the aquaglyceroporin PfAQP from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. In: *Nat Struct Mol Biol* 15 (6), S. 619–625.

Ng, W. G.; Donnell, G. N.; Koch, R.; Bergren, W. R. (1975): Urinary alpha-L-fucosidase. In: *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 11 (6), S. 335–339.

Nilolaev, A. Ia; Sokolov, N. N.; Kozlov, E. A.; Kutsman, M. E. (1975): Vydelenie i svoistva gomogennogo preparata L-asparaginazy iz *Pseudomonas fluorescens* AG. In: *Biokhimiia* 40 (5), S. 984–989.

Ohta, E.; Itoh, T.; Nemoto, T.; Kumagai, J.; Ko, S. B. H.; ISHIBASHI, K. et al. (2009): Pancreas-specific aquaporin 12 null mice showed increased susceptibility to caerulein-induced acute pancreatitis. In: *AJP: Cell Physiology* 297 (6), S. C1368.

Okada, S.; Misaka, T.; Tanaka, Y.; Matsumoto, I.; ISHIBASHI, K.; SASAKI, S.; Abe, K. (2008): Aquaporin-11 knockout mice and polycystic kidney disease animals share a common mechanism of cyst formation. In: *The FASEB Journal* 22 (10), S. 3672–3684.

Okamura, H.; Okazaki, T.; Nakajima, A. (1975): [In vitro studies on human ovarian contractility (author's transl)]. In: *Nihon Funin Gakkai Zasshi* 20 (4), S. 38–43.

Oliva, R.; Calamita, G.; Thornton, J. M.; Pellegrini-Calace, M. (2010): Electrostatics of aquaporin and aquaglyceroporin channels correlates with their transport selectivity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (9), S. 4135–4140.

Ono, K. (1979): Ultrastructural localization of acid phosphatase activity in the small intestinal absorptive cells of adult rats. In: *Histochemistry* 62 (2), S. 113–124.

Orcutt, T. J.; Pruitt, B. A. (1976): Chemical injuries of the upper extremity. In: *Major Probl Clin Surg* 19, S. 84–95.

Orskov, E. R.; Fraser, C. (1975): The effects of processing of barley-based supplements on rumen pH, rate of digestion of voluntary intake of dried grass in sheep. In: *Br. J. Nutr.* 34 (3), S. 493–500.

Pavlovic-Djuranovic, Slavica; Kun, Jürgen F.J; Schultz, Joachim E.; Beitz, Eric (2006): Dihydroxyacetone and methylglyoxal as permeants of the *Plasmodium* aquaglyceroporin

9. Literaturverzeichnis

inhibit parasite proliferation. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758 (8), S. 1012–1017.

Pavlovic-Djuranovic, Slavica; Schultz, Joachim E.; Beitz, Eric (2003): A single aquaporin gene encodes a water/glycerol/urea facilitator in *Toxoplasma gondii* with similarity to plant tonoplast intrinsic proteins. In: *FEBS Letters* 555 (3), S. 500–504.

Pettersson, Nina; Hagström, Johan; Bill, Roslyn M.; Hohmann, Stefan (2006): Expression of heterologous aquaporins for functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Curr Genet* 50 (4), S. 247–255.

Pfister, M.; Schaub, M. C.; Watterson, J. G.; Knecht, M.; Waser, P. G. (1975): Radioactive labeling and location of specific thiol groups in myosin from fast, slow and cardiac muscles. In: *Biochim. Biophys. Acta* 410 (1), S. 193–209.

Pham, Tuan Anh; Kawai, Shigeyuki; Murata, Kousaku (2011): Visualization of the synergistic effect of lithium acetate and single-stranded carrier DNA on *Saccharomyces cerevisiae* transformation. In: *Curr Genet* 57 (4), S. 233–239.

Qiu, Wei; Dong, Aiping; Pizarro, Juan C.; Botchkarsev, Alexei; Min, Jinrong; Wernimont, Amy K. et al. (2012): Crystal structures from the Plasmodium peroxiredoxins: new insights into oligomerization and product binding. In: *BMC Struct Biol* 12 (1), S. 2.

Ramakrishna, S.; Adiga, P. R. (1975): Arginine decarboxylase from *Lathyrus sativus* seedlings. Purification and properties. In: *Eur. J. Biochem.* 59 (2), S. 377–386.

