

**Untersuchung putativer Kaliumkanäle und
Na⁺/H⁺ Antiporter von *Methanococcus
jannaschii* anhand heterologer Expression in
*Escherichia coli***

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biochem. Jens Hellmer

geboren am 23.12.1971 in Hannover

2003

Referent: Priv.-Doz. Dr. Carsten Zeilinger
Koreferentin: Priv.-Doz. Dr. Jutta Papenbrock
Tag der Promotion: 02.06.2003

**Untersuchung putativer Kaliumkanäle und Na⁺/H⁺
Antiporter von *Methanococcus jannaschii* anhand
heterologer Expression in
*Escherichia coli***

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biochem. Jens Hellmer

geboren am 23.12.1971 in Hannover



2003

Zusammenfassung

Das hyperthermophile Archaeobakterium *Methanococcus jannaschii* wurde 1982 am Rand einer hydrothermalen Quelle in der Tiefsee isoliert. Vierzehn Jahre später wurde das genomische Sequenzierungsprojekt abgeschlossen, so dass erstmals die genetische Information eines Archaeobakteriums zur Verfügung stand. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, putative Kaliumkanal- und Na^+/H^+ Antiportergene von *M. jannaschii* zu identifizieren und zu klonieren sowie mittels heterologer Expression der entsprechenden Genprodukte in *Escherichia coli*, Aussagen über deren Funktionsweise zu machen.

Drei putative Kaliumkanalgene, Mj0138.1, Mj1357 und Mj0139, wurden identifiziert und die Genprodukte mit MjK1, MjK2 und MjKch bezeichnet. MjK1 und MjK2 gehören phylogenetisch zur Gruppe der einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle mit zwei transmembranären Domänen, während MjKch der Familie der spannungsgesteuerten Kanäle mit sechs transmembranären Domänen zugeordnet werden kann. Die entsprechenden Gene wurden kloniert und in *E. coli* exprimiert. Ein immunchemischer Nachweis zeigte, dass MjKch und MjK1 die für Kaliumkanäle charakteristische Untereinheitenstöchiometrie von jeweils vier Untereinheiten pro Kanal aufweisen, wogegen MjK2 als Monomer vorliegt. Die Funktion der Kaliumkanäle wurde unter Verwendung der kaliumabhängigen *E. coli* Mutante LB2003 untersucht, die defizient in den Kaliumaufnahmesystemen Kup, Trk und Kdp ist. Während LB2003 Zellen mit Kontrollplasmid und Zellen, die MjK2 exprimierten 100 mM KCl benötigten, um Wachstumsraten des *E. coli* Wildtyps zu erreichen, waren Zellen, die MjK1 und MjKch exprimierten, in der Lage in Gegenwart von 1 mM KCl zu wachsen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass MjK2 nicht funktionell in *E. coli* exprimiert wird, während MjKch und MjK1 einwärtsgerichtete Kaliumströme vermitteln und so die Kaliumversorgung der Zelle gewährleisten.

Die Sequenzhomologieuntersuchungen zeigten weiterhin, dass drei Gene, Mj0057, Mj1521 und Mj1275 existieren, deren Genprodukte zu Na^+/H^+ Antiportern homolog sind. Entsprechend der phylogenetischen Familienzugehörigkeit wurden die Genprodukte mit MjNhaP1, MjNhaP2 bzw. MjNapA bezeichnet. Die genannten Gene wurden kloniert und die Aktivität der putativen Na^+/H^+ Antiporter mit Hilfe der *E. coli* Mutante Frag114 ($\Delta nhaA$, $\Delta nhaB$) untersucht. Während für MjNapA und MjNhaP2 keine Funktion nachgewiesen werden konnte, zeigten Membranvesikel nach Expression von MjNhaP1 zwischen pH 6,0 und 7,5 eine Na^+/H^+ Antiporteraktivität. Komplementationsversuche mit Hilfe der natriumsensitiven Mutante EP432 deuten jedoch daraufhin, dass MjNhaP1 unter den zellphysiologischen Bedingungen von *E. coli* nicht aktiv ist, da der Antiporter nicht in der Lage ist, den natriumsensitiven Phänotyp zu komplementieren.

Mit Hilfe der sequenzgerichteten Mutagenese wurden konservierte Aspartat-, Glutamat und Argininreste sowie alle Histidine von MjNhaP1 mutiert, um Informationen über die Struktur-

Funktionsbeziehung dieser Aminosäuren zu erhalten. Die Ergebnisse zeigen, dass D93, D132 und D161 bezüglich des Ionentransportes relevant sind, da ihr Austausch entweder zur Inaktivierung oder zu stark reduzierter Aktivität von MjNhaP1 führt. R320 und R347 sind ebenfalls für die Funktion von MjNhaP1 essentiell und die Substitution von R320 gegen Alanin, Aspartat und Histidin deutet darauf hin, dass R320 an der Bildung einer Wasserstoffbrücke beteiligt ist. Die Mutagenese von Histidinresten führte weder zu einer Beeinträchtigung der Proteinfunktion, noch zeigten sich Effekte hinsichtlich der pH-Regulation von MjNhaP1. Ein Einfluss von Histidinresten auf die pH-Sensitivität, wie sie für die Antiporter NhaA (*E. coli*) und sod2 (*Schizosaccharomyces pombe*) gezeigt wurde, existiert demnach bei MjNhaP1 nicht.

Abstract

The hyperthermophilic archaeon *M. jannaschii* was discovered in 1986 at the bottom of a deep-sea hydrothermal vent. Fourteen years later the sequencing project was finished, yielding the first genomic sequence of an archaeobacterial organism. The aim of this study was to identify and clone genes of putative potassium channels and Na^+/H^+ antiporters. Using heterologous expression in *E. coli*, the function of the corresponding gene products should be investigated subsequently.

Three putative potassium channel genes Mj0138.1, Mj1357 and Mj0139 were identified and their corresponding gene products were named MjK1, MjK2 and MjKch. MjK1 and MjK2 belong to the family of inward rectifying potassium channels with two transmembrane domains, whereas MjKch is a member of the voltage gated channels, consisting of six transmembrane domains. Immunostaining showed, that the cloned MjK1 and MjKch channels have a tetrameric subunit stoichiometry, typical for potassium channels, whereas mainly monomers of MjK2 could be detected. The function of the channels was analyzed using the potassium dependent *E. coli* mutant strain LB2003, which is deficient in the three major potassium uptake systems Kup, Trk and Kdp. Cells harbouring a control plasmid and cells expressing MjK2 required 100 mM KCl to grow at rates, comparable to the *E. coli* wild-type. In contrast, cells expressing MjKch and MjK1 were able to grow in the presence of 1 mM KCl. The results suggest, that MjK2 is not expressed functionally in *E. coli*, whereas MjKch and MjK1 can mediate inward directed potassium currents, thereby providing the host cell with potassium.

By sequence homology three Na^+/H^+ antiporter related genes Mj0057, Mj1521 and Mj1275 were identified. According to their phylogenetic relationships, the corresponding gene products were named MjNhaP1, MjNhaP2 and MjNapA. The activities of the cloned antiporters were analyzed using the *E. coli* mutant strain Frag114, which is deficient in the Na^+/H^+ antiporters NhaA and NhaB. While MjNhaP2 and MjNapA displayed no function, MjNhaP1 mediated pH dependent Na^+ transport between pH 6,0 and pH 7,5, when assayed in everted vesicles. However, MjNhaP1 failed to complement the salt sensitive phenotype of the *E. coli* mutant EP432(Δ nhaA, Δ nhaB), suggesting that the antiporter is not active under cellphysiological conditions of *E. coli*.

To gain information about the structure-function relationship, conserved aspartate, glutamate and histidine residues of MjNhaP1 were exchanged, using site-directed mutagenesis. The results indicate that D93, D132 and D161 are involved in ion translocation, since their exchange either abolish or strongly alter antiporter activity. R320 and R347 are also essential for antiporter activity and substitution of R320 against alanine, aspartate and histidine suggests, that the residue is involved in hydrogen bond formation. Unlike in the *E. coli* and yeast antiporters NhaA and sod2, the exchange of histidine residues of MjNhaP1 residues neither affected antiporter function nor the characteristic pH dependent activity-profile, indicating different mechanisms of pH regulation.

Schlagwörter:

Methanococcus jannaschii, Kaliumkanäle, Na⁺/H⁺ Antiporter

Keywords:

Methanococcus jannaschii, potassium channels, Na⁺/H⁺ Antiporter

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	ii
Abstract	iv
Abkürzungsverzeichnis	x
1 Einleitung	1
1.1 Ionenhomöostase	1
1.2 Transporter	1
1.2.1 Na ⁺ /H ⁺ Antiporter	2
1.2.2 Transportmechanismus und Regulation von Na ⁺ /H ⁺ Antiportern	4
1.2.3 Struktur von Na ⁺ /H ⁺ Antiportern	5
1.3 Kaliumtransporter	6
1.4 Kaliumkanäle	7
1.4.1 Regulatorische Domänen pro- und eukaryotischer Kaliumkanäle	8
1.4.2 K _V -Kanäle	9
1.4.3 K _{IR} -Kanäle	12
1.5 <i>Methanococcus jannaschii</i>	14
1.6 <i>M. jannaschii</i> als Modellorganismus eines marinen Lebewesens	15

2	Material und Methoden	17
2.1	Molekularbiologie	17
2.1.1	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	17
2.1.2	Polymerase Kettenreaktion	17
2.1.3	DNA Manipulation	18
2.1.4	Gelelektrophorese	18
2.1.5	Reinigung von DNA aus Agarosegelen und PCR Reaktionen	18
2.1.6	Klonierungsvektor pCR [®] 4-TOPO	18
2.1.7	Expressionsvektoren der pTrcHis [®] Serie	19
2.1.8	Vektorkonstrukte	20
2.1.9	Klonierung nach dem TOPO Verfahren	20
2.1.10	Sequenzspezifische Mutagenese	21
2.2	Mikrobiologie	21
2.2.1	Nährmedien für die Bakterienzellkultur	21
2.2.2	Bakterienstämme	22
2.2.3	Elektrokompetente Bakterien und Elektrotransformation	23
2.2.4	Chemisch kompetente Bakterien und Hitze-pulstransformation	23
2.2.5	Komplementation des salzsensitiven Phänotyps von EP432 Zellen	24
2.2.6	Komplementation des kaliumabhängigen Phänotyps von LB2003 Zellen	24
2.3	Biochemie	25
2.3.1	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	25
2.3.2	Elektrotransfer	25
2.3.3	Immunchemischer Nachweis von Fusionsproteinen	25
2.3.4	Präparation evertierter Vesikel	26
2.3.5	Kultivierung und Zellernte von <i>E. coli</i>	26
2.3.6	Membranpräparation aus <i>E. coli</i>	27
2.3.7	Solubilisierung von Membranproteinen	27
2.3.8	Affinitätschromatographie	27
2.3.9	Rekonstitution von Na ⁺ /H ⁺ Antiportern	28
2.4	Biophysik	28
2.4.1	Fluoreszenzmessung an evertierten Vesikeln	28

2.4.2	Experimenteller Aufbau	29
2.4.3	Messung der Aktivität von Na ⁺ /H ⁺ Antiportern an evertierten Vesikeln	30
2.4.4	Messung der Aktivität von Na ⁺ /H ⁺ Antiportern in Proteoliposomen	30
2.5	Bioinformatik	31
2.5.1	Computerprogramme	31
2.5.2	Datenbanken	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Die Kaliumkanäle von <i>M. jannaschii</i>	33
3.1.1	Sequenzanalyse von MjK1 und MjK2	33
3.1.2	Sequenzanalyse von MjKch	34
3.2	Expression von MjK1, MjK2 und MjKch in <i>E. coli</i>	39
3.2.1	Nachweis von MjK1 und MjKch in <i>E. coli</i> Membranen	39
3.2.2	Expression und Reinigung von MjK2	40
3.3	Einfluss von MjK1, MjK2 und MjKch auf das Wachstum von <i>E. coli</i>	42
3.4	Komplementation des kaliumabhängigen Phänotyps von LB2003 Zellen	43
3.5	Einfluss von Kaliumkanalblockern auf die Komplementation	45
3.6	Die Na ⁺ /H ⁺ Antiporter von <i>M. jannaschii</i>	47
3.6.1	Sequenzanalyse von MjNhaP1 und MjNhaP2	47
3.6.2	Sequenzanalyse von MjNapA	48
3.7	Expression von MjNhaP1, MjNhaP2 und MjNapA in <i>E. coli</i>	52
3.7.1	Reinigung von MjNhaP1	53
3.8	Messung der Na ⁺ /H ⁺ Antiporteraktivität von MjNhaP1, MjNhaP2 und MjNapA	56
3.9	Messung der Na ⁺ /H ⁺ Antiporteraktivität von MjNhaP1 in Proteoliposomen	58
3.10	Komplementation des salzsensitiven Phänotyps von EP432 Zellen	59
3.11	Sequenzgerichtete Mutagenese von MjNhaP1	60
3.11.1	Homologieuntersuchungen von MjNhaP1	60
3.11.2	Aktivitätsmessungen von MjNhaP1 Mutanten	62

4 Diskussion	66
4.1 Die Na ⁺ /H ⁺ Antiporter von <i>M. jannaschii</i>	66
4.1.1 Transportcharakteristik von MjNhaP1	68
4.1.2 Reinigung von MjNhaP1	69
4.2 Sequenzgerichtete Mutagenese von MjNhaP1	70
4.3 Die Kaliumkanäle von <i>M. jannaschii</i>	72
4.3.1 Charakterisierung von MjK1	72
4.3.2 Charakterisierung von MjK2	73
4.3.3 Charakterisierung von MjKch	75
4.4 Toxizität von Kalium bei <i>E. coli</i>	76
4.5 Natriumhomöostase von <i>M. jannaschii</i>	78
4.6 Kaliumhomöostase von <i>M. jannaschii</i>	79
4.7 Abschließende Bemerkungen	81
Anhang	82
A Tabellen	82
B Geräteliste	88
C Chemikalien	90
Abbildungsverzeichnis	93
Literaturverzeichnis	96
Publikationen	113

Abkürzungsverzeichnis

Chemikalien	
Amp	Ampicillin
AO	Acridinorange
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
Cam	Chloramphenicol
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)- dimethylammonio]-propansulfonat
DDM	Dodecylmaltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Kan	Kanamycin
KP _i	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ Puffer
MES	2-Morpholino-ethanaethansulfonsäure Monohydrat
NBT	Nitrotetrazoliumblausulfat
NLS	N-Lauroylsarkosin
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxi- dierte Form)
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (re- duzierte Form)
Pipes	Piperazin-1,4-bis-2-ethansulfonsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Einheiten	
A	Ampere
°C	Grad Celsius
D	Dalton
g	Gramm
h	Stunde(n)
l	Liter
min	Minute(n)
m	Meter
M	molar
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
s	Sekunde(n)
Pa	Pascal
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
V	Volt
U	Unit
U min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute

Aminosäuren			
A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	P	Prolin
D	Aspartat	Q	Glutamin
E	Glutamat	R	Arginin
F	Phenylalanin	S	Serin
G	Glycin	T	Threonin
H	Histidin	V	Valin
I	Isoleucin	W	Tryptophan
K	Lysin	X	beliebige Aminosäure
L	Leucin	Y	Tyrosin

Sonstige

ATPase	Adenosintriphosphatase
Bp	Baasenpaare
CMC	kritische Mizellenkonzentration
DNA	Desoxyribonukleinsäure
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RNase	Ribonuklease A
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Ionenhomöostase

Kalium und Natrium sind die häufigsten in biologischer Materie auftretenden Kationen. Nahezu alle Organismen nehmen Kalium aktiv über Transporter oder Kaliumkanäle auf (siehe Kapitel 1.3 und 1.4), so dass die intrazelluläre Kaliumkonzentration höher ist, als die des Außenmediums [Christian und Waltho 1962]. Kalium ist daher bei den meisten Zellen das Hauptosmotikum und hat damit eine entscheidende Funktion bei der Kontrolle des Zellvolumens und der Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts [Geck und Pfeiffer 1985].

Die elektrochemische Energie des Natriumgradienten wird von Zellen u.a. für die Aufnahme von Nährstoffen wie Zuckern oder Aminosäuren genutzt [Stock und Roseman 1971] und einige Prokaryoten besitzen eine Na^+ -ATPase, so dass mit Hilfe des Natriumgradienten ATP synthetisiert werden kann [Honer zu Bentrup u. a. 1997]. Im Gegensatz zu Kalium wirkt Natrium bei den meisten Organismen endogen toxisch. Es wird daher bei vielen Zelltypen über Na^+/H^+ Antipporter wieder aus der Zytoplasma heraustransportiert (siehe Kapitel 1.2.1).

1.2 Transporter

Transporter sind in der Lage, Ionen oder Moleküle entgegen ihres Potentialgradienten zu transportieren [Shechter 1986]. Die für den Transport benötigte Energie wird über zwei unterschiedliche Mechanismen bereitgestellt, so dass zwischen einer primären und einer sekundären Klasse von Transportern unterschieden wird.

Die der primären Klasse nutzen für den Transport ihres Substrates chemische Bindungsenergie, die durch die Hydrolyse von ATP oder die Oxidation von NADH frei wird [Mitchell und Moyle 1968, Wilson u. a. 1976]. Diese Reaktionen sind mitunter reversibel, so dass mit Hilfe eines Ionengradienten ATP synthetisiert werden kann, wie es beispielsweise bei der F_0F_1 -ATPase der Fall ist (siehe Abbildung 1.1).

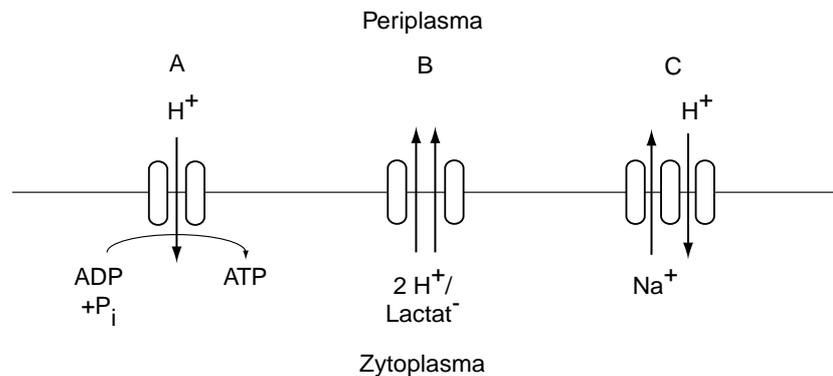


Abbildung 1.1: Schematisches Modell verschiedener Transporterklassen. (A) Primärer Transporter F_0F_1 -ATPase (B) Elektrogener, sekundärer Lactat/ H^+ Symporter, (C) Elektroneutraler, sekundärer Na^+/H^+ Antiporter.

Sekundäre Transporter hingegen nutzen elektrochemische Gradienten von Ionen wie H^+ oder Na^+ für den Transport ihres Substrates oder bauen durch Substrattransport elektrochemische Gradienten auf. Bei den sekundären Transportern unterscheidet man zwischen Symportern [Naftalin 1984], welche das Substrat und das energieliefernde Ion in die gleiche Richtung transportieren und Antiportern, bei denen der Transport in die entgegengesetzte Richtung verläuft [Krulwich 1983]. Kommt es beim Transport zu einer Ladungstrennung an der Membran, so sind diese Transporter elektrogen. Tritt keine transportbedingte Veränderung der Ladungsverteilung auf, werden die Transporter entsprechend als elektroneutral bezeichnet (siehe Abbildung 1.1).

Am besten untersucht sind die Ionentransportsysteme des Modellorganismus *Escherichia coli*, welcher im Wesentlichen drei Na^+/H^+ Antiporter, NhaA, NhaB und ChaA sowie drei Kaliumaufnahme-systeme, Trk, Kdp und Kup (siehe Kapitel 1.3) besitzt. Ihre Funktionen werden nachfolgend näher charakterisiert.