Ravin, A. W.; Chakrabarti, T. (1975): Genetic hybridization at the unlinked thy and str loci of *Streptococcus*. In: *Genetics* 81 (2), S. 223–241.

Roberts, G. C. (1975): The binding of substrates and inhibitors to dihydrofolate reductase. In: *Biochem. Soc. Trans.* 3 (5), S. 630–631.

Robin, Aélig; Brown, Fraser; Bahamontes-Rosa, Noemí; Wu, Binghua; Beitz, Eric; Kun, Jürgen F. J.; Flitsch, Sabine L. (2007): Microwave-Assisted Ring Opening of Epoxides: A General Route to the Synthesis of 1-Aminopropan-2-ols with Anti Malaria Parasite Activities. In: *J. Med. Chem.* 50 (17), S. 4243–4249.

Roskoski, R.; Lim, C. T.; Roskoski, L. M. (1975): Human brain and placental choline acetyltransferase: purification and properties. In: *Biochemistry* 14 (23), S. 5105–5110.

9. Literaturverzeichnis

Scheller, F.; Jänchen, M.; Lampe, J.; Prümke, H. J.; Blanck, J.; Palecek, E. (1975): Studies on electron transfer between mercury electrode and hemoprotein. In: *Biochim. Biophys. Acta* 412 (1), S. 157–167.

Schmid, V. (1975): Cell transformation in isolated striated muscle of hydromedusae independent of DNA synthesis. In: *Exp. Cell Res.* 94 (2), S. 401–408.

Schmoldt, A.; Benthe, H. F.; Haberland, G. (1975): Digitoxin metabolism by rat liver microsomes. In: *Biochem. Pharmacol.* 24 (17), S. 1639–1641.

Seber, J. F.; Toomey, T. P.; Powell, J. T.; Brew, K.; Awad, W. M. (1976): Proteolytic enzymes of the K-1 strain of *Streptomyces griseus* obtained from a commercial preparation (Pronase). Purification and characterization of the carboxypeptidase. In: *J. Biol. Chem.* 251 (1), S. 204–208.

Shapira, E.; Nadler, H. L. (1975): Problems associated with the determination of arylsulfatase A and B using nitrocatechol sulfate substrate. In: *Clin. Chim. Acta* 65 (1), S. 1–4.
Siegel, S. (1975): Evidence from rats that morphine tolerance is a learned response. In: *J Comp Physiol Psychol* 89 (5), S. 498–506.

Slichter, S. J.; Harker, L. A. (1976): Preparation and storage of platelet concentrates. In: *Transfusion* 16 (1), S. 8–12.

Sloane, N. H. (1975): alpha-Naphthoflavone activation of 6-hydroxymethylbenzo(alpha)pyrene synthetase. In: *Cancer Res.* 35 (12), S. 3731–3734.

Smith, R. N. (1975): High pressure liquid chromatography on cannabis. Identification of separated constituents. In: *J. Chromatogr.* 115 (1), S. 101–106.

Smith, R. J.; Bryant, R. G. (1975): Metal substitutions in carbonic anhydrase: a halide ion probe study. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66 (4), S. 1281–1286.

Snow, J. T.; Finley, J. W.; Friedman, M. (1975): A kinetic study of the hydrolysis of N-acetyl dehydroalanine methyl ester. In: *Int. J. Pept. Protein Res.* 7 (6), S. 461–466.

Song, Jie; Wu, Binghua; Beitz, Eric (2011): Functional and evolutionary implications of natural channel-enzyme fusion proteins. In: *BioMolecular Concepts* 2 (5).

Sorokin, N. N. (1975): Elementy not v rabote fel'dshera skoroï pomoshchi. In: *Feldsher Akush* 40 (10), S. 32–34.

9. Literaturverzeichnis

Soslau, G.; Nass, M. M. (1975): Stimulation of 2-deoxy-d-glucose transport in control and virus-transformed cells by ethidium bromide. In: *J. Cell. Physiol.* 86 (2 Pt 1), S. 269–280.