1.2.1 Na^+/H^+ Antiporter

Na^+/H^+ Antiporter sind ubiquitär vorkommende Proteine, die in nahezu allen Zellen und Organellen nachgewiesen werden konnten [Padan und Schuldiner 1993, Padan u. a. 2001]. Die meisten bakteriellen Na^+/H^+ Antiporter sind elektrogen und transportieren H^+ und Na^+ (Li^+) mit einer Stöchiometrie von 2:1 oder 3:2. Da Natrium im Symport durch natriumgekoppelte Transportsysteme in die Zelle gelangt [Stock und Roseman 1971, Turner und Silverman 1977], muss es zur

Aufrechterhaltung des Gradienten und zur Vermeidung toxischer Effekte wieder heraustransportiert werden. Dieser Transportvorgang wird bei Bakterien, die meistens keine primären Natriumpumpen besitzen, von Na^+/H^+ Antiportern geleistet.

Bei *E. coli* wurden zwei Na^+/H^+ Antiporter (NhaA, NhaB) sowie ein unspezifischer $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ Antiporter (ChaA) identifiziert (siehe Abbildung 1.2), die den auswärtsgerichteten Natriumtransport vermitteln [Pinner u. a. 1992, Taglicht u. a. 1991, Ivey u. a. 1993]. Die Deletion ihrer Gene führt bei *E. coli* zu erhöhter Natriumsensitivität sowie zu einer Beeinträchtigung der intrazellulären pH-Regulation [Zilberstein u. a. 1982]. Eine erhöhte Natriumtoleranz bezüglich des Wildtyps konnte dagegen bei Bakterien durch die Überexpression von Na^+/H^+ Antiportern erzielt werden [Waditee u. a. 2002].

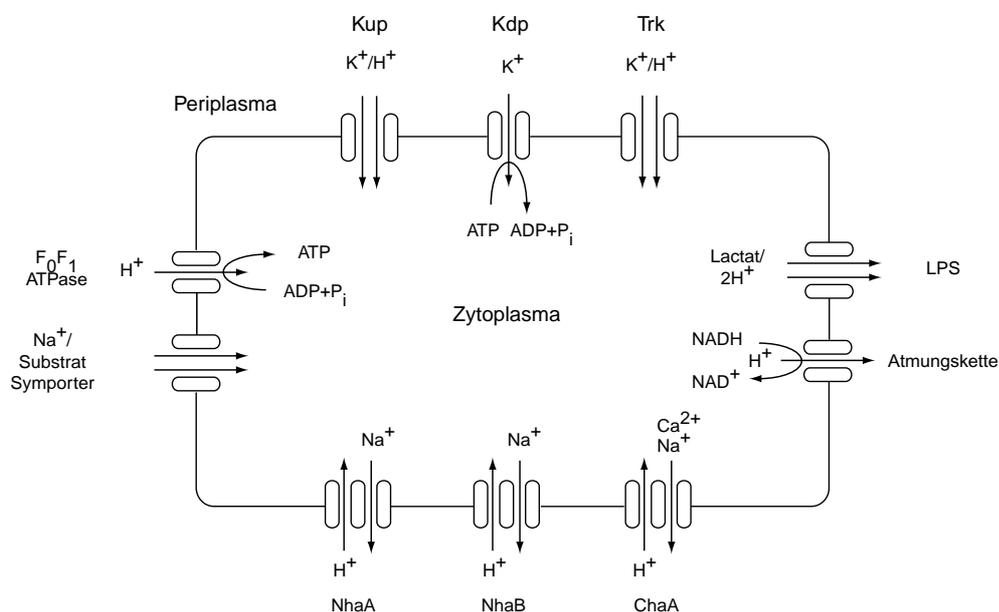


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Kaliumtransporter und Na^+/H^+ Antiporter von *E. coli*. Die Protonengradienten, die durch den Lactat/ H^+ Symporter (LPS) und die Atmungskette erzeugt werden, liefern die Energie für die Kaliumaufnahme, den auswärtsgerichteten Natriumtransport und die ATP-Synthese. Der von Na^+/H^+ Antiportern erzeugte Natriumgradient wird für die Aufnahme von Nährstoffen durch Na^+ gekoppelte Symporter genutzt (siehe Kapitel 1.3 und 1.2.1).

Eukaryotische Na^+/H^+ Antiporter haben im Gegensatz zu prokaryotischen eine elektroneutrale Transportstöchiometrie. Ihre Funktion variiert in Abhängigkeit vom Zelltyp und besteht bei höheren Eukaryoten häufig in der Kontrolle des intrazellulären pH-Wertes. Säugetierzellen weisen beispielsweise einen zytoplasmatischen pH Wert von etwa 7,2 auf, welcher massgeblich durch die Aktivität von Na^+/H^+ Antiportern stabilisiert wird. Dabei wird H^+ im Austausch gegen Na^+ aus der Zelle ins Periplasma transportiert, weshalb Zellen, deren Antiporter durch Mutation inaktiviert sind, eine erhöhte Acidosesensitivität aufweisen.

Bei Pflanzen besteht die Funktion der Na^+/H^+ Antiporter vorwiegend in der Aufrechterhaltung ei-

ner niedrigen zytoplasmatischen Na^+ Konzentration. Für *Arabidopsis thaliana* und *Lycopersicon esculentum* konnte gezeigt werden, dass die Überexpression vakuolärer Na^+/H^+ Antiporter der Nhx1 Familie zu verstärkter Na^+ -Sequestrierung in der Vakuole führt, was wiederum die Natriumtoleranz dieser Pflanzen erhöht [Apse u. a. 1999, Zhang und Blumwald 2001]. Eine erhöhte Natriumtoleranz wurde ebenso durch Überexpression des plasmamembranständigen Na^+/H^+ Antiporters SOS1 erzielt [Shi u. a. 2003].

1.2.2 Transportmechanismus und Regulation von Na^+/H^+ Antiportern

Trotz intensiver biochemischer und biophysikalischer Charakterisierung von Na^+/H^+ Antiportern ist bislang wenig über ihren Transportmechanismus bekannt. Struktur-Funktionsanalysen zugrundeliegende Mutagenesestudien zeigten, dass vorwiegend Aspartat- und Lysinreste für die Funktion notwendig sind [Inoue u. a. 1995, Dibrov u. a. 1998]. Man nimmt an, dass Aspartatreste die transportierten Kationen in einer Struktur koordinieren, die einem Kronenether vergleichbar ist [Boyer 1988].

Die Aktivität vieler Na^+/H^+ Antiporter wird durch den intra- oder extrazellulären pH-Wert reguliert. Bei NhaA (*E. coli*) kommt es beispielsweise zwischen pH 7,0 und 8,5 zu einer Änderung der Transportgeschwindigkeit um etwa drei Größenordnungen [Taglicht u. a. 1991, Gerchman u. a. 1993]. Mutationsstudien an Histidinresten von NhaA haben gezeigt, dass H225 maßgeblich die pH-Regulation beeinflusst [Rimon u. a. 1995]. Die Bedeutung von Histidinresten hinsichtlich der pH-Regulation konnte durch Mutagenesestudien an sod2 (*Schizosaccharomyces pombe*) bestätigt werden [Dibrov u. a. 1998].

Zahlreiche Antiporter besitzen C-terminale zytoplasmatische Domänen von einigen hundert Aminosäuren. Einige dieser Domänen, wie z.B. die TRK Domäne von NhaP1 (*Halobacterium sp. NRC-1*), sind konserviert und treten ebenfalls bei Kaliumtransportern und Kaliumkanälen auf [Jiang u. a. 2002]. Da sie ein Rossmannmotiv (G-X-G-X-X-G) enthalten, für das Konformationsänderungen in Abhängigkeit von NAD/NADH gezeigt wurden, nimmt man an, dass TRK Domänen die Aktivität dieser Antiporter in Abhängigkeit des Redoxstatus regulieren [Roosild u. a. 2002].

Eine besonders starke Diversifizierung C-terminaler Domänen tritt infolge einer Spezialisierung u.a. bei eukaryotischen Na^+/H^+ Antiportern der Nhe Familie auf [Orlowski und Grinstein 1997]. Die Aktivität dieser Antiporter variiert stark mit der intrazellulären ATP Konzentration, weshalb ATP-bindende Domänen postuliert werden [Cassel u. a. 1986]. Desweiteren existieren bei Nhe1 Bindungsstellen für Calmodulin. Ihre Deletion führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Proteins, was ebenfalls bei erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentrationen der Fall ist. Es wird daher davon ausgegangen, dass die unbesetzten Calmodulinbindestellen einen autoinhibitorischen Effekt auf die Proteinaktivität haben [Wakabayashi u. a. 1994].

1.2.3 Struktur von Na^+/H^+ Antiportern

Hydrophobizitätsuntersuchungen der Aminosäuresequenzen zeigen, dass Na^+/H^+ Antiporter ausgesprochen hydrophobe Proteine sind, die zehn bis dreizehn transmembranäre Domänen aufweisen (siehe Abbildung 1.3 A). Durch die immunchemische Untersuchung von Fusionsproteinen zwischen Antiporterfragmenten und alkalischer Phosphatase konnten diese Topologievorhersagen für NhaA (*E. coli*) bestätigt werden [Rothman u. a. 1996].

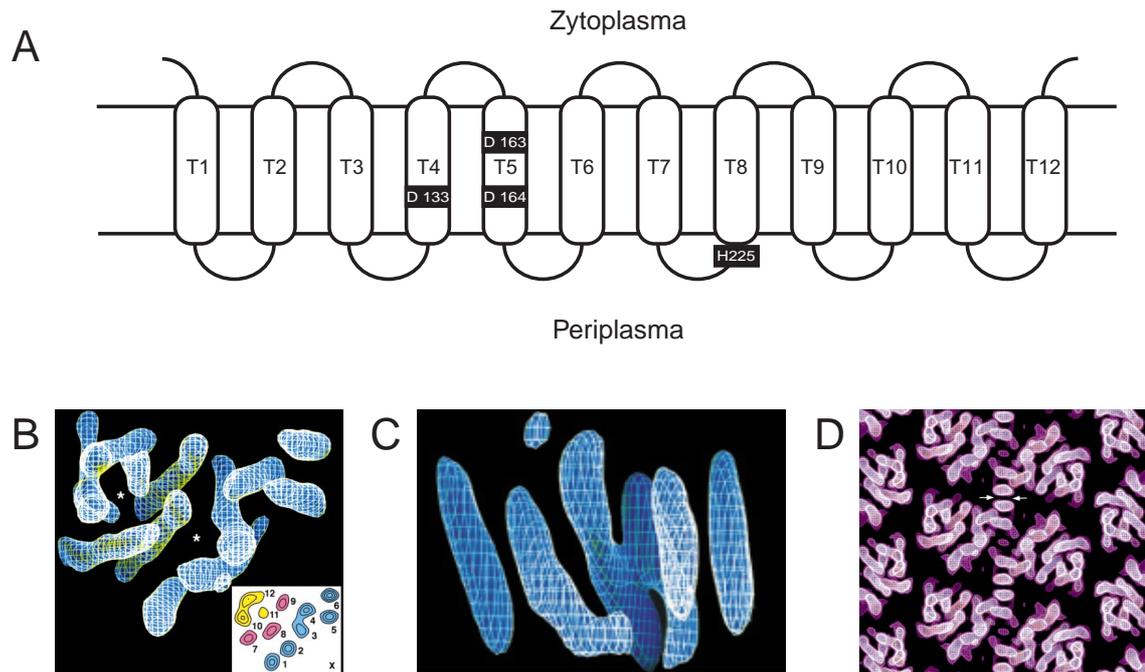


Abbildung 1.3: (A) Schematisches Sekundärstrukturmodell von NhaA. T1-T12: transmembranäre Domänen. Funktionell bedeutsame Aminosäuren (siehe Text) sind schwarz unterlegt dargestellt. (B) Dreidimensionale Karte von NhaA mit Ansicht senkrecht zur Membranebene. Die transmembranären Helices sind willkürlich nummeriert und die möglichen Porenbereiche durch weiße Sterne gekennzeichnet. (C) Ansicht in der Membranebene auf die Helices 1-6 der Dimerkontaktstelle (siehe Text). (D) Ansicht mehrerer Einheitszellen von NhaA senkrecht zur Membranebene. Die Dimer-Dimer Kontaktstellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Abbildungen B-D entnommen aus: [Williams 2000]

Aufgrund der hohen Expressionsraten in *E. coli* war es zudem möglich zwei- und dreidimensionale Kristalle von NhaA zu erzeugen, die eine Darstellung der Struktur mit einer Auflösung von 7 Å erlaubten [Williams u. a. 1999]. Die dreidimensionale Karte von NhaA zeigt zwölf elektrodichte Bereiche, die die Membran durchspannen (siehe Abbildung 1.3). Fünf dieser Domänen (1-3, 5-6, siehe Abbildung 1.3 B) bilden im Kristall die Kontaktstelle jeweils zweier NhaA Untereinheiten (siehe Abbildung 1.3 D). Bislang konnte nicht geklärt werden, ob eine dimere Struktur für die Funktion von NhaA notwendig ist, doch macht der große Abstand zweier Untereinheiten eine Lokalisation der Ionenpore(n) an den Kontaktstellen unwahrscheinlich [Williams 2000]. Die Helices 10, 11 und 12 sowie die Helices 2, 3 und 8 bilden links-, bzw. rechtsgängige Bündel, in

deren Zentrum die Elektronendichte niedrig ist. Es wurde daher postuliert, dass sie die Ionenporen von NhaA bilden (siehe Abbildung 1.3 B).

1.3 Kaliumtransporter

Die Kaliumaufnahme wird bei *E. coli* im Wesentlichen durch die Transportsysteme Trk, Kup und Kdp vermittelt (siehe Abbildung 1.2). Diese Transporter unterscheiden sich bezüglich ihrer Affinität für Kalium und ihres Transportmechanismus. Zudem sind sie bei unterschiedlichen zellphysiologischen Bedingungen aktiv, wodurch eine Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen gewährleistet wird. *E. coli* Mutanten, bei denen alle drei Transporter durch Mutationen inaktiviert sind, zeigen einen kaliumabhängigen Phänotyp und benötigen extrazellulär eine etwa 10.000-fach höhere Kaliumkonzentration als der Wildtyp [Stumpe und Bakker 1997].

Das Transportsystem Trk gehört zu einer Proteinsuperfamilie von Kaliumtransportern, die in Pflanzen Bakterien und Pilzen vorkommt und bei den meisten Organismen aus drei Untereinheiten TrkA, TrkE und TrkH besteht [Harms u. a. 2001]. Es wird vermutet, dass der Proteinkomplex Kalium im Symport mit Protonen transportiert und dass die ATP Abhängigkeit des Kaliumtransports über die Untereinheit TrkE vermittelt wird [Schlosser u. a. 1995]. Trk wird bei *E. coli* konstitutiv exprimiert, transportiert Kalium mit niedriger Affinität ($K_M(K^+) = 1 \text{ mM}$) und wird durch den Zellturgor reguliert [Bossemeyer u. a. 1989].

Wie Trk gehört auch Kup zu einer Proteinsuperfamilie, die bei Pro- und Eukaryoten gleichermaßen auftritt. Bei hyperosmotischem Stress und niedrigem pH-Wert wird Kalium hauptsächlich über Kup aufgenommen ($K_M(K^+) = 0,58 \text{ mM}$), da die Aktivität von Trk unter diesen Bedingungen stark reduziert ist [Trchounian und Kobayashi 1999]. Der Transporter ist in der Lage, Kalium in Abwesenheit einer funktionsfähigen F_0F_1 -ATPase zu transportieren. Da *E. coli* jedoch durch Endproduktausschleusung einen Protonengradienten erzeugen kann [Ten Brink und Konings 1980], konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden, ob eine protonenmotorische Kraft für den Kaliumtransport notwendig ist.

Bei einer extrazellulären Kaliumkonzentrationen von $<100 \mu\text{M}$ ist die Affinität der Kaliumtransporter Trk und Kup nicht ausreichend, um eine Versorgung der Zelle mit Kalium sicherzustellen. Der Zellturgor ist daher erniedrigt, wodurch es zur Induktion der Kdp ATPase kommt [Epstein 1992]. Dieser Multiproteinkomplex wird vom *kdpFABCD* Operon kodiert und besteht aus vier membrangebundenen Untereinheiten KdpF, KdpA, KdpB und KdpC. Der Kaliumtransport wird von der katalytischen Untereinheit KdpB und der translozierenden Untereinheit KdpA geleistet. Für KdpC und KdpF werden stabilisierende Funktionen für den Proteinkomplex diskutiert [Gassel

und Altendorf 2001]. Kdp weist von den bei *E. coli* bekannten Systemen mit einem K_M Wert von $2 \mu\text{M}$ die höchste Affinität für Kalium auf [Rhoads u. a. 1976].

1.4 Kaliumkanäle

Während die Kaliumaufnahme bei *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma genitalium*, *Borrelia burgdorferi* ausschließlich von Transportern geleistet wird, treten bei anderen Vertretern der Eu- und Archaeobakterien zusätzlich Kaliumkanäle auf, die die Kaliumaufnahme vermitteln.

Kaliumkanäle sind tetramere Membranproteine aus identischen oder ähnlichen Untereinheiten, die kaliumselektive Poren ausbilden und Kalium entlang des elektrochemischen Gradienten transportieren [Miller 2000]. Die zwei wichtigsten Klassen sind die spannungsgesteuerten (K_V) und die einwärtsrektifizierenden Kaliumkanäle (K_{IR}), die sechs (6 TM), bzw. zwei transmembranäre Domänen (2 TM) pro Untereinheit aufweisen [Doupnik u. a. 1995, Latorre u. a. 1984]. Bei beiden Klassen flankieren die zwei jeweils carboxyterminalen Domänen die für Kaliumkanäle charakteristische Signatursequenz (G-Y-G-D), die den Selektivitätsfilter für Kalium bildet (siehe Abbildung 1.4).

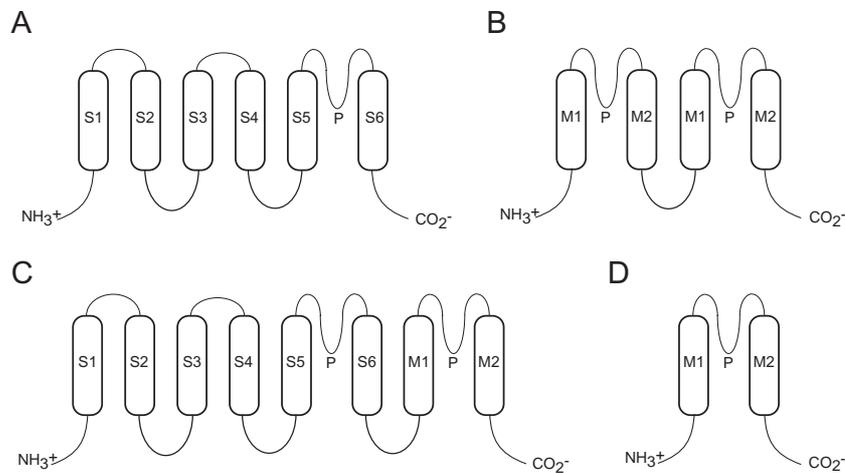


Abbildung 1.4: Schematisches Sekundärstrukturmodell verschiedener Kaliumkanaltypen. (A) 6 TM, (B) 2 TM+2 TM, (C) 6 TM+2 TM, (D) 2 TM (siehe Text). S1-S6, M1-M2: transmembranäre Domänen, P: Porenregion mit Signatursequenz (G-Y-G-D).

Während bei Prokaryoten ausschließlich 2 TM und 6 TM Kanäle vorkommen, kam es bei Eukaryoten als Folge von Genduplikationen und Fusionen zur Bildung so genannter Tandemporenkanäle. Bei diesen Kanälen treten zwei Signatursequenzen in einer Polypeptidkette auf, so dass nur zwei Untereinheiten zur Bildung eines Kaliumkanals notwendig sind. Bei den TOK¹ Kanälen

¹TOK: tandem pore outward rectifying K⁺ channel

(*S. cerevisiae*) handelt es sich um Proteine mit acht transmembranären Domänen, die wahrscheinlich aus der Fusion eines 6 TM Kanals mit einem 2 TM Kanal hervorgegangen sind (6 TM+2 TM) [Ketchum u. a. 1995]. Eine mögliche genetische Vorstufe bildet das *mjaKchAB* Operon bei dem bereits ein 6 TM und ein 2 TM Kanal unmittelbar hintereinander auf dem Genom lokalisiert, aber durch ein Stopcodon getrennt sind [Derst und Karschin 1998]. Die TWIK², TREK³ und TASK⁴ Kanäle bestehen aus vier transmembranären Domänen pro Untereinheit (2 TM+2 TM), so dass eine Fusion zweier 2 TM Kanäle wahrscheinlich ist [Fink u. a. 1996, Kim u. a. 2000].

1.4.1 Regulatorische Domänen pro- und eukaryotischer Kaliumkanäle

Neben den transmembranären Domänen kommen bei zahlreichen prokaryotischen Kaliumkanälen C-terminale, zytoplasmatische RCK⁵ Domänen vor, die die Kanalaktivität beeinflussen [Jiang u. a. 2001, Jiang u. a. 2002, Derst und Karschin 1998]. Abhängig vom Kanaltyp sind sie auf die Bindung unterschiedlicher Liganden wie Ca²⁺, NAD/NADH oder Glutathion angepasst, so dass die Kanalaktivität über zahlreiche physiologische Stimuli moduliert werden kann. Da sie bei einigen prokaryotischen Kaliumkanälen nicht auftreten, sind sie für die Funktion jedoch nicht essentiell.

Als Folge der Spezialisierung unterlagen die regulatorischen Domänen eukaryotischer Kaliumkanäle einer stärkeren Diversifizierung, als die der Prokaryoten (siehe Abbildung 1.5). Zudem treten sie C- und N-terminal auf und sind an ein breiteres Spektrum von Liganden (ATP, Mg²⁺, Ca²⁺, zyklische Nukleotide, G-Proteine) angepasst [Yellen 2002].

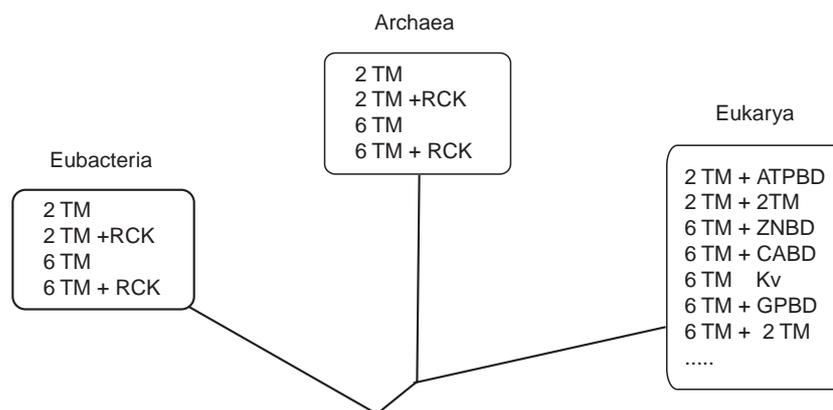


Abbildung 1.5: Kaliumkanäle und regulatorische Domänen bei Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryoten. RCK: regulator of conductance of K⁺-channels, ATPBD: ATP-bindende Domäne, ZNBD: Binde-domäne für zyklische Nukleotide, CABD: kalziumbindende Domäne, GPBD: G-Protein-bindende Domäne, K_V: spannungsgesteuerter Kanal

²TWIK: tandem pore inward rectifying K⁺ channel

³TREK: TWIK related K⁺ channel

⁴TASK: TWIK related acid sensitive K⁺ channel

⁵RCK: regulator of conductance of K⁺ channels

1.4.2 K_V -Kanäle

K_V -Kanäle ändern die Permeabilität für Kalium als Funktion des Membranpotentials der Zelle, d.h. ein für den jeweiligen Kanal charakteristisches Schwellenpotential muss erreicht werden, um den Kanal zu aktivieren (siehe Abbildung 1.6).

Trotz ähnlicher Struktur sind die elektrophysiologischen Eigenschaften innerhalb der Gruppe der K_V -Kanäle sehr heterogen. Man unterscheidet Kanäle deren Offenwahrscheinlichkeit bei Hyperpolarisation zunimmt und depolarisationsaktivierte Kanäle. Für beide Kanalfamilien konnte gezeigt werden, dass der in S4 befindliche Spannungssensor (siehe Abbildung 1.7) bei Depolarisation der Zelle einer Verlagerung zur extrazellulären Seite der Zytoplasmamembran unterliegt. Der an diese Konformationsänderung gekoppelte Mechanismus, der bei hyperpolarisationsaktivierten Kanälen zum Schließen und bei depolarisationsaktivierten Kanälen zum Öffnen der Pore führt, ist jedoch bislang ungeklärt.

K_V -Kanäle wurden intensiv in tierischen und pflanzlichen Geweben untersucht. Obwohl bemerkenswerte Strukturhomologien zwischen beiden Systemen existieren unterscheiden sich die K_V -Kanäle insbesondere durch die Länge ihrer Offenzeiten. Die meisten tierischen K_V -Kanäle vom Shaker-Typ sind nur für einige Millisekunden aktiv und unterliegen dann einer Inaktivierung (siehe auch Kapitel 1.4.2: Struktur von K_V -Kanälen). Während dieser Phase, die nach einer Depolarisation von Nervenzellen während des Aktionspotentials auftritt, kommt es zum Kaliumausstrom und damit zu einer Repolarisation der Zelle. Eine signifikante Änderung der intrazellulären Kaliumkonzentration tritt aufgrund der kurzen Offenzeiten nicht ein.

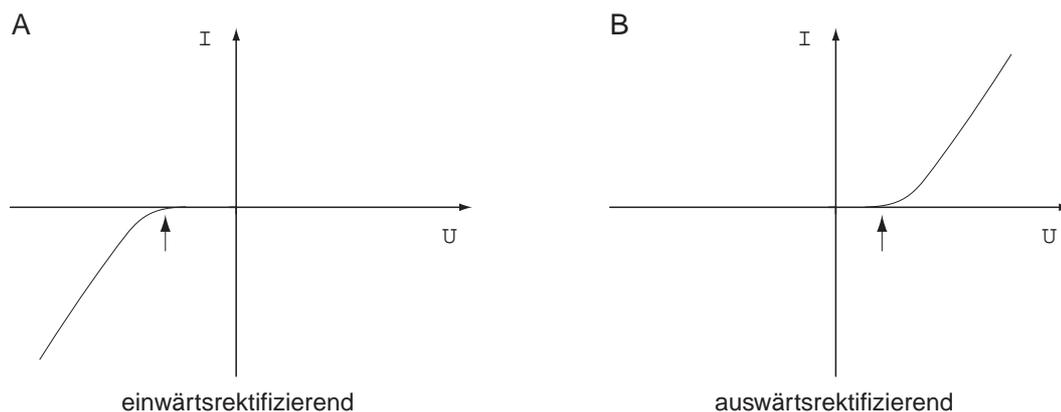


Abbildung 1.6: Strom-Spannungsbeziehung bei K_V -Kanälen. Typische Strom-Spannungskennlinie bei: (A) hyperpolarisationsaktivierten, einwärtsrektifizierenden Kaliumkanälen (z.B. Kat1 (*A. thaliana*)), (B) depolarisationsaktivierten, auswärtsrektifizierenden Kaliumkanälen (z.B. SKOR (*A. thaliana*)). Die Schwellenpotentiale sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Pflanzliche K_V -Kanäle wie Kat1 (*A. thaliana*) unterliegen demgegenüber keiner Inaktivierung und können abhängig vom Membranpotential über mehrere Minuten geöffnet sein. Getrieben durch

die plasmamembranständigen ATPasen kommt es daher zu makroskopischen Kaliumflüssen, die den Zellturgor beeinflussen, was beispielsweise das Öffnen von Schließzellen reguliert [Pilot u. a. 2001].

Struktur von K_V -Kanälen

Die molekulare Grundlage der spannungsabhängigen Permeabilitätsänderungen für Kalium bilden geladene Aminosäureseitenketten in den Domänen S1-S4 (siehe Abbildung 1.7). Bei den meisten K_V Kanälen tritt in S4 eine ungewöhnlich hohe Dichte positiver Ladungen auf, die durch Lysin oder Argininreste an jeder 3. Aminosäureposition hervorgerufen wird [Yellen 2002]. Es konnte gezeigt werden, dass diese mit negativ geladenen Glutamatresten in S2 interagieren [Cha u. a. 1999] und dass es durch Mutation zu einer Beeinflussung des Aktivierungsverhaltens kommt. Die Domänen S1-S4 werden daher als Spannungssensor bezeichnet [Seoh u. a. 1996].

Der spannungsgesteuerte Shaker Kanal konnte kristallisiert und mit einer Auflösung von 25 Å dargestellt werden, so dass es möglich war, Informationen über die Grobstruktur des Kanals zu erhalten. Die Röntgenstrukturanalysen kristallisierter β , T1 und CaMBD Domänen [Schumacher u. a. 2001, Gulbis u. a. 2000] lieferten weitere Strukturdaten, weshalb derzeit zwei grundsätzliche Typen spannungsgesteuerter Kanäle unterschieden werden können. Beiden gemeinsam ist der Spannungssensor (S1-S4) und die Porendomäne (S5-P-S6) (siehe Abbildung 1.7 A).

Die $K_V1.x$ - $K_V4.x$ Unterfamilie besitzt zusätzlich eine N-Terminale Tetramerisierungsdomäne (T1), die die Spezifität bei der Assemblierung der Untereinheiten bestimmt. T1 Domänen sind an der Bindung von β -Untereinheiten und der Ausbildung verschiedener Protein-Protein Interaktionen beteiligt und modulieren auf diese Weise die Kanalaktivität (siehe Abbildung 1.7 B). Zudem besitzen sie ein terminales Peptid, welches in einem als N-Typ Inaktivierung bezeichneten Mechanismus autoinhibitorisch auf die Kanalfunktion wirkt [Hoshi u. a. 1990]. Die C-Termini der K_V Familie weisen keine offensichtliche Domänenstruktur auf, enthalten aber häufig PDZ⁶, die die zelluläre Lokalisation der Kanäle bestimmen und eine Funktion hinsichtlich der Signaltransduktion haben [Doyle u. a. 1996]. Bei den β -Untereinheiten handelt es sich um regulatorische Domänen, die die Kanalaktivität möglicherweise über einen direkten Kontakt mit dem Spannungssensor modulieren. Sie weisen eine Oxidoreduktaseaktivität auf und binden NAD/NADH, weshalb eine regulatorische Funktion in Abhängigkeit des Redoxstatus wahrscheinlich ist [Gulbis u. a. 1999].

Viele andere 6 TM Kanäle haben eine vom K_V Typ abweichende Struktur, die durch das Fehlen der T1 Domäne und die Gegenwart einer C-terminalen regulatorischen Domäne gekennzeichnet

⁶PDZ: PSD95-Disk large-ZO domain

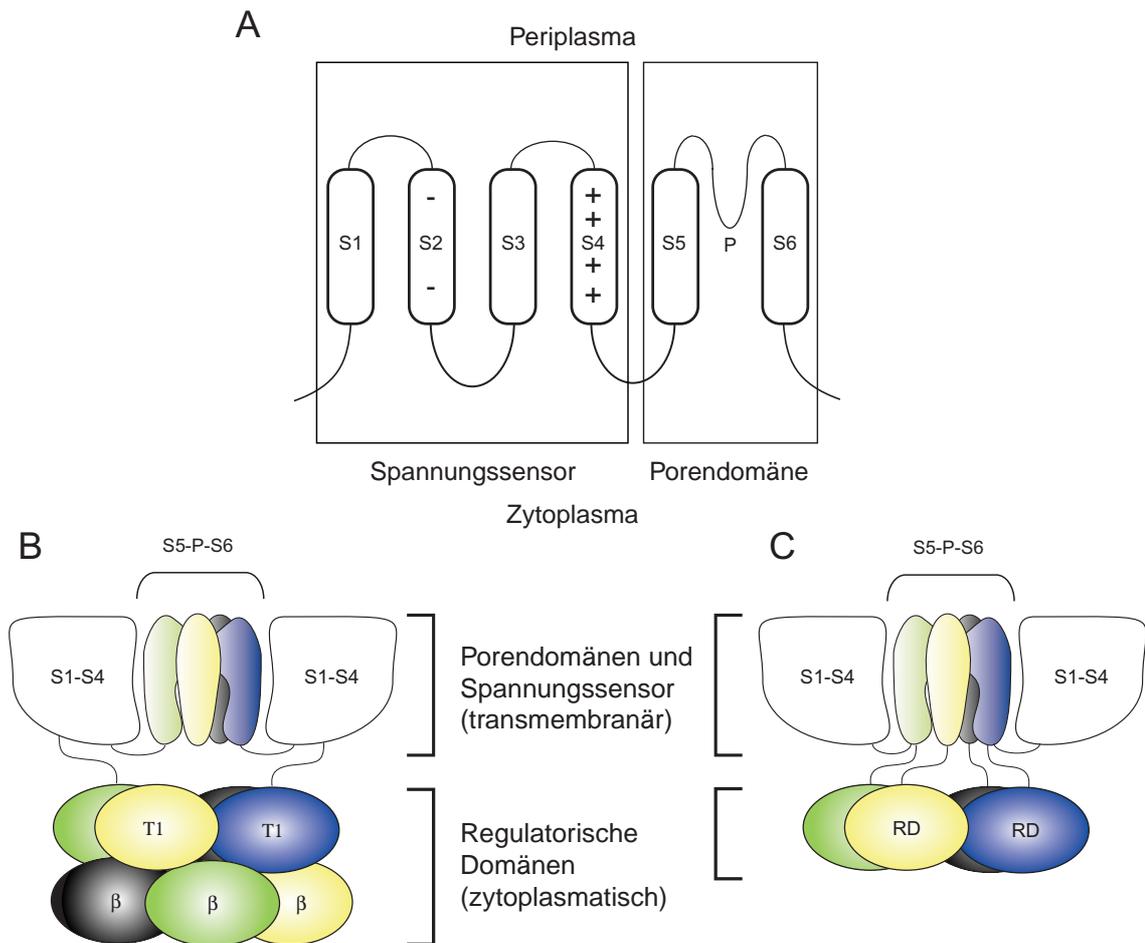


Abbildung 1.7: Domänenorganisation von 6 TM Kanälen. (A) Schematisches Sekundärstrukturmodell der transmembranären Domänen eines 6 TM Kanals. Die Domänen sind mit S1-S6 gekennzeichnet. (+) und (-) symbolisieren die geladenen Aminosäuren des Spannungssensors. Die Porenregion ist mit P gekennzeichnet. (B) Kanal vom K_V Typ. T1: Tetramerisierungsdomänen, β : β -Untereinheiten (siehe Text). Zwei der jeweils vier Spannungssensordomänen sind dargestellt. (C) Domänenorganisation von HCN, CNG, SK und anderen Kanälen (siehe Text). RD: Regulatorische Domänen, z.B. CaMBD (calmodulinbindende Domäne).

ist. Zu dieser Gruppe zählen die spannungsgesteuerten KCNQ und Eag⁷ Kanäle [Schroeder u. a. 2000, Bruggemann u. a. 1993], spannungs- und ligandengesteuerte BK⁸ (Ca^{2+} aktiviert) und HCN⁹ Kanäle (Hyperpolarisations- und Nukleotid-aktiviert)[Xia u. a. 2002, Wainger u. a. 2001], sowie ligandengesteuerte CNG¹⁰ und SK¹¹ Kanäle [Kaupp und Seifert 2002, Marrion und Tavalin 1998]. In einigen Fällen weisen die C-terminalen Sensoren eine tetramere Struktur auf, während bei anderen die Bildung zweier Dimere angenommen wird (siehe Abbildung 1.7 C).

⁷Eag: ether-a-go-go channel

⁸BK: large conductance calcium-activated K^+ channel

⁹HCN: hyperpolarization and cyclic nucleotide-gated K^+ channel

¹⁰CNG: cyclic nucleotide-gated K^+ channel

¹¹SK: small conductance calcium-activated K^+ channel

1.4.3 K_{IR} -Kanäle

K_{IR} -Kanäle sind charakterisiert durch eine erhöhte Leitfähigkeit bei Hyperpolarisation sowie eine erniedrigte Leitfähigkeit bei Depolarisation der Zelle [Namba u. a. 1996]. Im Gegensatz zu den K_V -Kanälen besitzen K_{IR} -Kanäle keinen Spannungssensor. Sie weisen daher keine potentialabhängige Aktivierung auf, sondern leiten Kalium sobald ein Potentialgradient besteht (siehe Abbildung 1.8).

Die Funktion von K_{IR} -Kanälen besteht bei Eukaryoten u.a. in der Stabilisierung des Membranruhepotentials nahe dem Gleichgewichtspotential von Kalium. Bei Prokaryoten ist sie weitgehend ungeklärt, da die bislang klonierten und in *E. coli* exprimierten Kanäle KcsA (*Streptomyces lividans*), MthK (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) und Kch (*Escherichia coli*) bis auf Kch keine signifikanten phänotypischen Veränderungen hervorriefen [Schrempf u. a. 1995, Jiang u. a. 2002, Uozumi 2001]. Für Kch wurde ein Kaliumverlust der Zellen beschrieben, der jedoch nur auftrat, wenn das Protein unter der Kontrolle eines T7 Promotors überexprimiert wurde [Munsey u. a. 2002]. Die Deletion des Kch-Gens hatte jedoch keine signifikanten Auswirkungen auf den Phänotyp [Bakker, E., persönliche Mitteilung].

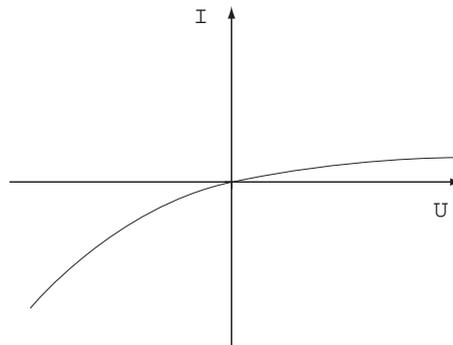


Abbildung 1.8: Typisches Strom-Spannungsdiagramm eines einwärtsrektifizierenden Kanals (z.B. MthK (*Methanobacterium thermoautotrophicum*)).

Struktur von K_{IR} -Kanälen

Die meisten Informationen über die Struktur und Funktion von Kaliumkanälen entstammen den Röntgenstrukturdaten zweier prokaryotischer Kanäle KcsA (*S. lividans*) und MthK (*M. thermoautotrophicum*), die eine Darstellung der Strukturen bis zu einer Auflösung von 2,5 Å bzw. 3,3 Å ermöglichten [Doyle u. a. 1998, Jiang u. a. 2002]. Zwei Segmente, die aufgrund ihrer Lokalisation als innere und äußere Helix bezeichnet werden, bilden das hydrophobe Grundgerüst beider Kanäle (siehe Abbildung 1.9). Zwischen ihnen befinden sich die Signatursequenzen der Porenregion, die in einer vierfachen Symmetrie den Selektivitätsfilter für Kalium bilden.

Die Pore, die von Carbonylsauerstoffatomen der Aminosäuren des Selektivitätsfilters gebildet wird, ahmt die Wasserstruktur um das hydratisierte Kaliumion nach, so dass Kalium die Pore passieren kann, ohne energetisch ungünstige Zustände durchlaufen zu müssen. Da die Hydrathülle des Natriumions aufgrund der höheren Ladungsdichte kompakter ist, trifft dies für Natrium nicht zu, wodurch es zu der hohen Selektivität für Kalium kommt [Berneche und Roux 2001]. Entlang der Porenregion befinden sich fünf Bindungsstellen S0-S4 für Kaliumionen von denen unter physiologischen Bedingungen jeweils zwei (S1, S3) oder drei (S0, S2, S4) durch Kalium besetzt sind, während sich an den unbesetzten Positionen Wassermoleküle befinden. Durch elektrostatische Abstoßungskräfte zwischen den Kaliumionen werden die Bindungskräfte zwischen Kalium und den Aminosäuren des Selektivitätsfilter minimiert, was die Grundlage für die hohen Transportraten, die bis zu 10^8 Ionen pro Sekunde betragen können, bildet [Morais-Cabral u. a. 2001].