Stahlberg, Henning; Braun, Thomas; Groot, Bert de; Philippsen, Ansgar; Borgnia, Mario J.; Agre, Peter et al. (2000): The 6.9-Å Structure of GlpF: A Basis for Homology Modeling of the Glycerol Channel from *Escherichia coli*. In: *Journal of Structural Biology* 132 (2), S. 133–141.

Starke, K.; Borowski, E.; Taube, H. D.; Endo, T. (1977): Mechanism of action of antihypertensive agents. In: *Contrib Nephrol* 8, S. 151–161.

Storesund, A.; Helle, K. B. (1975): Practolol, caffeine and calcium in the regulation of mechanical activity of the cardiac ventricle in *Myxine glutinosa* (L.). In: *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol.* 52 (1), S. 17–22.

Sundararajan, N. R.; Whitney, R. M. (1975): Murexide for determination of free and protein-bound calcium in model systems. In: *J. Dairy Sci.* 58 (11), S. 1595–1608.

Suzuki, Y. (1975): [Inborn error of glycolipid metabolism]. In: *Horumon To Rinsho* 23 (9), S. 885–891.

Tamaoki, H.; Minato, S.; Takei, S.; Fujisawa, K. (1975): A clinical method for the determination of serum gamma-glutamyl transpeptidase. In: *Clin. Chim. Acta* 65 (1), S. 21–27.

Tchekneva, E. E.; Khuchua, Z.; Davis, L. S.; Kadkina, V.; Dunn, S. R.; Bachman, S. et al. (2008): Single Amino Acid Substitution in Aquaporin 11 Causes Renal Failure. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 19 (10), S. 1955–1964.

Tominaga, Y.; Tsujisaka, Y. (1975): Purification and some enzymatic properties of the chitosanase from *Bacillus R-4* which lyses *Rhizopus* cell walls. In: *Biochim. Biophys. Acta* 410 (1), S. 145–155.

Tucker, G. T. (1975): Plasma binding and disposition of local anesthetics. In: *Int Anesthesiol Clin* 13 (4), S. 33–59.

Turner, A. J.; Hick, P. E. (1975): Inhibition of aldehyde reductase by acidic metabolites of the biogenic amines. In: *Biochem. Pharmacol.* 24 (18), S. 1731–1733.

Uchibori, C. (1975): [Impression of the 1975 General Meeting of the Japan Nursing Association. Fulfilment and some disappointment]. In: *Hokenfu Zasshi* 31 (6), S. 334–336.

9. Literaturverzeichnis

- Uemura, T.; Sakaguchi, G.; Ito, T.; Okazawa, K.; Sakai, S. (1975): Experimental diarrhea in cynomolgus monkeys by oral administration with *Clostridium perfringens* type A viable cells or enterotoxin. In: *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 28 (3), S. 165–177.
- Uzcategui, N. L. (2004): Cloning, Heterologous Expression, and Characterization of Three Aquaglyceroporins from *Trypanosoma brucei*. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (41), S. 42669–42676.
- van Gorkom, H. J.; Pulles, M. P.; Wessels, J. S. (1975): Light-induced changes of absorbance and electron spin resonance in small photosystem II particles. In: *Biochim. Biophys. Acta* 408 (3), S. 331–339.
- Vilmos, B.; Ede, M.; Rezső, L. (1975): [Therapeutic principles and results in the management of open fractures of the tibial]. In: *Magy Traumatol Orthop Helyreallito Seb* 18 (4), S. 280–285.
- Volozhin, S. I. (1975): Kriptorkhizm. In: *Feldsher Akush* 40 (10), S. 23–26.
- Wallace, Ian S.; Shakesby, Ally J.; Hwang, Jin Ha; Choi, Won Gyu; Martínková, Natália; Douglas, Angela E.; Roberts, Daniel M. (2012): Acyrthosiphon pisum AQP2: A multifunctional insect aquaglyceroporin. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818 (3), S. 627–635.
- Wang, Yi; Schulten, Klaus; Tajkhorshid, Emad (2005): What Makes an Aquaporin a Glycerol Channel? A Comparative Study of AqpZ and GlpF. In: *Structure* 13 (8), S. 1107–1118.
- Watanabe, T.; Flavin, M. (1976): Nucleotide-metabolizing enzymes in *Chlamydomonas* flagella. In: *J. Biol. Chem.* 251 (1), S. 182–192.
- White, R. P.; Hagen, A.; Robertson, J. T. (1976): Experimental evaluation of the spasmogenicity of dopamine on the basilar artery. In: *J. Neurosurg.* 44 (1), S. 45–49.
- Wiesmann, U. N.; DiDonato, S.; Herschkowitz, N. N. (1975): Effect of chloroquine on cultured fibroblasts: release of lysosomal hydrolases and inhibition of their uptake. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66 (4), S. 1338–1343.
- Wipf, Daniel; Benjdia, Mariam; Rikirsch, Enno; Zimmermann, Sabine; Tegeder, Mechthild; Frommer, Wolf B. (2003): An expression cDNA library for suppression cloning in yeast mutants, complementation of a yeast *his4* mutant, and EST analysis from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum*. In: *Genome* 46 (2), S. 177–181.