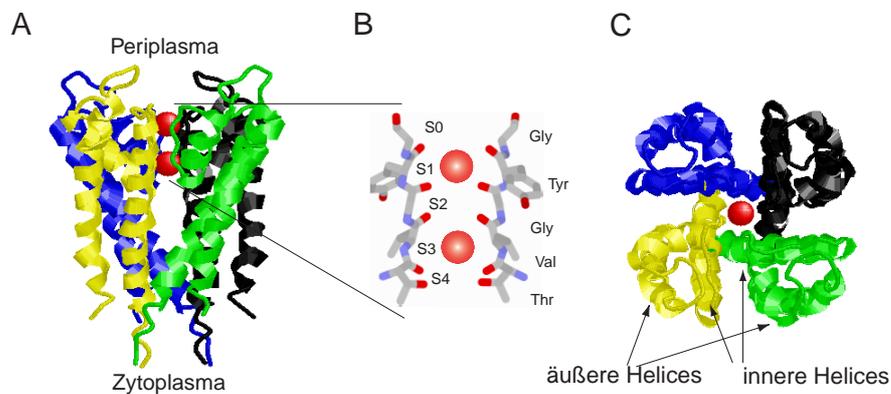


Abbildung 1.9: Domänenorganisation von KcsA. Bänderdarstellung von KcsA mit Sicht entlang der (A) Membranebene und (C) Porenachse. (B) Detaillierte Darstellung des Selektivitätsfilters jeweils zweier Untereinheiten von KcsA mit den Bindestellen S0-S4 für Kalium (siehe Text). Die Kaliumionen innerhalb des Selektivitätsfilters sind als rote Kugeln dargestellt. Die vier identischen Untereinheiten des KcsA Tetramers sind blau, schwarz, gelb bzw. grün dargestellt. Zur die Darstellung der Bändermodelle wurde das Programm Rasmol V2.6 verwendet. Zugangsnummer der Atomkoordinaten: 1BL8 (www.pdb.org).

Während die verhältnismäßig kurzen C-terminalen zytoplasmatischen Bereiche von KcsA (40-50 Aminosäuren) nur wenig Einfluss auf die Ionenleitfähigkeit des Kanals haben [Cortes u. a. 2001], besitzt MthK regulatorische RCK Domänen, die zwei Drittel des Proteins ausmachen [Jiang u. a. 2002]. Sie enthalten die konservierten Sequenzen TrkA-N und TrkA-C, die häufig bei Kaliumkanälen, Transportern und Na^+/H^+ Antiportern auftreten. Bei vielen Kanälen, u.a. auch bei denen von *M. jannaschii*, enthalten sie ein Rossman Motiv [Derst und Karschin 1998], dass in Abhängigkeit von NAD/NADH Konformationsänderungen unterliegt [Roosild u. a. 2002]. MthK selbst besitzt kein Rossman Motiv, die Kristallstruktur zeigt aber, dass pro RCK Domäne ein Kalziumion gebunden wird, was zum Öffnen der Pore führt. Eine Regulation der Kanalaktivität durch Kalzium wird daher angenommen.

Die RCK Domänen von MthK sind in einer ringförmigen Struktur mit vierfacher Symmetrie um die Porenachse lokalisiert. Je vier der insgesamt acht RCK Domänen werden von den C-Termini der MthK Untereinheiten gebildet (siehe Abbildung 1.10). Bei den übrigen vier RCK Domänen handelt es um lösliche Proteine, die über eines internes Startcodon (M107) des MthK-Gens exprimiert werden. Sie bilden ebenfalls eine ringförmige, tetramere Struktur, so dass die zytoplasmatische Domänenorganisation von MthK der oktameren Stöchiometrie der regulatorischen Domänen der K_V -Kanäle ($T1_4$ - β_4) ähnelt.

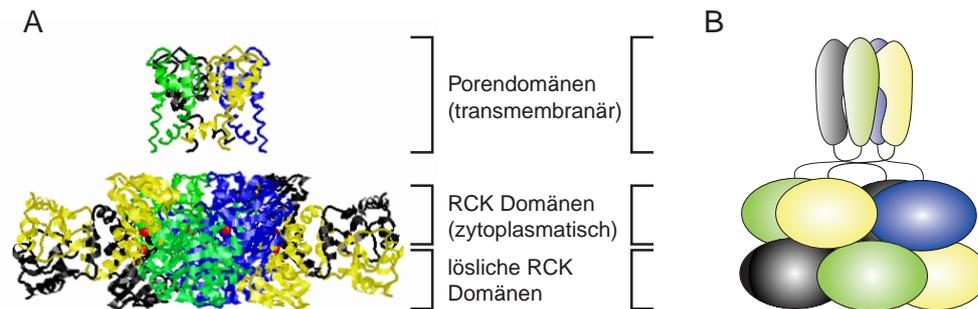


Abbildung 1.10: Domänenorganisation von MthK. (A) Bänderdarstellung von MthK basierend auf röntgenkristallographischen Koordinaten. Die Darstellung zeigt MthK mit Blick entlang der Membranebene. Kalziumatome sind als rote Kugeln dargestellt. (B) Schematische Darstellung der Domänen von MthK. Die Darstellung des Bändermodells erfolgte mit Rasmol V2.6. Zugangsnummer der Atomkoordinaten: 1LNQ (www.pdb.org).

1.5 *Methanococcus jannaschii*

M. jannaschii wurde 1982 im Südostpazifik aus zwei Kilometern Tiefe vom Rand einer hydrothermalen Quelle isoliert. Der Organismus gehört zum Reich der Archaeen und kann autotroph, durch Methanogenese und die Fixierung von Stickstoff, leben. Zudem ist *M. jannaschii* obligat anaerob und hyperthermophil, d.h. es kann bei Temperaturen oberhalb von 85° C leben.

Die genetische Information von *M. jannaschii* konnte 1996 vollständig aufgeklärt werden, womit erstmals das Genom eines Archaeobakterium sequenziert worden war [Bult u. a. 1996]. Es besteht aus einem 1,6 Megabasen großen Chromosom, zwei extrachromosomalen Elementen (ECE) von 58 und 16 Kilobasen und enthält 1738 offene Leserahmen. Nur bei 44 % der Gene konnte eine Übereinstimmung mit bekannten Sequenzen gefunden werden, wodurch die evolutionsgeschichtliche Distanz zu den Bakterien deutlich wird. Ähnlichkeiten bestehen hauptsächlich auf der Ebene des Intermediärstoffwechsels, was darauf schließen läßt, das Bakterien und Archaeen zentrale biochemische Stoffwechselwege von einem gemeinsamen Vorfahren übernommen haben. Die DNA Transkription und die Organisation des Genoms ähnelt der der Eukaryoten, was z.B. das Vorhandensein von Histonen belegt [Morell 1996].

1.6 *M. jannaschii* als Modellorganismus eines marinen Lebewesens

Das Meer als Ursprungsort des Lebens stellt in biologischer Hinsicht eine geeignete Umgebung für Organismen dar. Die Fähigkeit Salzwasser zu tolerieren ist jedoch vielen im Süßwasser und an Land lebenden Organismen im Laufe der Evolution verloren gegangen. Dies stellt insbesondere bei höheren Kulturpflanzen ein Problem dar, da die durch Bewässerung von Böden herbeigeführte Versalzung immer größere Gebiete für eine wirtschaftliche Nutzung unbrauchbar werden lässt [Zhu 2001].

Ein Verständnis der komplexen an der Ionenhomöostase beteiligten Transportvorgänge kann nur dann erfolgen, wenn das Zusammenspiel der daran beteiligten Transporter und Ionenkanäle bekannt ist. Der am besten verstandene Organismus in dieser Hinsicht ist das Darmbakterium *E. coli*, welches jedoch nicht an die Bedingungen von Salzwater adaptiert ist. Mit *M. jannaschii* stand erstmals das Genom eines marinen Lebewesens zu Verfügung, so dass eine umfangreiche Charakterisierung der an der Ionenhomöostase beteiligten Proteine möglich war.

Die initiale Sequenzanalyse des Genoms von *M. jannaschii* hat gezeigt, dass das Archaeobakterium drei putative Kaliumkanalgene, Mj0138.1, Mj0139 und Mj1357 sowie ein Na^+/H^+ Antiporter gen, Mj1275, enthält [Bult u. a. 1996, Derst und Karschin 1998]. Kürzlich konnten zwei weitere putative Na^+/H^+ Antiportergene, Mj0057 und Mj1521, identifiziert werden [Hellmer u. a. 2002]. Diese Arbeit beschreibt die computergestützte, auf Homologieuntersuchungen basierende Identifizierung funktionell wichtiger Aminosäuren genannter Transporter und Kanäle sowie eine Vorhersage ihrer Sekundärstruktur.

Die Gene Mj0138.1, Mj0139, Mj1357, Mj0057, Mj1521 und Mj1275 wurden kloniert und die entsprechenden Genprodukte heterolog in *E. coli* exprimiert. Für die zellphysiologische Charakterisierung der Kaliumkanalaktivitäten wurde die kaliumabhängige *E. coli* Mutante LB2003 eingesetzt, deren zelleigene Kaliumtransportsysteme Trk, Kdp und Kup durch Mutation inaktiviert sind [Stumpe und Bakker 1997]. In einem Komplementationstestsystem wurden dabei die zum Wachstum benötigten Kaliumkonzentrationen ermittelt und die Sensitivität der Kanäle bezüglich der Kaliumkanalblocker BaCl, TEA und CsCl ermittelt.

Die Aktivität der putativen Na^+/H^+ Antiporter wurde mit Hilfe eines auf Membranvesikeln basierenden Verfahrens fluorimetrisch bestimmt, wobei für die Präparation der Membranfraktionen der defiziente *E. coli* Stamm Frag115 verwendet wurde, dessen zelleigene Na^+/H^+ Antiportergene *nhaA* und *nhaB* deletiert sind. Die Bestimmung der *in vivo* Aktivität wurde unter Verwendung der Mutante EP432 durchgeführt, deren Natriumsensitivität durch die heterologe Expression zahlreicher Na^+/H^+ Antiporter komplementiert werden konnte [Strausak u. a. 1993, Dzioba u. a. 2002].

Mit Hilfe der sequenzgerichteten Mutagenese wurden konservierte Aspartat-, Glutamat- und Argininreste sowie alle Histidinreste des Mj0057 Genproduktes MjNhaP1 ausgetauscht. Die mutierten Proteine wurden ebenfalls in Frag114 Zellen exprimiert und die Na⁺/H⁺ Antiporteraktivität der Mutanten fluorimetrisch quantifiziert.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Molekularbiologie

2.1.1 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Um Plasmide aus *E. coli* zu isolieren, wurde ein modifiziertes Protokoll der Firma Promega verwendet. Dazu wurden 1,5-5 ml einer LB-Medium Übernachtskultur 30 s bei $10.000\times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 200 μl Puffer R (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNaseA (Roth), pH 7,5) resuspendiert. 200 μl Puffer L (0,2 M NaOH, 0,1% SDS) wurden zugegeben und das Reaktionsgefäß dreimal invertiert. Die Lösung wurde mit 200 μl Puffer N (1,32 M Kaliumacetat, pH 4,8) neutralisiert und nach dreimaligem Invertieren 10 min bei $13.000\times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in 600 μl Isopropanol überführt, gemischt und 10 min bei $13.000\times g$ zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden 600 μl 80 %-iger Ethanol zugegeben und für 2 min bei $13.000\times g$ sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die DNA bei 50 °C getrocknet und anschließend in 30-100 μl Wasser aufgenommen.

2.1.2 Polymerase Kettenreaktion

Gene wurden mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) [Mullis u. a. 1986] amplifiziert. Für Klonierungen wurde SAWADY Pwo Polymerase (Peqlab) verwendet, während für diagnostische Verfahren BioTherm™ *Taq* DNA Polymerase (Genecraft) eingesetzt wurde. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 100 μl , einer Primerkonzentration von je 0,6 pmol μl^{-1} und 1-2,5 U *Taq* DNA Polymerase entsprechend den Angaben der Hersteller durchgeführt. Pro Reaktionsansatz

betrug dabei die eingesetzte Menge genomischer DNA¹ von *Methanococcus jannaschii* 600 ng. Die PCR Reaktion wurde in einen Personal Cycler™ der Firma Biometra® durchgeführt. Falls nicht anders erwähnt, wurde dafür das in Tabelle A.1 aufgeführte PCR Programm verwendet.

2.1.3 DNA Manipulation

Für Restriktionsanalysen und Klonierungen wurden Enzyme und Puffer der Firma New England Biolabs® (NEB) verwendet. Pro μg Plasmid-DNA wurden 5 U der jeweiligen Restriktionsendonuklease in einem Volumen von 10 μl eingesetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert.

Ligationen wurden mit 400 U T4 DNA Ligase (NEB) in einem Volumen von 20 μl entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die eingesetzte Vektormenge betrug 10-20 fmol, während das Vektor-Insertverhältnis zwischen 1:1 und 1:6 (fmol Vektor:fmol Insert) variiert wurde.

2.1.4 Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Trennung von DNA Fragmenten erfolgte entsprechend der Molmasse über 1-2 %-ige TBE-Agarosegele mit einer Ethidiumbromidkonzentration von 0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ bei einer Spannung von 14 V cm^{-1} [Sambrook u. a. 1989]. Der für die Elektrophorese verwendete TBE-Puffer enthielt 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,3. Für das Laden der Proben wurden diese mit Puffer P (0,25 % Bromphenol Blau, 0,25% Xylen Cyanol, 30% Glycerin) in einem Verhältnis von 10:1 (v(Probe):v(Puffer)) versetzt.

2.1.5 Reinigung von DNA aus Agarosegelen und PCR Reaktionen

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen und die Reinigung aus PCR-Reaktionen wurden Verfahren der Firma Genomed (*JETQUICK Gel Extraction Spin Kit*, bzw. *JETQUICK PCR Purification Spin Kit*) verwendet und entsprechend den Protokollen des Herstellers verfahren.

2.1.6 Klonierungsvektor pCR®4-TOPO

PCR Produkte wurden für die Sequenzierung, bzw. die nachfolgende Subklonierung in den Vektor pCR®4-TOPO kloniert. Der Vektor verfügt über das Ampicillinresistenzgen *bla* und das Kanamycinresistenzgen *neo*. Bindestellen für T3, T7 und M13 Primer ermöglichen eine Sequenzierung

¹Freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. Carsten Zeilinger zur Verfügung gestellt

der klonierten Gene. Durch das letale *ccdB* Gen [Bernard und Couturier 1992, Bernard u. a. 1994] wird die Klonierung von religiertem Vektor unterdrückt (siehe Abbildung 2.1 A).

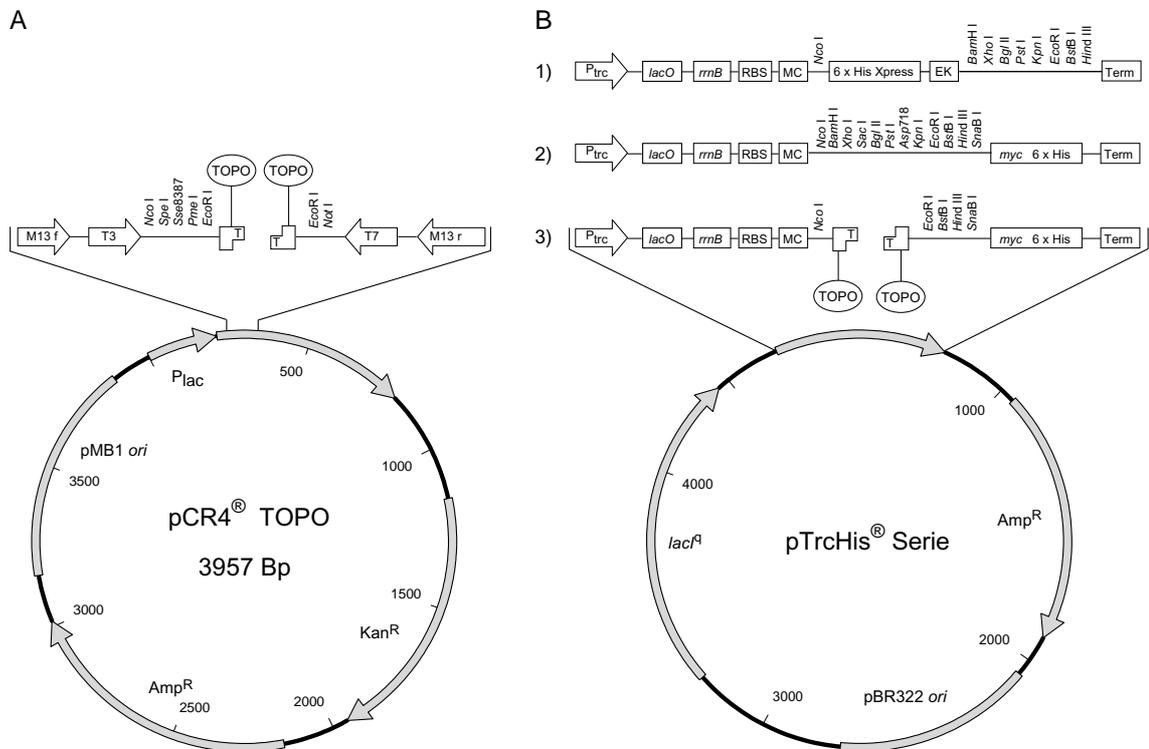


Abbildung 2.1: A: Klonierungsvektor pCR[®]4-TOPO. B: Expressionsvektoren der pTrcHis[®] Serie. 1) pTrcHis[®], 4404 Basenpaare (Bp), 2) pTrcHis2B[®], 4404 Bp, 3) pTrcHis2 TOPO[®], 4381 Bp.

2.1.7 Expressionsvektoren der pTrcHis[®] Serie

Für die Expression von Proteinen in *E. coli* wurden Expressionsvektoren der pTrcHis[®] Serie verwendet (siehe Abbildung 2.1 B). Die Expression steht unter der Kontrolle des Hybridpromotors *trc* (P_{trc}) [Mulligan u. a. 1985, Brosius u. a. 1985] und wird durch den *lac*-Operator reguliert (*lacO*) [Jacob und Monod 1961]. *In cis* befindet sich eine mutierte Form des *lac*-Repressors (*lacI^q*) mit erhöhter Affinität zum Repressor [Müller-Hill u. a. 1968]. Die vorzeitige Termination der Transkription wird durch die *rrmB* Antiterminationssequenz reduziert [Li u. a. 1984], während durch ein Minicistron (MC) eine Erhöhung der Translationseffizienz erzielt wird [Schoner u. a. 1986]. Eine ribosomale Bindestelle (RBS) ermöglicht Ribosomen die Bindung an die mRNA [Olins u. a. 1988] und *rrmBT*₁ und T₂ Sequenzen (Term) gewährleisten die Termination (siehe Abbildung 2.1).

Der Vektor pTrcHis2 TOPO[®] liegt in linearisierter Form vor. An den freien Enden ist das Enzym Topoisomerase I (TOPO) kovalent gebunden, so dass PCR-Produkte direkt in den Vektor kloniert werden können.

In pTrcHis2 TOPO[®] und pTrcHis2B[®] klonierte Gene tragen am 3'-Ende die Sequenz eines Fusionsproteins mit einer Molmasse von 3,7 kD. Das Fusionsprotein beinhaltet eine *myc*-Epitopsequenz für die immunchemische Detektion und eine Histidinhexamersequenz (6×His), die eine Affinitätschromatographische Reinigung ermöglicht.

Gene die in pTrcHisB[®] kloniert werden, tragen am 5'-Ende die Sequenz eines Fusionsproteins mit einer Molmasse von 3,6 kD. Es enthält eine Xpress[™]-Epitopsequenz für die immunchemischen Detektion exprimierter Proteine, eine Histidinhexamersequenz sowie eine Enterokinase Schnittstelle, die das Entfernen des Fusionsproteins durch Enterokinase erlaubt.

2.1.8 Vektorkonstrukte

Für die heterologe Expression in *E. coli* wurden die putativen Kaliumkanalgene Mj0138.1, und Mj0139, sowie die putativen Na⁺/H⁺ Antiportergene Mj0057, Mj1275 und Mj1521 in den Vektor pTrcHis2 TOPO[®] kloniert. Alle anderen Konstrukte wurden erzeugt, indem die Gene zunächst in den Vektor pCR4-TOPO[®] kloniert und nachfolgend in pTrcHisB[®] oder pTrcHis2B[®] subkloniert wurden. Die Integrität aller erzeugten Plasmidkonstrukte wurden mit Hilfe der DNA-Sequenzierung (Agowa) überprüft. Eine Übersicht der Gene und deren Funktion zeigt Tabelle A.2.