9. Literaturverzeichnis

Wootton, J. C.; Taylor, J. G.; Jackson, A. A.; Chambers, G. K.; Fincham, J. R. (1975): The amino acid sequence of *Neurospora* NADP-specific glutamate dehydrogenase. The tryptic peptides. In: *Biochem. J.* 149 (3), S. 739–748.

Wu, Binghua; Altmann, Karin; Barzel, Ina; Krehan, Susanne; Beitz, Eric (2008): A yeast-based phenotypic screen for aquaporin inhibitors. In: *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 456 (4), S. 717–720.

Wu, B.; Beitz, E. (2007): Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (18), S. 2413–2421.

Wu, B.; Song, J.; Beitz, E. (2010): Novel Channel Enzyme Fusion Proteins Confer Arsenate Resistance. In: *Journal of Biological Chemistry* 285 (51), S. 40081–40087.

Wu, Binghua; Steinbronn, Christina; Alsterfjord, Magnus; Zeuthen, Thomas; Beitz, Eric (2009): Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel. In: *EMBO J* 28 (15), S. 2188–2194.

Wyrambik, D.; Grisebach, H. (1975): Purification and properties of isoenzymes of cinnamyl-alcohol dehydrogenase from soybean-cell-suspension cultures. In: *Eur. J. Biochem.* 59 (1), S. 9–15.

YAKATA, K.; HIROAKI, Y.; ISHIBASHI, K.; SOHARA, E.; SASAKI, S.; MITSUOKA, K.; FUJIYOSHI, Y. (2007): Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1768 (3), S. 688–693.

Yakata, Kaya; Tani, Kazutoshi; Fujiyoshi, Yoshinori (2011): Water permeability and characterization of aquaporin-11. In: *Journal of Structural Biology* 174 (2), S. 315–320.

Yang, B. (2000): Erythrocyte Water Permeability and Renal Function in Double Knockout Mice Lacking Aquaporin-1 and Aquaporin-3. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (1), S. 624–628.

Yeung, Ching-Hei (2010): Aquaporins in spermatozoa and testicular germ cells: identification and potential role. In: *Asian J Androl* 12 (4), S. 490–499.

Yeung, C. H.; Cooper, T. G. (2009): Aquaporin AQP11 in the testis: molecular identity and association with the processing of residual cytoplasm of elongated spermatids. In: *Reproduction* 139 (1), S. 209–216.

9. Literaturverzeichnis

Yu, R. K.; Lee, S. H. (1976): In vitro biosynthesis of sialosylgalactosylceramide (G7) by mouse brain microsomes. In: *J. Biol. Chem.* 251 (1), S. 198–203.

Yukutake, Yoshinori; Tsuji, Shoji; Hirano, Yoshinori; Adachi, Takeshi; Takahashi, Toshiyuki; Fujihara, Kazuo et al. (2008): Mercury chloride decreases the water permeability of aquaporin-4-reconstituted proteoliposomes. In: *Biology of the Cell* 100 (6), S. 355–363.

Zellner, P. R.; Taubert, I.; Wegener, K. (1975): Transplantation und Konservierung gegebepytisierter Haut bei Brandverletzten. In: *Chirurg* 46 (7), S. 319–322.

Zeuthen, Thomas; Wu, Binghua; Pavlovic-Djuranovic, Slavica; Holm, Lars M.; Uzcategui, Nestor L.; Duszenko, Michael et al. (2006): Ammonia permeability of the aquaglyceroporins from *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma brucei*. In: *Mol Microbiol* 61 (6), S. 1598–1608.