Das Mj1357 Gen wurde in die Vektoren pTrcHisB[®] und pTrcHis2B[®] kloniert. Desweiteren wurde eine verkürzte Form des Gens erzeugt, die 303 Nukleotide des 5'-Endes umfasst und in den Vektor pTrcHisB kloniert wurde. Für die Subklonierung der Mj1357 Konstrukte in diese Vektoren wurden *Bam*H I und *Hind* III Schnittstellen verwendet, die mit Hilfe von Primern (MWG-Biotech) generiert wurden.

Tabelle A.3 zeigt die erzeugten Plasmide sowie die exprimierten Proteine, während in Tabelle A.4 die verwendeten Primer mit den jeweiligen Restriktionschnittstellen aufgeführt sind. Mit A bezeichnete Primer sind komplementär zum 5'-Ende des jeweiligen Gens, während die mit B bezeichneten Primer zum 3'-Ende komplementär sind.

2.1.9 Klonierung nach dem TOPO Verfahren

Um Gene in die Vektoren pCR[®]4-TOPO und pTrcHis2 TOPO[®] zu klonieren, wurden diese mit SAWADY Pwo Polymerase amplifiziert (Kapitel 2.1.2) und gereinigt (Kapitel 2.1.5). Die für Klonierungen nach dem TOPO Verfahren notwendige Adenylierung der PCR Produkte wurde mit BioTherm[™] *Taq* DNA Polymerase durchgeführt. Hierzu wurden 40 µl PCR Produkt mit 5 µl BioTherm[™] Puffer, 5 µl dNTP-Mix (2 mM/ Nukleotid) und 1 U BioTherm[™] *Taq* DNA Polymerase

versetzt und 30 min bei 72 °C inkubiert. Das adenylierte PCR Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, gereinigt (Kapitel 2.1.5) und auf eine Konzentration von 5 ng μl^{-1} eingestellt. 2 μl wurden nachfolgend mit 0,5 μl TOPO Vektor gemischt und 5 min bei 23 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in 50 μl kompetente Zellen (One Shot® TOP10, Invitrogen) überführt, 15 min auf Eis inkubiert und eine Hitzepulstransformation durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.4).

2.1.10 Sequenzspezifische Mutagenese

Die sequenzspezifische Mutagenese wurde mit einer auf der PCR basierenden Methode in modifizierter Form durchgeführt [Ho u. a. 1989]. Anstelle von *Taq* Polymerase wurde SAWADY PWO-Polymerase für die Erzeugung überlappender DNA Fragmente und deren nachfolgender Fusion verwendet. Die Fusionsprodukte wurden adenyliert und in den Vektor pTrcHis2 TOPO® kloniert². Mit Hilfe der DNA Sequenzierung (Agowa) wurden die eingeführten Mutationen bestätigt. Die für die Mutagenese verwendeten Primer (MWG-Biotech) sind in Tabelle A.5 aufgeführt. Mit (A) bezeichnete Primer wurden in Verbindung mit dem forwärts-Primer 5'-ATG GAA CTT ATG ATG GCT ATT GGT TAC-3' eingesetzt, um das 5'-Fragment des Konstruktes zu erzeugen. Für die Synthese des 3'-Fragments wurden die mit (B) gekennzeichneten Primer in Kombination mit dem rückwärts-Primer 5'-ATG GTG GGA TTC TTC TTT ATA CTT TG-3' verwendet.

2.2 Mikrobiologie

2.2.1 Nährmedien für die Bakterienzellkultur

Die Kultivierung von Bakterien wurde in Flüssignährmedien durchgeführt, deren Zusammensetzungen in Tabelle A.6 aufgeführt sind. LB, LBK und KML Medium wurden zur Selektion von Einzelkolonien und für Komplementationstests auch als Festnährmedien mit einer Agarkonzentration von 1,5% verwendet und werden nachfolgend als LB-Agar, LBK-Agar und KML-Agar bezeichnet. Zur Selektion antibiotikaresistenter Bakterien wurden den Nährmedien abhängig vom verwendeten Stamm die in Tabelle A.7 aufgeführten Antibiotika zugesetzt. Die Bezeichnung der antibiotikahaltigen Medien setzt sich aus den Mediennamen und den Abkürzungen für die jeweiligen Antibiotika, welche in Klammern gesetzt sind, zusammen. Wurde beispielsweise LB

²Die Konstrukte D156A, H333R, R320D und R320H wurden freundlicherweise von Herrn Dipl. Biol. Andreas Teubner zur Verfügung gestellt.

Flüssigmedium Kanamycin und Chloramphenicol zugesetzt, so wurde das Medium mit LB(Kan, Cam) bezeichnet.

2.2.2 Bakterienstämme

In Abhängigkeit der jeweiligen Fragestellung wurden die *Escherichia coli* Stämme TOP10 (Invitrogen), XL1-Blue (Stratagene), EP432³ [Pinner u. a. 1993], Frag114⁴ und LB2003 [Stumpe und Bakker 1997]⁵ verwendet (siehe Tabelle 2.1).

Die Stämme TOP10 und XL1-Blue eignen sich aufgrund der Deletionen von Endonuklease A1 und Rekombinase A1 insbesondere für Klonierungen, Plasmidpräparationen und die stabile Replikation von Plasmiden. Sofern keine Probleme bezüglich der Proteindegradation auftraten, wurden die Stämme ebenfalls für die Expression rekombinanter Proteine eingesetzt.

Der Stamm EP432 zeichnet sich durch die Deletion der Na⁺/H⁺ Antiportergene *nhaA* und *nhaB* aus. Es wird jedoch noch eine dritte, in der Literatur nicht beschriebene, Mutation diskutiert, die sich möglicherweise im *chaA* Gen befindet (Eppstein, W., persönliche Mitteilung). Sie würde den extrem salzsensitiven Phänotyp von EP432 (>20 mM NaCl, pH 8,5) erklären, der dem der Dreifachmutante TO114 [Ohyama u. a. 1994] entspricht. Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich EP432 für Komplementationstudien, was durch die Klonierung von Na⁺/H⁺ Antiportern mittels dieses Verfahrens gezeigt werden konnte [Pinner u. a. 1992, Ivey u. a. 1993, Ivey u. a. 1991].

Die Gene *nhaA* und *nhaB* sind bei dem Stamm Frag114 ebenfalls deletiert. Hier ist das *chaA* Gen jedoch nicht betroffen, so dass der Stamm bis zu 400 mM NaCl (pH 8,0) toleriert. Da evertierte Vesikel aus Frag114 keine Na⁺ Ströme aufweisen, wenn der unspezifische K⁺/H⁺ Antiporter durch 5 mM KCl gesättigt ist, eignet sich dieser Stamm aufgrund seiner flexibleren Anzuchtbedingungen besser als EP432 für die fluoreszenzgestützte Messung von Na⁺/H⁺ Antiportern.

Der *E. coli* Stamm LB2003 zeichnet sich durch eine Kaliumaufnahmedefizienz aus, die durch Mutationen in den Kaliumaufnahmesystemen Trk, Kdp und Kup bedingt ist (siehe Kapitel 1.3). Infolge dessen benötigen LB2003 Zellen 25 mM KCl für halbmaximales Wachstum [Epstein und Kim 1971]. Es konnte für die Kaliumaufnahmesysteme KAT1, HKT1 und KUP1 (*A. thaliana*) gezeigt werden, dass sie die Kaliumaufnahmedefizienz von LB2003 Zellen komplementieren [Uozumi 2001, Uozumi u. a. 1998], so dass dieser Stamm zum Funktionsnachweis von Kaliumkanälen und Kaliumtransportern geeignet ist.

³Freundlicherweise von Prof. Dr. E. Padan zur Verfügung gestellt

⁴Freundlicherweise von Prof. Dr. W. Epstein zur Verfügung gestellt

⁵Freundlicherweise von Prof. Dr. E. P. Bakker zur Verfügung gestellt

Stamm	Genotyp
X11-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 susE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q</i> ZΔM15 Tn10 (Tet ^R)]
TOP10	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 nupG</i>
EP432	<i>melBLid ΔnhaA::Kan ΔnhaB::Cam ΔlacZY thr1</i>
Frag114	<i>ΔnhaA::Kan ΔnhaB::Cam</i>
LB2003	F ⁻ <i>kup1 ΔkdpABC5 rpsL metE thi rha gal ΔtrkA</i>

Tabelle 2.1: Genotypen der eingesetzten Bakterienstämme

2.2.3 Elektrokompente Bakterien und Elektrotransformation

Elektrokompente Bakterien wurden nach einem beschriebenen Verfahren in modifizierter Form präpariert [Inoue u. a. 1990]. Dazu wurde eine Einzelkolonie *E. coli* Zellen von SOB Festnährmedium in 1 l SOB Flüssignährmedium überführt und bei 37 °C und 400 U min⁻¹ bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Die Zellen wurden dann 15 min auf Eis bei 200 U min⁻¹ geschüttelt und durch 5-malige Sedimentation bei 4 °C und 3.500×g für 10 min mit nachfolgender Resuspension in je 200 ml eisgekühltem, demineralisiertem Wasser gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Sediment in 2 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin aufgenommen und 40 μl Aliquots in flüssigem N₂ eingefroren und bei -86 °C gelagert.

Für die Transformation wurden 40 μl Bakterien auf Eis getaut und mit 0,5-1 μl Ligationsansatz, bzw. Plasmid-DNA versetzt. Die Bakterien wurden in eisgekühlte Elektroporationsküvetten (Pep-lab) mit einem Elektrodenabstand von 0,1 cm überführt und bei 12,5 kV cm⁻¹ und einer Zeitkonstante von 4,5-5,0 ms transformiert (Elektroporator 2510, Eppendorf). Nach dem Elektropuls wurden 500 μl SOC zugegeben und die Zellen für 1 h horizontal bei 37 °C und 400 U min⁻¹ geschüttelt. 100 μl des Ansatzes wurden dann auf Selektionsnährmedien (siehe Kapitel 2.2.1) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Transformierte Bakterien wurden mit dem Namen des Bakterienstammes und dem Namen des jeweiligen Plasmids in Klammern bezeichnet. Ist beispielsweise der *E. coli* Stamm TOP10 mit dem Plasmid pMj0057 transformiert worden, so wurde die Zelllinie mit TOP10(pMj0057) benannt.

2.2.4 Chemisch kompetente Bakterien und Hitzepulstransformation

Chemisch kompetente Bakterien wurden nach einer beschriebenen Methode in modifizierter Form präpariert [Inoue u. a. 1990]. Dazu wurde eine Einzelkolonie TOP10 oder X11-Blue Zellen von

SOB Festnährmedien in 250 ml SOB Flüssignährmedien überführt und bei 20 °C und 400 U min⁻¹ bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert und dann bei 4 °C und 3.500×g für 10 min sedimentiert. Das Sediment wurde in 80 ml eisgekühltem Puffer T (10 mM Pipes/KOH, 55 mM MnCl, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, pH 6,7) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Sedimentation wurde nochmals durchgeführt und das Sediment in 20 ml TB resuspendiert. Nach Zugabe von 1,4 ml DMSO wurden die Zellen in 200 µl Aliquots in flüssigem N₂ eingefroren und bei -86 °C gelagert.

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 1-10 µl Ligationsansatz gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 30 s bei 42 °C inkubiert, mit 500 µl SOC versetzt und für 1 h horizontal bei 37 °C und 400 U min⁻¹ geschüttelt. 250 µl des Ansatzes wurden dann auf LB-Agar(Amp) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.5 Komplementation des salzsensitiven Phänotyps von EP432 Zellen

Die Komplementation stellt im Gegensatz zur fluorimetrischen *in vitro* Messung ein *in vivo* Verfahren zum Nachweis von Na⁺/H⁺ Antiporteraktivität dar. Dabei wird der salzsensitive Phänotyp der *E. coli* Mutante EP432 durch einen plasmidcodierten Na⁺/H⁺ Antiporter komplementiert. Um die Komplementationsfähigkeit von MjNhaP1 zu untersuchen, wurden EP432 Zellen mit pMj0057 transformiert, während als Negativkontrolle das Plasmid pTrcHis2B diente. Nach Anzucht in LBK Medium bis zu einer (OD₆₀₀) von 1, wurden die Zellen 1.000-fach in LBN Medium verdünnt, erneut über Nacht angezogen und die Komplementationsfähigkeit anhand der Änderung der OD₆₀₀ beurteilt.

2.2.6 Komplementation des kaliumabhängigen Phänotyps von LB2003 Zellen

LB2003(pMj0138.1), LB2003(pMj0139), LB(pMj1357) und LB2003(pTrcHis2B) Zellen wurden aerob bei 37 °C in KML Medium (46 mM Na₂HPO₄, 23 mM NaH₂PO₄, 8 mM (NH₄)SO₄), 1 mM Zitronensäure, 0,4 mM MgSO₄, 6 µM FeSO₄, 3 nM Thiamin-HCl, 10 mM Glukose, 0,02-100 mM KCl, 50 µg ml⁻¹ Ampicillin, pH 7,0) kultiviert. Die Kaliumkonzentration betrug dabei 100 mM für LB2003(pMj1357) und LB2003(pTrcHis2B) sowie 1 mM für LB2003(pMj0138.1) und LB2003(pMj0139). Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 wurden je 5 ml der Zellsuspensionen 10 min bei 3.500×g zentrifugiert und die Zellen in KML Medium (20 µM KCl) resuspendiert. Das Waschen wurde zweimal wiederholt und die Zellen in 5 ml KML Medium (20 µM KCl) aufgenommen. Je 50 µl dieser Suspensionen wurden auf KML Festnährmedien mit Konzentrationen von 0,1 mM, 1 mM, 10 mM und 100 mM KCl transferiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Je

10 μl dieser Kulturen wurden in 10 ml KML Flüssignährmedien überführt, die ebenfalls 0,1 mM, 1 mM, 10 mM und 100 mM KCl enthielten. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 350 U min^{-1} geschüttelt und die OD_{600} über einen Zeitraum von 88 h gemessen.

2.3 Biochemie

2.3.1 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde nach einem modifizierten Protokoll der beschriebenen Methode durchgeführt [Laemmli 1970]. Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle A.8 aufgeführt. Elektrophoresen wurden mit Gelen der Abmessung 85×90×1 mm bei 40 mA durchgeführt. Die Visualisierung der Proteine geschah mit Hilfe eines auf Coomassie®G-250 basierenden Verfahrens der Firma Invitrogen (*SimplyBlue™ Safe Stain*) entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.3.2 Elektrotransfer

Um Proteine immunchemisch nachzuweisen, wurden diese über SDS-PAGE aufgetrennt und nachfolgend mit einer *Fastblot* Apparatur (Biometra®) bei 4 mA cm^{-2} auf *Whatman* Nitrozellulosemembranen (0,2 μm Porengröße, Biometra®) transferiert. Der Elektrophoresepuffer ist in Tabelle A.8 aufgeführt.

2.3.3 Immunchemischer Nachweis von Fusionsproteinen

Proteine, die unter Verwendung der pTrcHis Vektorserie exprimiert werden, tragen C- oder N-terminal Fusionspeptide, die mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden können. Bei pTrcHis2TOPO® und pTrcHis2B® handelt es sich um ein *myc*-Epitop mit der Aminosäuresequenz (E-Q-K-L-I-S-E-E-D-L) [Evan u. a. 1985]. Dieses läßt sich mit Hilfe eines monoklonalen Anti-*myc* Antikörpers (Invitrogen™), welcher kovalent an alkalische Phosphatase gekoppelt ist, nachweisen. Das Fusionspeptid von pTrcHisB beinhaltet die Aminosäuresequenz (D-L-Y-D-D-D-K), die als Anti-Xpress™-Epitop bezeichnet wird und sich mit Hilfe eines monoklonalen Anti-Xpress™ Antikörpers (Invitrogen) detektieren lässt.

Um das *myc*-Fusionsprotein zu identifizieren, wurden Nitrozellulosemembranen nach Elektrotransfer für 60 min in PBSM-Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4 , 1,4 mM KH_2PO_4 , 5 % Milchpulver, pH 7,3) inkubiert. Durch dreimaliges Waschen der Membranen für

5 min in 20 ml TBST-Puffer (20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0,1 % Tween, pH 7,5) wurden Phosphationen, welche die Detektion beeinträchtigen, entfernt. Die Bindung des Anti-*myc* Antikörpers erfolgte in TBSTM-Puffer (20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0,1 % Tween, 1 % Milchpulver, pH 7,5) für 60 min bei einer Antikörperverdünnung von 1:10.000. Nach dreimaligem Waschen in 20 ml TBST-Puffer für 5 min erfolgte die Detektion in 10 ml AAP-Puffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 40 μ M BCIP, 40 μ M NBT, pH 9,5).

Das Xpress™ Epitop wurde nachgewiesen, indem Nitrozellulosemembranen nach dem Elektrottransfer für 60 min in 20 ml TBSB-Puffer (20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 3 % Rindersealbumin Fraktion V (BSA), pH 7,5) geschüttelt wurden. Die Bindung des primären Anti-Xpress™ Antikörpers erfolgte durch 60 minütige Inkubation in 10 ml TBSB-Puffer bei einer Antikörperverdünnung von 1:10.000. Nach dreimaligem Waschen der Membran für 5 min in je 10 ml TBSB-Puffer erfolgte die Bindung des sekundären Antikörpers (anti Maus IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase, Sigma) in 10 ml TBSB-Puffer für 60 min. Das Waschen der Membran wurde wiederholt und die Detektion in 10 ml AAP-Puffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 40 μ M BCIP, 40 μ M NBT, pH 9,5) durchgeführt.

2.3.4 Präparation evertierter Vesikel

Evertierte Vesikel wurden aus dem *E. coli* Stamm Frag144 nach dem modifizierten Protokoll einer beschriebenen Methode isoliert [Rosen 1986]. Die Zellen sind über Nacht bei 30 °C und 300 U min⁻¹ in 600 ml LBK Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen worden. Nach Zugabe von 1 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) wurden die Zellen für weitere 60 min bei 30 °C geschüttelt und dann bei 3.500×g für 10 min zentrifugiert. Die Sedimente wurden in 5 ml TCDS-Puffer (10 mM Tris-HCl, 140 mM Cholinchlorid, 0,5 mM Dithiothreitol (DTT), 250 mM Saccharose, pH 7,5) resuspendiert und die Zellen durch zwei Zyklen in einer eisgekühlten Aufschlusszelle (*French® Press Cell*, Aminco) bei 0,4 MPa lysiert. Das Lysat wurde 10 min bei 4 °C und 3500×g zentrifugiert, das Sediment verworfen und der Überstand 10 min bei 4 °C und 200.000×g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 2 ml TCDS-Puffer resuspendiert und in flüssigem N₂ gelagert.