Zidi-Yahiaoui, N.; Callebaut, I.; Genetet, S.; van Kim, C.; Cartron, J.-P.; Colin, Y. et al. (2009): Functional analysis of human RhCG: comparison with *E. coli* ammonium transporter reveals similarities in the pore and differences in the vestibule. In: *AJP: Cell Physiology* 297 (3), S. C537.

Zidi-Yahiaoui, Nedjma; Mouro-Chanteloup, Isabelle; D'Ambrosio, Anne-Marie; Lopez, Claude; Gane, Pierre; Le Van Kim, Caroline et al. (2005): Human Rhesus B and Rhesus C glycoproteins: properties of facilitated ammonium transport in recombinant kidney cells. In: *Biochem. J.* 391 (1), S. 33.

Zidi-Yahiaoui, N.; Ripoche, P.; van Kim, C.; Gane, P.; D'Ambrosio, A.-M.; Cartron, J.-P et al. (2006): Ammonium transport properties of HEK293 cells expressing RhCG mutants: preliminary analysis of structure/function by site-directed mutagenesis. In: *Transfusion Clinique et Biologique* 13 (1-2), S. 128–131.

10. Anhang

10.1 Liste der glycerol stocks

Die folgenden Stämme *E. coli* (DH5 α) und *S. cerevisiae* (By4742 Δ fps1 und 310 Δ fps1) sind mit den aufgeführten Konstrukten transformiert und bei -80 °C aufbewahrt.

code	gene	plasmid	mutation
1	-	pRS426-HA	
2	hAQP3	pRS426-HA	
3	hAQP3	pRS426-HA	N83D
4	hAQP3	pRS426-HA	R218V
5	hAQP3	pRS426-HA	Y212A
6	hAQP3	pRS426-HA	N83D R218V
7	hAQP3	pRS426-HA	N83D Y212A
8	hAQP3	pRS426-HA	Y212A R218V
9	hAQP3	pRS426-HA	N83D Y212A R218V
10	hAQP8	pRS426-HA	
11	hAQP9	pRS426-HA	
12	hAQP9	pRS426-HA	N84D
13	hAQP9	pRS426-HA	R219V
14	hAQP9	pRS426-HA	N84D R219V
16	hAQP12	pRS426-HA	
17	TgAQP1	pRS426-HA	
18	TgAQP1	pRS426-HA	ND
19	TgAQP2a	HA-pRS426	
20	TgAQP2b	HA-pRS426-His	
21	EtAQP2	HA-pRS426	
22	EtAQP2a	HA-pRS426	
23	EtAQP2b	HA-pRS426	
24	Fps1	pRS426-HA	
25	-	pDR196-HA	
26	hAQP3	pDR196-HA	
27	hAQP9	pDR196-HA	
28	hAQP10	pDR196-HA	
29	hAQP12	pDR196-HA	
30	PfAQP	pDR196-HA	

10. Anhang

31	EcGlpF	pDR196-HA	
32	BccAQP	pDR196-HA	
33	BccGlpF	pDR196-HA	
34	BccGlpF	pDR196-HA	N64A
35	BccGlpF	pDR196-HA	N64D
36	BccGlpF	pDR196-HA	N64S
37	BccGlpF	pDR196-HA	S186A
38	BccGlpF	pDR196-HA	S186D
39	BccGlpF	pDR196-HA	S186C
40	BccGlpF	pDR196-HA	S186N
41	BccGlpF	pDR196-HA	S186T
42	BccGlpF	pDR196-HA	R189V
43	BccGlpF	pDR196-HA	N64S S186N
44	BccGlpF	pDR196-HA	N64D R189V
45	dvUT	pDR196-HA	
46	hUT-B	pDR196-HA	
47	TgAQP2	HA-pDR196-His	
48	-	pDR196	
49	rAQP1	pDR196	
50	EcGlpF	pDR196	
51	PfAQP	pDR196	
52	BccAQP	pDR196	
53	-	pOG2	
54	hAQP3	pOG2	
55	hAQP3	pOG2	N83D
57	hAQP3	pOG2	Y212A
58	hAQP3	pOG2	Y212A R218V
59	hAQP3	pOG2	N83D Y212A R218V
60	hAQP9	pOG2	
61	hAQP9	pOG2	N84D
63	hAQP9	pOG2	N84D R219V
64	TgAQP1	pOG2	
65	TgAQP1	pOG2	ND
66			
67			
68	RhCG	pRS426	

11. Publikationen

Song, J.; Almasalmeh, A.; Krenc, D.; Beitz, E. (2012): Molar concentrations of sorbitol and polyethylene glycol inhibit the Plasmodium aquaglyceroporin but not that of E. coli: Involvement of the channel vestibules. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (5), S. 1218–1224.