2.3.5 Kultivierung und Zellernte von *E. coli*

Eine Einzelkolonie TOP10 Zellen oder ein gefrorener Glycerinstock wurden in 20 ml LB(Amp) überführt und 8 h bei 37 °C und 400 U min⁻¹ geschüttelt. Daraufhin wurde eine Vorkultur von 1-5 ml in 1,5 l TB(Amp) transferiert und über Nacht im Biostat M (B. Braun) unter Pressluftzufuhr bei 30 °C und 400 U min⁻¹ kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG und fortgesetzter Kultivierung für 4 h. Nachfolgend wurden die Zellen 10 min

Detergenz	Ladung	CMC [mM]	M_r [Da]	Aggregations- nummer	M_r der Mizelle [Da]
N-Lauroylsarkosin	anionisch	-	271,4	2	900
CHAPS	zwitterionisch	4	614,9	10	6150
n-Dodecylmaltosid	nichtionisch	0,18	510,6	0,1-0,6	51-306
Nonidet [®] P-40	nichtionisch	0,25	-	100-155	-

Tabelle 2.2: Detergenzien und deren physikochemische Eigenschaften

bei $3.500\times g$ und $4\text{ }^\circ\text{C}$ sedimentiert, in Puffer AA (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 20 mM Na_2HPO_4 , 5 % Glycerin, pH 8,0) bei einer Konzentration von 250 g l^{-1} resuspendiert und bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.3.6 Membranpräparation aus *E. coli*

E. coli Zellen (Kapitel 2.3.5) wurden aufgetaut und durch zwei Zyklen in einer eisgekühlten Aufschlusszelle (*French[®] Press Cell*, Aminco) bei 1,5 MPa lysiert. Das Lysat wurde 10 min bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und $10.000\times g$ zentrifugiert, das Sediment verworfen und der Überstand 30 min bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und $100.000\times g$ zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment, welches die Membranfraktion darstellt, in Puffer A (50 mM KP_i , 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol-HCl, 20 % Glycerin, pH 7,6) mit einer Konzentration von 100 mg ml^{-1} resuspendiert und bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.3.7 Solubilisierung von Membranproteinen

Vor der affinitätschromatographischen Reinigung von Membranproteinen war es notwendig, diese aus der Lipidumgebung der Zellmembranen herauszulösen und in die wässrige Phase zu überführen. Dies wurde durch eine Reihe von Detergenzien erzielt, die sich u.a. hinsichtlich ihrer Solubilisierungseigenschaften, ihrer Ladung und der kritischen Mizellenkonzentration (CMC) unterscheiden [Tanford und Reynolds 1976, Lichtenberg u. a. 1983, Helenius u. a. 1979]. Die in dieser Arbeit verwendeten Detergenzien sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

2.3.8 Affinitätschromatographie

Um Fusionsproteine affinitätschromatographisch zu reinigen, wurde eine Matrix (*Chelating Sapharose Fast Flow*) der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Für die Beladung der

Matrix mit Ni^{2+} , bzw. Co^{2+} Ionen wurden 500 μl Matrix mit 5 ml Wasser gewaschen und nachfolgend mit 2 ml 0,2 M NiSO_4 oder 0,1 M CoCl_2 versetzt. Die Matrix wurde erneut mit 5 ml Wasser gewaschen, mit Puffer A äquilibriert und anschließend für die Affinitätschromatographie verwendet.

2.3.9 Rekonstitution von Na^+/H^+ Antiportern

In einem Volumen von 45 ml Puffer D (50 mM KP_i , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol-HCl, 20 % Glycerin, 1 % DDM, pH 7,6) wurden 150 mg *E. coli* Membranen solubilisiert, mit 100 μl Affinitätsmatrix versetzt und 60 min auf Eis geschüttelt. Die Matrix wurde 3 min bei 4 °C und $500\times g$ sedimentiert und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das Waschen der Matrix erfolgte durch viermaliges Inkubieren mit je 1 ml Fraktionen Puffer E (50 mM KP_i , 300 mM NaCl, 40 mM Imidazol-HCl, 20 % Glycerin, 1 % CHAPS, pH 7,6) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Eluiert wurden die Proteine durch zweimalige Inkubation der Matrix in 500 μl Puffer F (50 mM KP_i , 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol-HCl, 20 % Glycerin, 1 % CHAPS, pH 7,6). Beide Fraktionen wurden vereinigt, mit 8 mg Phosphatidylcholin Typ IV-S versetzt und bei Raumtemperatur geschüttelt bis das Phosphatidylcholin solubilisiert war. Die Lösung wurde in eine Dialysezelle überführt und gegen 1 l Puffer G (10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 140 mM NH_4Cl , pH 7,5) bei 4 °C über Nacht dialysiert. Der Dialysepuffer wurde anschließend erneuert und die Dialyse für 4 h fortgesetzt. Das Dialysat wurde 15 min bei 4 °C und $200.000\times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 200 μl Puffer G aufgenommen. Transportmessungen sind mit 20 μl Aliquots dieser Suspension durchgeführt worden.

2.4 Biophysik

2.4.1 Fluoreszenzmessung an evertierten Vesikeln

Acridinorange ist ein Fluoreszenzfarbstoff (siehe Abbildung 2.2) mit dem Änderungen des pH-Wertes in Organellen, aber auch in artifiziellen Vesikeln detektiert werden können. Das Verfahren beruht auf dem Ionenfallprinzip, bei dem die protonierte Form von Acridinorange infolge einer Ansäuerung des Vesikelinnenraums im Vesikel angereichert wird, da sie im Gegensatz zur unprotonierten Form nicht membrangängig ist. Diese Eigenschaften können für die Quantifizierung des Protonentransports durch Na^+/H^+ Antiporter genutzt werden, weil es aufgrund der intravesikulären Akkumulation zu einer reduzierten Fluoreszenzemission kommt [Rosen 1986].

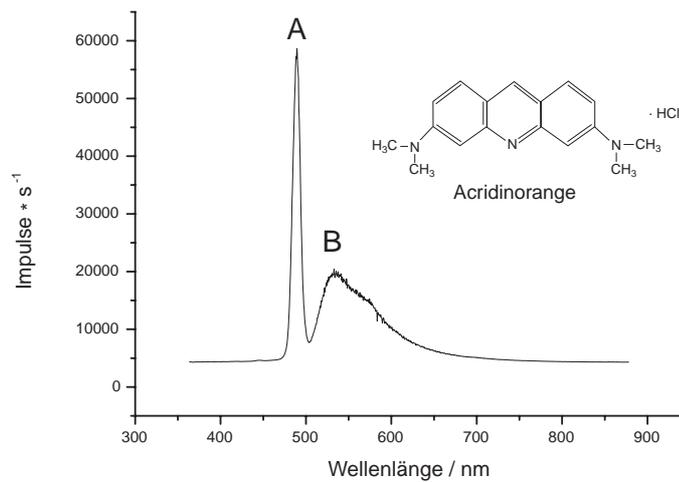


Abbildung 2.2: Fluoreszenzmissionsspektrum von Acridinorange. Eine Acridinlösung (10 mM MES/Tris, 140 mM Cholinchlorid, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM KCl, 2 μM Acridinorange, 30 μl evertierte Vesikel, pH 7,5) wurde mit Licht der Wellenlänge 495 nm bestrahlt und das Fluoreszenzspektrum senkrecht zum anregenden Licht gemessen. (A) Streulicht der Anregungswellenlänge 495 nm, (B) Fluoreszenzemission mit Intensitätsmaximum bei 530 nm Wellenlänge.

2.4.2 Experimenteller Aufbau

Zur Messung von Na^+/H^+ Antiporteraktivitäten wurde ein UDL200 Farbstofflaser (Laser Technik Berlin) verwendet. Als Laserfarbstoff diente Coumarin 102, welches mit einem MSG801 SD Stickstoff Laser (Laser Technik Berlin) angeregt wurde. Die Emissionsspektren wurden mit Hilfe eines MS125 Spektrometers (Lot-Oriel-GmbH) erzeugt und mit einer Instaspec IV CCD Kamera aufgenommen. Für die Transportmessungen wurde eine thermostatisierte (22 °C) Magnetrühreinheit mit Küvettenaufsatz (Aminco) und Küvetten aus optischem Spezialglas (Typ 101-OS, Hellma) verwendet. Eine schematische Darstellung der Messgeometrie zeigt Abbildung 2.3.

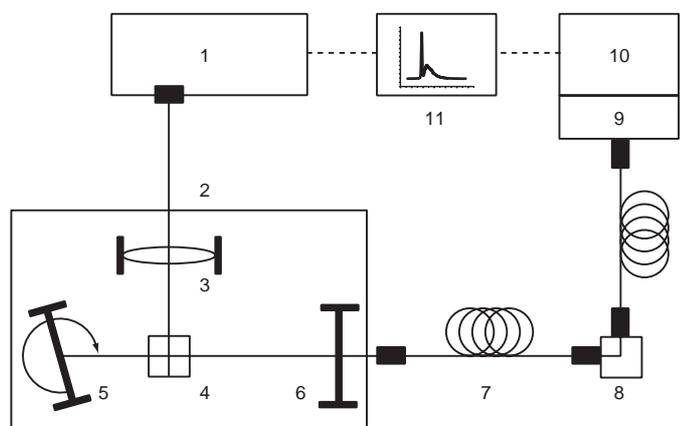


Abbildung 2.3: Aufbau des Laserspektrometers. (1) Stickstoff Laser, (2) Farbstofflaser bestehend aus (3) Quarzzyylinderlinse (4) Farbstoffküvette (5) schwenkbarem Gitter und (6) Auskoppelspiegel. (7) Glasfaser, (8) Messküvette mit Magnetrühreinheit, (9) Spektrometer, (10) CCD Kamera, (11) Messrechner.

2.4.3 Messung der Aktivität von Na^+/H^+ Antiportern an evertierten Vesikeln

Evertierte Vesikel (20-60 μl , siehe Kapitel 2.3.4) wurden in 2 ml MTCMK Puffer (10 mM MES/Tris, 140 mM Cholinchlorid, 5 mM MgCl_2 , 5 mM KCl, 2 μM Acridinorange, eingestellt auf den jeweils angegebenen pH) suspendiert und unter konstantem Rühren mit einer Anregungswellenlänge von 495 nm bestrahlt. Nach der Stabilisierung der Fluoreszenzintensität bei 530 nm Wellenlänge (ca. 50-100 s) wurden 2 mM Tris-DL-Lactat (eingestellt auf den pH des MTCM Puffers) zugegeben, was zur Ansäuerung des Vesikelinnenraums durch Lactat/ H^+ Symporter [Ten Brink und Konings 1980] und damit zur Abnahme der Fluoreszenz führt (siehe Abbildung 2.4). Sobald der Gleichgewichtszustand (G_1) erreicht war (200-600 s), wurde NaCl (1-20 mM) oder LiCl (1-20 mM) zugegeben, so dass es als Folge der Na^+/H^+ Antiporteraktivität zu Alkalisierung des Vesikelinneren kommt. Nach dem Erreichen des Gleichgewichtszustandes (G_2) wurde der pH Gradient durch Zugabe von 25 mM NH_4Cl entkoppelt, wodurch die Fluoreszenz auf den Ausgangswert (G_0) ansteigt.

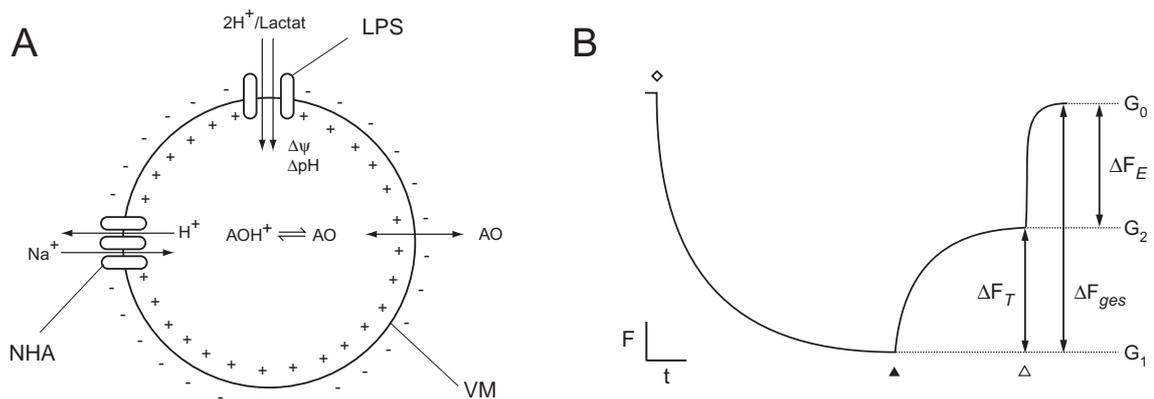


Abbildung 2.4: (A) Modellschema eines evertierten Vesikels. NHA: Na^+/H^+ Antiporter, VM: Vesikelmembran, LPS: Lactat/ H^+ Symporter, AO: Acridinorange, +,-: Ladungsverteilung an der Vesikelmembran am Gleichgewichtszustand G_1 . (B) Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz bei Na^+/H^+ Antiportermessungen an evertierten Vesikeln. Zugabe von: (◇) Tris-DL-Lactat, (▲) NaCl oder LiCl, (Δ) NH_4Cl . (G_0), (G_1), (G_2): Gleichgewichtszustände (siehe Kapitel 2.4.3). (ΔF_T): Fluoreszenzzunahme infolge des Protonentransportes durch Na^+/H^+ Antiporter. (F_E): Fluoreszenzzunahme durch Entkopplung des pH Gradienten. (ΔF_{ges}): Summe aus (ΔF_T) und (F_E).

2.4.4 Messung der Aktivität von Na^+/H^+ Antiportern in Proteoliposomen

Während Antiporter wie NhaA (*E. coli*) und NhaB (*E. coli*) Natrium in Gegenwart eines Protonengradienten (ΔpH) transportieren [Taglicht u. a. 1991, Pinner u. a. 1994], benötigt der Na^+/H^+ Antiporter aus *Halobacterium halobium* sowohl ΔpH als auch eine Potentialdifferenz $\Delta\psi$ für die Aktivierung [Konishi und Murakami 1990]. Da in evertierten Vesikeln ein pH Gradient und eine

Potentialdifferenz vorliegt, wurde MjNhaP1 in Proteoliposomen rekonstituiert, um den Einfluss von ΔpH und $\Delta\psi$ unabhängig voneinander untersuchen zu können. Der pH Gradient entsteht bei diesem Verfahren durch die auswärtsgerichtete Diffusion von NH_3 , während ein Valinomycin vermittelter Kaliumausstrom ein Membranpotential erzeugt (siehe Abbildung 2.5 A).

Proteoliposomen ($20 \mu\text{l}$, siehe Kapitel 2.3.9) wurden in 2 ml MTCM Puffer (10 mM MES/Tris, 140 mM Cholinchlorid, 5 mM MgCl_2 , 5 mM KCl, $2 \mu\text{M}$ Acridinorange, pH 6,0) suspendiert und unter konstantem Rühren mit einer Anregungswellenlänge von 495 nm bestrahlt. Nach Zugabe der Vesikel fällt die Fluoreszenzintensität infolge des Aufbaus des pH Gradienten von F_0 auf den Wert F_1 ab (siehe Abbildung 2.5 B). Aufgrund eines Protonenleckstroms kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenz auf den Wert F_2 . Bei Zugabe von NaCl (20 mM) oder Valinomycin ($1 \mu\text{M}$) kommt es durch die Aktivität von Na^+/H^+ Antiportern zur Entkopplung des pH Gradienten, wodurch die Fluoreszenz auf den Ausgangswert F_0 ansteigt.

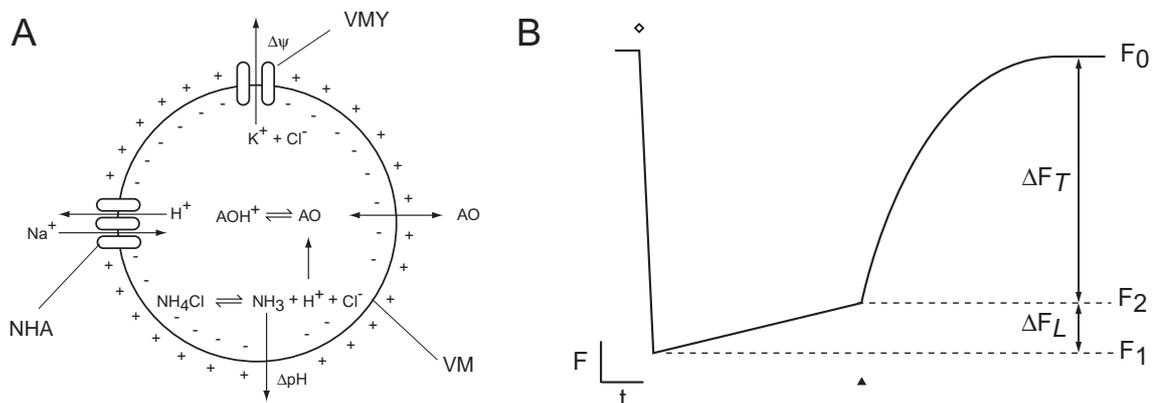


Abbildung 2.5: (A) Modellschema eines Proteoliposoms. NHA: Na^+/H^+ Antiporter, VMY: Valinomycin, VM: Vesikelmembran, AO: Acridinorange, +,-: Ladungsverteilung an der Vesikelmembran bedingt durch den Kaliumausstrom nach Valinomycinzugabe. (B) Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz bei Na^+/H^+ Antiportermessungen an Proteoliposomen. Zugabe von: (\diamond) Vesikeln, (\blacktriangle) NaCl oder Valinomycin. (F_0), (F_1), (F_2): Fluoreszenzintensitätsniveaus (siehe Kapitel 2.4.4). (ΔF_T): Fluoreszenzzunahme infolge des Protonentransportes durch Na^+/H^+ Antiporter. (ΔF_L): Fluoreszenzzunahme durch Protonenleckströme.

2.5 Bioinformatik

2.5.1 Computerprogramme

Für die Erstellung von Sequenzvergleichen auf Proteinebene wurde, falls nicht anders erwähnt, das Programm *Megalign™ Version 5.0* aus dem Programmpaket *Lasergene* (DNASTAR) verwendet. Die Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe des ClustalW Algorithmus durchgeführt [Thompson u. a. 1994], wobei dem paarweisen Sequenzvergleich eine Gonet 250 Proteingewichtungsmatrix mit

einer Lückenstrafe von 10 und einer Lückenfortsetzungsstrafe von 0,1 zugrunde lag. Der multiple Sequenzvergleich wurde mit einer Lückenstrafe von 10 und einer Lückenfortsetzungsstrafe von 0,2 unter Verwendung einer Gonet Serie durchgeführt.

Zur Darstellung von Proteinstrukturen wurde das Programm *Raswin Molecular Graphics* Windows Version 2.6 (1993-1995 R.Sayle) verwendet.

Um transmembranäre Domänen von Membranproteinen zu identifizieren, wurde das Programm *ProteanTM Version 5.00* aus dem Programmpaket *Lasergene* verwendet. Dazu wurde die mittlere Hydrophobizität von jeweils 9 Aminosäuren nach dem von Kyte und Doolittle beschriebenen Verfahren ausgewertet [Kyte und Doolittle 1982].

Die Erstellung von Plasmidkarten erfolgte mit dem Programm *Enhance Version 3.1* (Scientific and Educational Software). Bearbeitung und Konvertierung von Graphiken sind mit *Illustrator Version[®] 8.01* und *Photoshop[®] Version 5.5* (Adobe[®]) durchgeführt worden.

Zur Auswertung der Fluoreszenzmessungen wurde das Programm *Instaspec Version 1.11* (Roper Scientific) in Kombination mit *Origin[®] Version 6.0* (MicrocalTM) verwendet.

2.5.2 Datenbanken

Gen- und Proteinsequenzen von *M. jannaschii* wurden mittels der Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information*, des *Institute of Genomic Research*, des *Schweizerischen Instituts für Biotechnologie* (www.expasy.ch/sprot/) sowie des *Institute of Genomic Research* (www.tigr.org) akquiriert.

Homologe Proteinsequenzen sind mit Hilfe des BLAST[®] Algorithmus des *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov) identifiziert worden [Altschul u. a. 1990]. Den Sequenzvergleichen lag dabei eine Blosum62 Matrix mit einer Lückenstrafe von 11 und einer Lückenfortsetzungsstrafe von 1 zugrunde.

Die Atomkoordinaten für die Darstellung der Strukturen von KcsA und MthK wurden der Proteinstrukturdatenbank (www.pdb.org) entnommen.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Die Kaliumkanäle von *M. jannaschii*

Sequenzanalysen des Genoms von *M. jannaschii* haben gezeigt, dass mindestens drei Gene, Mj0138.1, Mj1357 und Mj0139, existieren, die für putative Kaliumkanäle kodieren [Bult u. a. 1996]. Die entsprechenden Genprodukte wurden mit MjK1, MjK2 und MjKch bezeichnet.

3.1.1 Sequenzanalyse von MjK1 und MjK2

MjK1 und MjK2 sind zu 48 % identisch und gehören phylogenetisch zur Familie der einwärts-rectifizierenden Kaliumkanäle (siehe Abbildung 3.1). Zu dieser Gruppe gehören mitunter die Kaliumkanäle KcsA (*Streptomyces lividans*) und MthK (*Methanobacterium thermoautotrophicum*), die bereits in molekularer Auflösung dargestellt werden konnten [Doyle u. a. 1998, Jiang u. a. 2002]. Kaliumkanäle mit einem hohen Verwandtschaftsgrad zu MjK1 und MjK2, wurden u.a. in den Organismen *Synechocystis sp. PCC 6803* (34,8 % und 30 % Identität) und *Methanosarcina acetivorans* (27,1 % und 28,6 % Identität) identifiziert.