In Bearbeitung:

Almasalmeh, A.; Krenc, D.; Wu, B.; Beitz, E.: Structural Determinants of Hydrogen Peroxide Permeability of Aquaporins.

12. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Eric Beitz. Für die Möglichkeit der Anfertigung und Betreuung dieser Arbeit möchte ich mich bei ihm bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Jie für die nette Zusammenarbeit im Labor und die Durchführung der Experimente bedanken. Dawid danke ich für die langen Diskussionen, Ideen und Anregungen. Die Einführung in die Gentechnologie und Molekularbiologie von Binghua hat alles erleichtert, Danke dafür. Für die langen Stunden am Autoklav, die ganzen Bestellungen und Synthesen von Primern gilt Björn ein besonderes Dankeschön.

Ellen, Janis, Julia, Sinja und Sonja danke ich für die nette Atomsphäre im Arbeitskreis und für das Korrekturlesen. Jede(r) hat auf eigener Art einen Beitrag geleistet.

Die ermunternden Worte meiner Freunde in und außerhalb der Uni gaben mir viel Kraft und Motivation.

Meinen Eltern und Geschwistern, die mich mein ganzes Leben unterstützt haben, vor allem in den schlimmsten Zeiten des Bürgerkriegs, bedanke ich mich am herzlichsten. Ohne euch hätte ich das nie geschafft.

Wem gehört das liebste Dankeschön? Einer lieben Frau namens Rima.

Vielen Dank euch allen

13. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Almasalmeh
Vorname: Abdalnasser
Geburtsdatum: 22.07.1984
Geburtsort: Daraa-Syrien
Familienstand: verheiratet

STUDIUM

2003 – 2004 Industrielle Chemie, FH, Damaskus-Syrien
August 2007 1. Abschnitt der pharmaz. Prüfung
Mai 2009 2. Abschnitt der pharmaz. Prüfung

DIPLOMARBEIT

Juni bis November 2009 **Pharmazeutisches Institut der CAU Kiel**
Wissenschaftlicher Mitarbeiter am pharmaz. Institut und Anfertigung der Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. E. Beitz mit dem Titel: „*Untersuchung des Kationenfilters der humanen Aquaporine 3 und 9*“

PROMOTION

seit Februar 2010 **Pharmazeutisches Institut der CAU Kiel**
Wissenschaftlicher Mitarbeiter am pharmaz. Institut und Anfertigung der Dissertation im Arbeitskreis von Prof. Dr. E. Beitz mit dem Titel: „*Optimierung von Testmethoden zur phänotypischen und biophysikalischen Untersuchung der Funktion verschiedener Aquaglyceroporine*“

PREISE

Jahrespreis 2012 des Fördervereins der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der CAU zu Kiel

KONFERENZEN UND POSTERAUSSTELLUNG

März 2010 Bari-Italien: European Society for Clinical Investigation
August 2005 51ST Annual IPSF Congress in Bonn

13. Lebenslauf

PUBLIKATIONEN

Song, J.; Almasalmeh, A.; Krenc, D.; Beitz, E. (2012): Molar concentrations of sorbitol and polyethylene glycol inhibit the Plasmodium aquaglyceroporin but not that of E. coli: Involvement of the channel vestibules. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (5), S. 1218–1224.

PUBLIKATIONEN IN BEARBEITUNG:

Almasalmeh, A.; Krenc, D.; Wu, B.; Beitz, E.: Structural Determinants for Hydrogen Peroxide Permeability of Aquaporins

SPRACHKENNTNISSE

Arabisch:	Muttersprache
Deutsch:	verhandlungssicher
Englisch:	gut