Hydrophobizitätsuntersuchungen zeigen, dass MjK1 und MjK2 am N-Terminus zwei transmembranäre Domänen (M1-M2) aufweisen (siehe Abbildung 3.2), die den für Kaliumkanäle typischen Selektivitätsfilter (P) mit der Konsensussequenz (T-X-X-T-V-G-Y-G-D) flankieren (siehe Abbildung 3.3). Der hydrophobe Bereich erstreckt sich bei beiden Proteinen etwa bis zur 90. Aminosäureposition, während der C-Terminus, welcher mehr als zwei Drittel des Gesamtproteins ausmacht, hydrophil ist.

Unter der Annahme einer zu MthK analogen Struktur, handelt es sich beim C-Terminus um eine zytoplasmatische Domäne, die in zwei stark konservierte Bereiche TrkA-N (pfam02254) und

TrkA-C (pfam02080) untergliedert ist. TrkA-N beinhaltet ein Rossman Faltungsmotiv (G-X-G-X-X-G), welches u.a. bei den Kaliumtransportsystemen Ktr von *M. jannaschii* (siehe Abbildung 3.3) und *Bacillus subtilis* vorhanden ist, bei MthK jedoch nicht auftritt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Sequenz bei Kaliumtransportern NAD, bzw. NADH bindet [Roosild u. a. 2002].

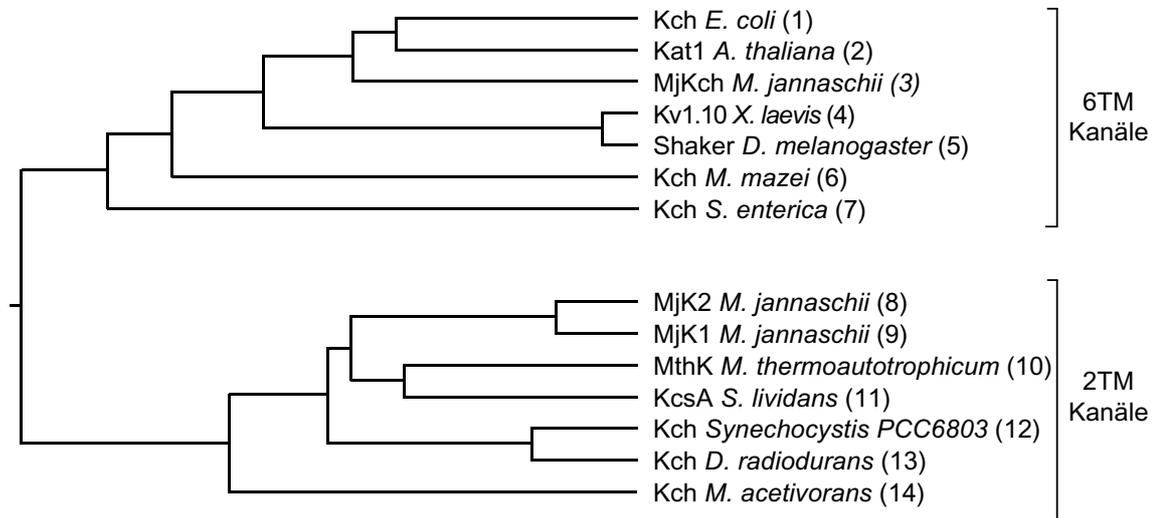


Abbildung 3.1: Phylogenetische Verwandtschaft von MjKch, MjK1 und MjK2 zu Kaliumkanälen mit sechs, bzw. zwei transmembranären Domänen (6TM Kanäle, bzw. 2TM Kanäle). Der Stammbaum wurde mit Megalign (DNA-Star) unter Verwendung des ClustalW Algorithmus erstellt. Die Zugangsnummer bezieht sich auf die Nummerierung der Proteine im Stammbaum: (1) AAB60119, (2) AAC49113, (3) NP_247105, (4) AAK11604, (5) P08510, (6) NP_635213, (7) NP_455757, (8) Q58752, (9) Q57604, (10) O27564, (11) Q54397, (12) NP_440478, (13) NP_296057, (14) NP_617354.

Die Kristallstruktur von MthK zeigt, dass über drei negativ geladene Aminosäuren (D184, E210, E212) Kalzium gebunden wird. Diese Negativladungen sind bis auf D209 (MjK2) und E208 (MjK1) in den Kaliumkanälen von *M. jannaschii* nicht vorhanden. E210 und E212 von MjK2 bilden hingegen ein zu MthK homologes Sequenzmotiv (E-X-E), während eine zu D184 analoge Negativladung fehlt (siehe Abbildung 3.3).

3.1.2 Sequenzanalyse von MjKch

MjKch gehört phylogenetisch zur Familie der spannungsgesteuerten Kanäle (K_V -Kanäle). Vertreter dieser Gruppe sind u.a. der Shaker Kanal aus *Drosophila melanogaster* und Kat1 aus *Arabidopsis thaliana* (siehe Abbildung 3.1). Die zu MjKch nächstverwandten Kaliumkanäle stammen aus dem Zyanobakterium *Nostoc sp. PCC 7120* (28,2 % Identität) und dem Proteobakterium *Magnetococcus sp. MC-1* (24,9 % Identität). Es besteht ebenfalls eine vergleichsweise nahe Verwandtschaft zum eukaryotischen Kaliumkanal K_V 1.10 aus *Xenopus laevis* (21,5 % Identität).

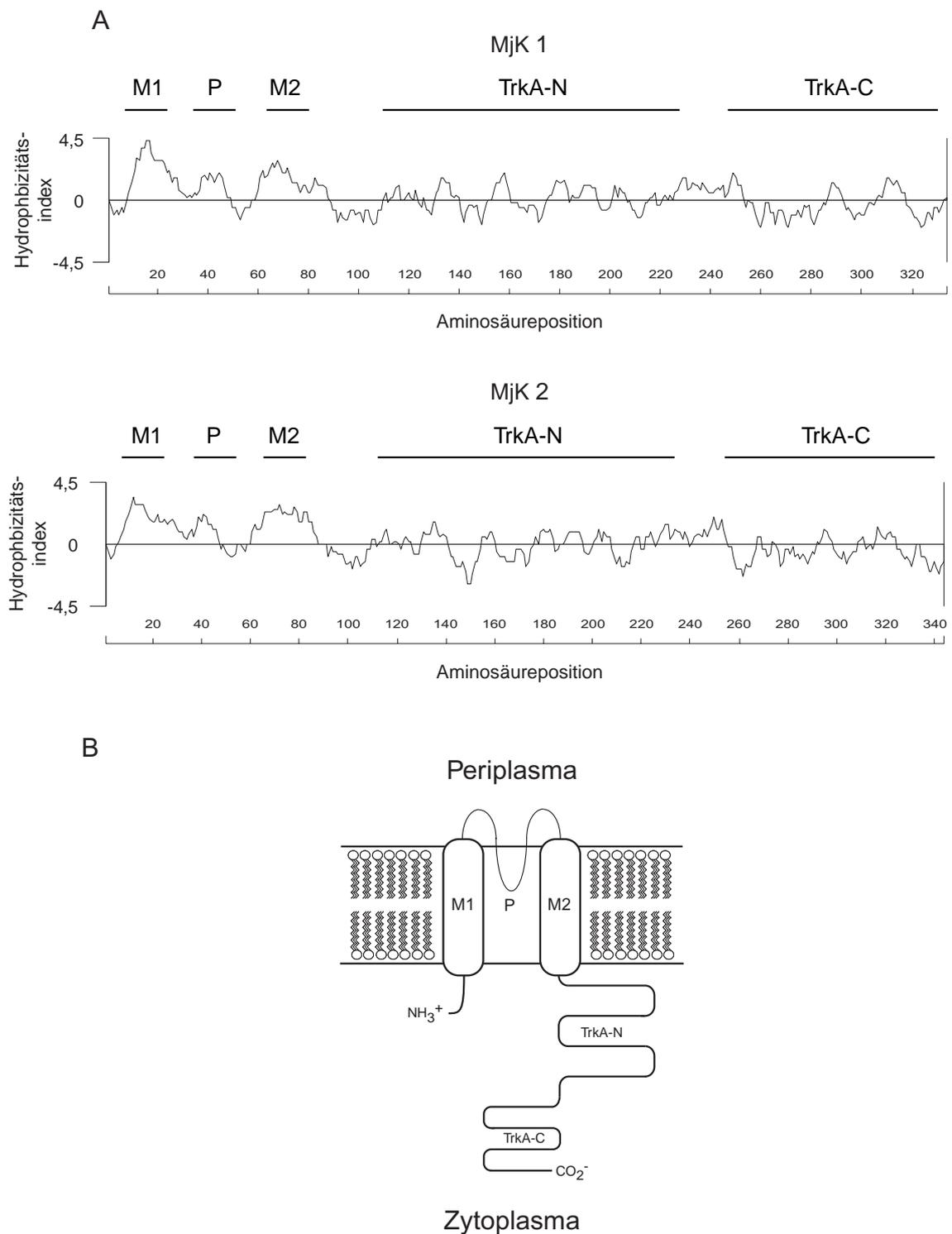


Abbildung 3.2: (A) Hydrophobizitätsdiagramm und (B) schematisches Sekundärstrukturmodell von MjK1 und MjK2. Die transmembranären Domänen wurden mit Protean (DNA-Star) unter Verwendung des Kyte-Doolittle Algorithmus ermittelt, wobei der Hydrophobizitätsindex von jeweils neun Aminosäuren gemittelt wurde. Informationen über konservierte Domänen wurden der Entrez-Datenbank entnommen (www.ncbi.nlm.nih.gov). (M1-M2): transmembranäre Domänen, (P): Selektivitätsfilter. TrkA-N und TrkA-C: konservierte Domänen (pfam02254) und (pfam02080).

		M1	P	M2
<i>M. jannaschii</i> MjK1 (1)	1	METYEKIELGIIVIIILLILLESVILMTVEG--WDFFTA	FTAVVTLSTVGYCDYTPQTF	LKLSVIIYIFA
<i>M. jannaschii</i> MjK2 (2)	1	METSKKLVIVAVLSITLLIYAYLISIIIEG--VDYFTA	LYFVSVIIITITTCYCFDTPKTF	LGRITLVVYLCV
<i>Synechocystis</i> sp. 2TM Kch (3)	20	RRLRQELMAGAITLAGLVVGTAWRYVVE--WTWLD	AFYMTTITLAVGFCBTHPLSPASRLFT	ILLILMG
<i>M. jannaschii</i> Ktr (4)	1	-----	-----	-----
<i>M. thermoautotrophicum</i> MthK (5)	14	RVLKVPATRILLLVAVIIYGTAGFHFIIEG--SWT	VSLYWTFVTLATVGYCDYSPSTPL	GMYPFVTLIVL
<i>M. acetivorans</i> 2TM Kch (6)	23	PNLAYKLAALLLIYIYLLFKYIMIFENQ	ENANAVTATYWATTTLATVGYCDVVF	ASLLGRFSIVQVT
TrkA-N				
<i>M. jannaschii</i> MjK1	71	VGAVAYTMGNIAEFFIEGHFRKYFRLR	KMMDRIKKLNHYIIICGY	ERLEKVI
<i>M. jannaschii</i> MjK2	71	VGIVMYLFSLIAEFTVEGKFEFVRL	KMKKNIKTLKDHYIIICGY	ERLKVVG
<i>Synechocystis</i> sp. 2TM Kch	90	LLTIGYMNRFTEAFIQGYQDSLRRR	QEQVIERLADHYIIICGY	ERTGQQA
<i>M. jannaschii</i> Ktr	1	-----	-----	-----
<i>M. thermoautotrophicum</i> MthK	84	IGTFA-----VAVERLLEFLINRE	QMLMGLIDVAKSRHVVICG	WSESTLE
<i>M. acetivorans</i> 2TM Kch	95	IILISGF---LATYVITPMDRIK	FRLPRKVPSSMKDHIIC	GYNQLVETLIDELAEQETFIIEDEEDV
TrkA-N				
<i>M. jannaschii</i> MjK1	143	LEEALKEDPN-LICIVQDATSDDI	IKKAKTEKAKGLISVSSDA	ENVFITLSAKKLNPNIIYIVKAEK
<i>M. jannaschii</i> MjK2	143	LKEEYKYPDKFLYIVQDAKKEE	VKKAKIDKAKGLIATLPSD	ADNVFLTLTARELNPNILITAKADEK
<i>Synechocystis</i> sp. 2TM Kch	162	IIQAKLRD---YAVLQCDATLDEI	LAAHIERAICIVSALS	SDAENLYTVLSAKTLNPKIRAIARASSEEAV
<i>M. jannaschii</i> Ktr	36	CKKASAEID--ALVINQDCTFKIK	TEHDAGIEDADMYIAVTG	KEEVNLMSSELA
<i>M. thermoautotrophicum</i> MthK	149	RKKVLRSG---ANFVHGDPTRVSD	EKANVRGARAVTVQLES	DSEITIHCLGTRKIDESVRIIEADRYENI
<i>M. acetivorans</i> 2TM Kch	164	IKELVYRD---IPCIFETLSDKQ	TLLNGNIEKARILANK-	SDERNANIVLTAREFQH-LSIVATIVEDRSNS
TrkA-N TrkA-C				
<i>M. jannaschii</i> MjK1	214	DKLIKACADRACVPIYIVGGMEI	ARIAINPDIVEFIHSLVAT----	EEDMEVRRYIVK--NKELDNKLLKDS
<i>M. jannaschii</i> MjK2	215	RKLKIAACANRVVSPYLIGGLR	MAEVSVRPGILDPLSTFKIA	KDEYEDIELRKFVIEK-DSELAYKSLKDA
<i>Synechocystis</i> sp. 2TM Kch	231	QKLKRACADEVVSPIYITGGK	RLAAALRPQVVSFVDGILTG---	ADRSFYMEEFRI
<i>M. jannaschii</i> Ktr	105	DVFERLQVDVVVSPBELIAANY	IEKLIERPGLDLA---IVG----	RGEAEILEFIPE-KAKVNVKIKEL
<i>M. thermoautotrophicum</i> MthK	218	EQLRMACADQVISPFVVISGR	LMSRSIDDGYEAMFVQDVLAE----	ESTRMVEVPIPE-GSKLEGVSVLDA
<i>M. acetivorans</i> 2TM Kch	231	KYLKYACADMVVSPEKSMFQG	FIGRKAMDRLVSRVTGTTEIF----	KGHV-VTEFPVYI-KSPLIGKTLKEV
TrkA-C				
<i>M. jannaschii</i> MjK1	279	GIREKTGATLAVKKGK-KTITS	PPDVIINIGDIIYAFG	TKEQLEKLRKRYVEGVE
<i>M. jannaschii</i> MjK2	286	NIRGKTGATLGLRREK-EFCIN	SYPEFILKPGDVIYAFG	TEENLKYENLVKKKKKL
<i>Synechocystis</i> sp. 2TM Kch	299	QLRAQSGALFLAIRRQRKLVG	PMGDTHLLDADSLICLGT	VEQLRALNQLLCPNPARVRLPKNHR
<i>M. jannaschii</i> Ktr	168	G--RPQDYLLIAIYDGD-ELKI-	PSGDELKSGDRVLLVVK	DAADAIRKMFLEE
<i>M. thermoautotrophicum</i> MthK	284	DIHDVTGVIIGVGRGD-ELI	IDPRDYSFRAGDII	LGIGKPEIERLKNYISA
<i>M. acetivorans</i> 2TM Kch	296	SSQRLTGARIVGIWKS	G-ALSFNPKEDDVIRGNS	VLLAVGTPPEELAKLKLTH

Abbildung 3.3: Sequenzvergleich von MjK1 und MjK2 mit Kaliumkanälen prokaryotischer Herkunft und dem NAD bindenden Protein Ktr des Kaliumaufnahme-systems Ktr (*M. jannaschii*). Dunkel-, bzw. hellgrau unterlegte Bereiche kennzeichnen identische und konservierte Aminosäuren. Die NAD-bindenden Aminosäuren des Rossmannmotifs sind schwarz unterlegt. Schwarz umrandet sind die kalziumkoordinierenden Aminosäuren von MthK sowie die entsprechenden homologen Aminosäuren von MjK1 und MjK2. (M1-M2): transmembranäre Domänen, TrkA-N: NAD-bindende Domäne (pfam02254), TrkA-C: konservierte Domäne mit ungeklärter Funktion (pfam02080). (P): Selektivitätsfilter. Die Zugangsnummer bezieht sich auf die Nummerierung der Proteine im Sequenzvergleichsschema: (1) Q57604, (2) Q58752, (3) NP_440478, (4) Q58505, (5) O27564, (6) NP_617354.

Mit Hilfe von Hydrophobizitätsuntersuchungen konnten sechs transmembranäre Domänen (S1-S6) bei MjKch identifiziert werden (siehe Abbildung 3.4). Zwischen S5 und S6 befindet sich in einer hydrophoben Schleife der Selektivitätsfilter (P) mit der Signatursequenz (siehe Abbildung 3.5).

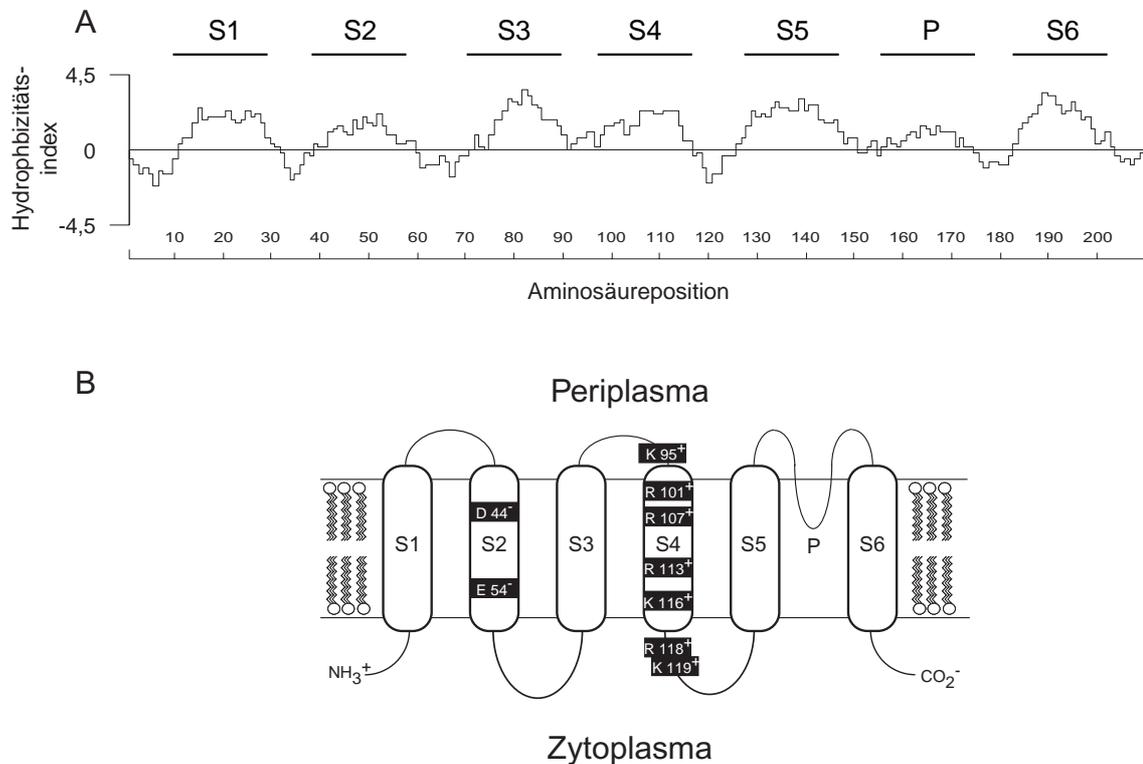


Abbildung 3.4: (A) Hydrophobizitätsdiagramm und (B) schematisches Sekundärstrukturmodell von MjKch. Die transmembranären Domänen wurden mit Protean (DNA-Star) ermittelt. Dazu wurde der Hydrophobizitätsindex von jeweils neun Aminosäuren nach dem Verfahren von Kyte und Doolittle gemittelt. Die positiv und negativ geladenen Aminosäuren des Spannungssensors sind schwarz unterlegt. (S1-S6): transmembranäre Domänen, (P): Selektivitätsfilter.

Die zytoplasmatischen Abschnitte am N- und C-terminalen Ende von MjKch bestehen aus elf, bzw. vier Aminosäureresten. Regulatorische, zytoplasmatische Domänen, wie z.B. die C-terminale RCK Domäne von Kch (*E. coli*, ~Aminosäuren 240-417) [Jiang u. a. 2001] oder die N-terminale Tetramerisierungsdomäne des Shaker Kanals (~Aminosäuren 1-197) [Kreusch u. a. 1998] treten bei MjKch demnach nicht auf (siehe Abbildungen 3.2 und 3.5).

In S4 sowie dessen unmittelbarer Umgebung, befinden sich vier Arginin- und drei Lysinreste (K95, R101, R107, R113, K116, R118, K119), deren positiv geladene Seitenketten den Spannungssensor von MjKch ausmachen. Bei den meisten K_v-Kanälen sind die Positivladungen durch jeweils zwei ungeladene Aminosäurereste getrennt [Yellen 2002]. Dieses Motiv besteht beispielsweise beim Shaker Kanal, bei K_v1.10 und bei SeKch (*Salmonella enterica*). Bei MjKch sind die ersten vier Positivladungen durch fünf Aminosäuren getrennt, während die Abstände der Ladungen im

C-terminalen Bereich von S4 kürzer werden (siehe Abbildung 3.5). Durch sequenzgerichtete Mutagenese des Shaker Kanals wurde gezeigt, dass E293 (S2) durch seine Negativladung den Spannungssensor beeinflusst. Homologe Aminosäurereste existieren u.a. bei K_v1.10 (E236), DrKch (E76, *Deinococcus radiodurans*), MmKch (E78, *Methanosarcina mazei*) und MjKch (E54). Sie befinden sich bei diesen Kanälen ebenfalls in S2 und sind in die konservierte Aminosäuresequenz (F-T(S)-X-E) integriert.

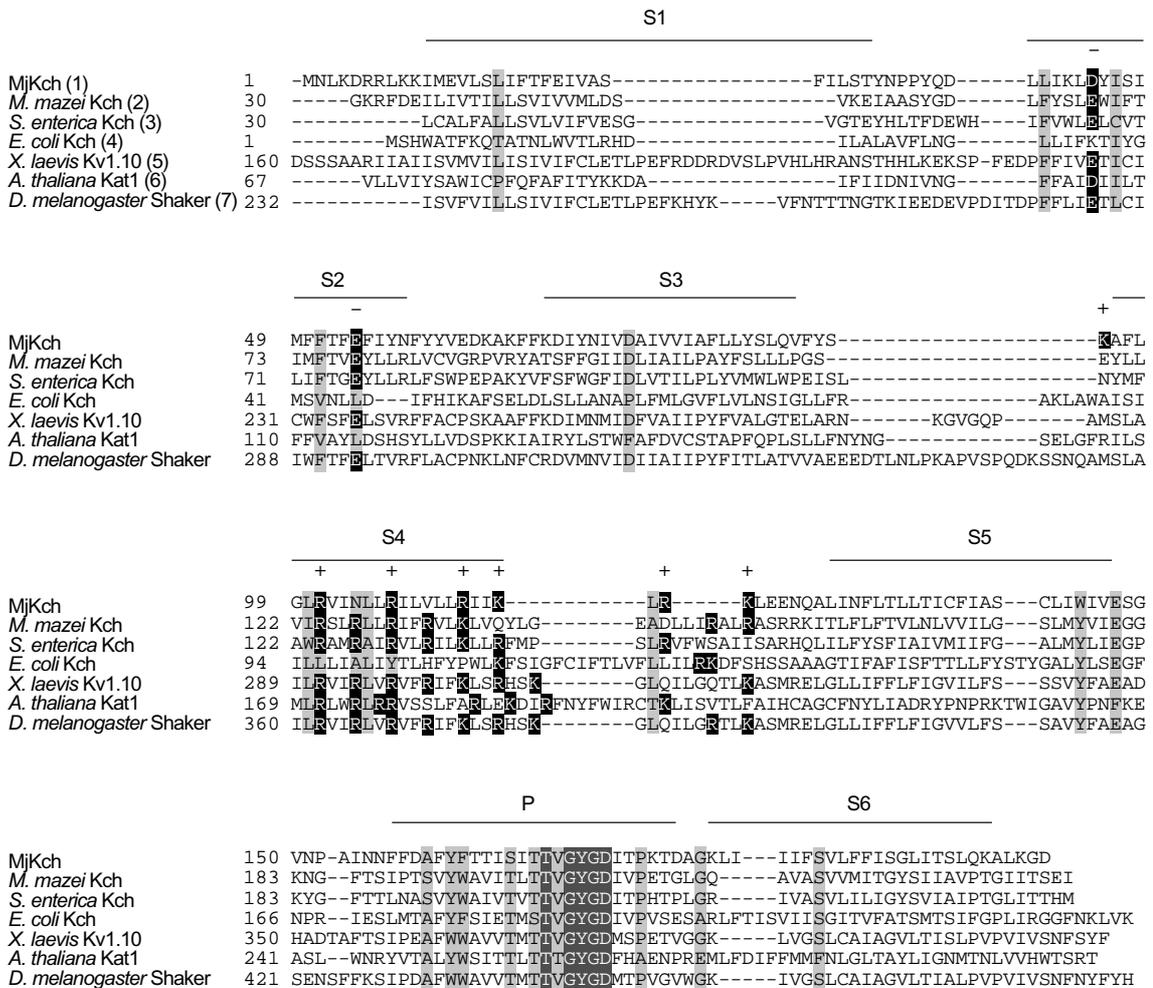


Abbildung 3.5: Sequenzvergleich von MjKch mit 6TM Kaliumkanälen pro- und eukaryotischer Herkunft. Identische und konservierte Aminosäuren sind dunkel-, bzw. hellgrau unterlegt. Die geladene Aminosäurereste der Spannungssensoren sind schwarz unterlegt. Entsprechende Ladungen im Bereich von S2 und S4 von MjKch sind mit (+), bzw. (-) gekennzeichnet. Für den Sequenzvergleich wurden ausschließlich die transmembranären Bereiche der Proteine berücksichtigt, die anhand des Kyte-Doolittle Algorithmus ermittelt wurden. (P): Selektivitätsfilter, (S1-S6): transmembranäre Domänen. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm Megalign (DNA-Star) unter Verwendung des ClustalW Algorithmus erstellt. Die Nummerierung der Proteine im Sequenzvergleichsschema bezieht sich auf die jeweilige Zugangsnummer: (1) NP_247105, (2) NP_635213, (3) NP_455757, (4) AAB60119, (5) AAK11604, (6) AAC49113, (7) P08510.

3.2 Expression von MjK1, MjK2 und MjKch in *E. coli*

3.2.1 Nachweis von MjK1 und MjKch in *E. coli* Membranen

Das MjK1 Gen Mj0138.1 umfasst 999 Basenpaare und kodiert ein Protein mit einer Molmasse von 37,1 kD. Mj0138.1 wurde in den Expressionsvektor pTrcHis2 TOPO® kloniert, so dass sich unter Berücksichtigung der Molmasse des Fusionspeptids (siehe Kapitel 2.1.7) eine Molmasse von 40,8 kD für die monomere Form sowie 163,2 kD für die tetramere Form von MjK1 ergibt. MjK1 konnte in Membranpräparationen von *E. coli* immunchemisch nachgewiesen werden. Es bildet dort Tetramere (p170), die unter dem Einfluss von SDS stabil waren (siehe Abbildung 3.6 A).

Das Gen Mj0139 hat eine Länge von 627 Basenpaaren und wurde ebenfalls in den Vektor pTrcHis2 TOPO® kloniert. Die monomere Form des resultierenden Fusionsproteins MjKch hat eine Molmasse von 27,8 kD, während die des Tetramers 111 kD beträgt. MjKch konnte in Membranen von *E. coli* immunchemisch nachgewiesen werden. Die apparenten Molmassen des Mono- und Tetramers betragen bei der SDS-PAGE etwa 30, bzw. 110 kD. In Abhängigkeit der jeweils untersuchten Zelllinie zeigten sich Variabilitäten hinsichtlich des Oligomerisierung von MjKch. Während bei einigen die monomere Form (p30) und die tetramere Form (p170) nachgewiesen werden konnte, traten bei anderen ausschließlich Monomere auf (siehe Abbildung 3.6 B).

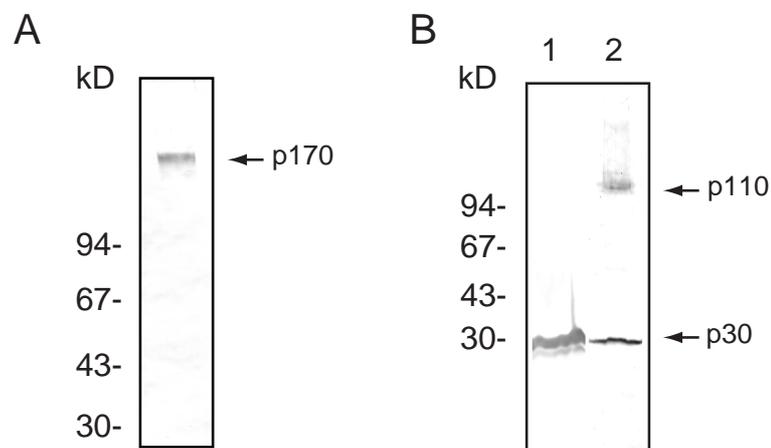


Abbildung 3.6: Immunchemischer Nachweis von MjK1 und MjKch. *E. coli* TOP10 Zellen wurden in 20 ml TB Medium über Nacht bei 37 °C und 400 U min⁻¹ geschüttelt. Durch Zugabe von 1 mM IPTG und fortgesetzter Kultivierung für 60 min wurde die Proteinexpression induziert. Die Membranfraktion wurde präpariert (siehe Kapitel 2.3.5 und 2.3.6) und der SDS-PAGE mit nachfolgendem Elektrottransfer unterzogen. Der immunchemische Nachweis geschah mit anti-*myc* Antikörper. A: Zellen mit Plasmid pMj0138.1, B 1+2: Individuelle Klone mit Plasmid pMj0139.

3.2.2 Expression und Reinigung von MjK2

Das Mj1357 Gen hat eine Länge von 1029 Basenpaaren und kodiert für ein Protein mit einer Molmasse von 38,8 kD. Zusätzlich der Molmasse des Fusionsproteins (siehe Kapitel 2.1.7), beträgt die Molmasse eines Monomers 42,5 kD und die eines Tetramers 170 kD. Das Mj1357 Gen wurde in die Plasmide pTrcHis2B und pTrcHisB kloniert (siehe Kapitel 2.1.7). Desweiteren wurde eine verkürzte Form des Gens, die 303 Basenpaare des 5'-Endes des offenen Leserahmens umfasst, in den Vektor pTrcHis2B kloniert. Der Genabschnitt kodiert für die Aminosäuren 1-101, welcher die transmembranären Domänen von MjK2 bildet. Entsprechend der Position des Fusionsproteins (C-Terminus = CT, N-Terminus = NT), wurden die Proteinkonstrukte mit MjK2-CT, MjK2-NT und MjK2-101-NT bezeichnet.

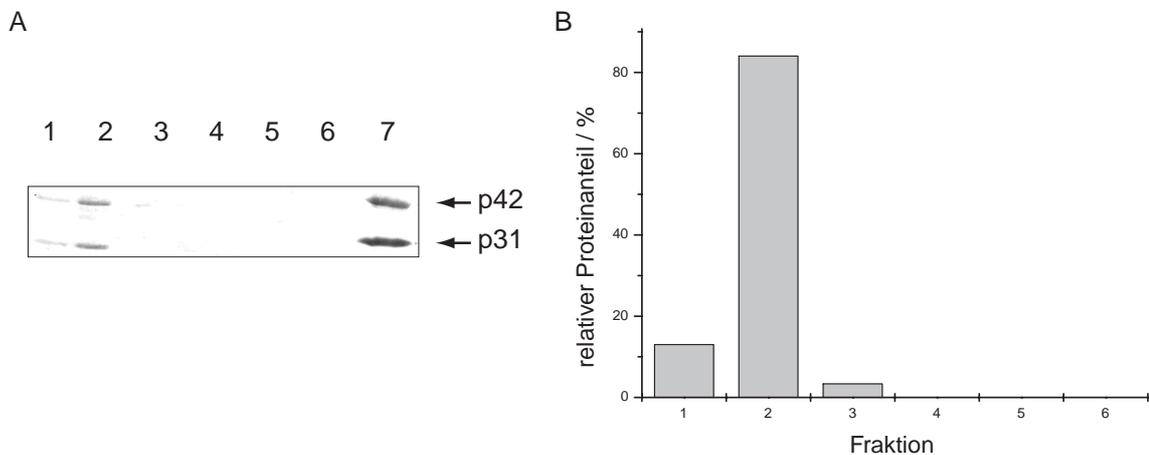


Abbildung 3.7: (A) Affinitätschromatographische Reinigung von MjK2. MjK2 wurde mit 0,5 % NLS solubilisiert und an eine Co^{2+} -Sepharosematrix gebunden. Die Matrix wurde mit 20 ml Puffer W (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0,5 % NLS, pH 8,0) gewaschen. Nachfolgend wurde MjK2 durch Zugabe von Imidazol in Puffer E (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0,1 % NLS, pH 8,0) eluiert. Die Matrix wurde mit je 3 ml Fraktionen der entsprechenden Puffer behandelt wovon je 50 μl mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Spuren 1-6: 20, 40, 60, 80, 100, 200 mM Imidazol, Spur 7: Immunchemischer Nachweis von MjK2 mit anti-*myc* Antikörper nach Elektrottransfer. (B) Relativer Proteinanteil in den Eluatfraktionen. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgte mit dem Programm Labimage (Kapelan).

MjK2-CT konnte in Membranen von *E. coli* immunchemisch nachgewiesen werden. Es lag dort vorwiegend monomer mit einer apparenten Molmasse von 42 kD (p42) vor. Neben p42 wurde zudem ein kleineres Protein mit einer Molmasse von 31 kD (p31) exprimiert. Durch Peptidsequenzierung konnte gezeigt werden, dass es sich um eine verkürzte Form von MjK2 handelt, deren Translation am dritten Startcodon des offenen Leserahmens beginnt [Hellmer 1998]. p31 ist ein lösliches Protein und konnte aus zytoplasmatischen Extrakten von *E. coli* isoliert werden. Membranpräparationen wiesen jedoch immer einen Anteil von p31 auf, so dass es bei affinitätschromatographischer Reinigung von p42 zu einer gleichzeitigen Reinigung von p31 kam. p42

und p31 dissoziierten bei affinitätschromatographischer Reinigung ab einer Imidazolkonzentration von 20 mM von einer Co^{2+} -Sephrosematrix. Der Hauptanteil von etwa 83 % eluiert bei einer Imidazolkonzentration von 40 mM (siehe Abbildung 3.7).

Um den Einfluss der Position des Fusionsproteins auf die Multimerisierung von MjK2 zu untersuchen, wurde MjK2 mit einem N-terminalen Fusionsprotein versehen. Hierdurch konnte verhindert werden, dass es bei affinitätschromatographischer Reinigung von p42 zu einer gleichzeitigen Reinigung von p31 kam. Ein Einfluss auf die Tetramerisierung bestand hingegen nicht, da das Protein sowohl in Membranpräparationen, als auch nach Reinigung, als Monomer vorlag (siehe Abbildung 3.8). Eine Bildung von Dimeren konnte jedoch induziert werden, indem das Protein über einen Zeitraum von mehreren Stunden mit der Affinitätsmatrix inkubiert wurde. Durch dieses Verfahren ging innerhalb von 15 Stunden etwa 40 % des Proteins in die dimere Form (p80) über, während eine signifikante Bildung von Tetrameren ausblieb. Neben der Bildung von Dimeren kam es durch die verlängerte Inkubationsdauer zu einer Änderung der Löslichkeit des Proteins. Dies führte dazu, dass es bei einer Behandlung der Affinitätsmatrix mit Imidazol oder EDTA nicht mehr zur Elution des Proteins kam.

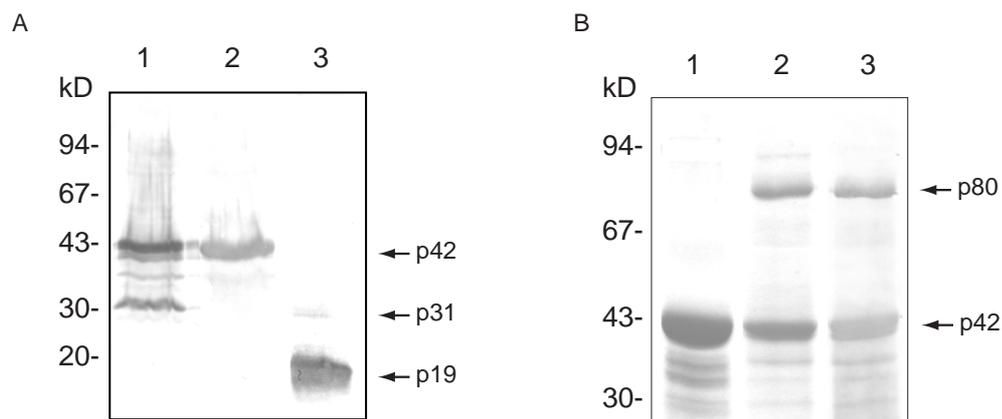


Abbildung 3.8: (A) Untereinheitenstöchiometrie von MjK2 Konstrukten. A: *E. coli* Membranen (5 mg) wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt, elektrotransferiert und mit anti-*myc*, bzw. anti-Xpress Antikörper nachgewiesen. 1) MjK2-CT, 2) MjK2-NT, 3) MjK-101-NT, (B) Dimerisierung von MjK2-NT. MjK2-NT wurde mit 0,5 % NLS solubilisiert und an eine Co^{2+} -Sephrosematrix gebunden. Unspezifisch gebundenes Protein wurde durch Waschen der Matrix mit Puffer W (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0,5 % NLS, pH 8,0) entfernt. Nachfolgend wurde MjK2 mit Puffer E (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 200 mM Imidazol, 0,1 % NLS, pH 8,0) eluiert 1) oder in gebundener Form mit der Affinitätsmatrix inkubiert 2). Beide Fraktionen wurden 15 h bei 4 °C gelagert und anschließend der SDS-PAGE unterzogen. 3) Immunchemischer Nachweis von MjK2-NT in Fraktion 2 mit anti-Xpress Antikörper.

Für die Kristallisation von KcsA (*Streptomyces lividans*) wurde eine verkürzte Form des Proteins verwendet, die die Aminosäuren 1-125 des N-Terminus umfasste. Dieser Proteinabschnitt besteht aus zwei transmembranären Domänen, und bildet tetramere Kanalproteine aus [Doyle u. a. 1998].

Um zu überprüfen, ob die hydrophoben Domänen von MjK2 ebenfalls in der Lage sind eine tetramere Struktur auszubilden, wurde das Konstrukt MjK2-101-NT erzeugt. Es hat eine theoretische Molmasse von 15 kD und zeigt bei der SDS-PAGE eine apparente Molmasse von 19 kD (p19). MjK2-101-NT konnte in Membranen von *E. coli* immunchemisch nachgewiesen werden und trat, ebenso wie MjK2-NT und MjK2-CT, in monomerer Form auf (siehe Abbildung 3.8).

3.3 Einfluss von MjK1, MjK2 und MjKch auf das Wachstum von *E. coli*

Um den Einfluss von MjK1, MjK2 und MjKch auf das Wachstum von *E. coli* zu untersuchen, wurde die Wachstumsgeschwindigkeit von TOP10 Zellen ermittelt, die diese Proteine exprimierten. Als Negativkontrolle dienten TOP10(pTrcHis2B) Zellen. TOP10(pMj1357) und TOP10(pTrcHis2B) Zellen unterschieden sich nicht signifikant und erreichten nach etwa 200 min die mittlere logarithmische Wachstumsphase. Die Expression von MjKch ging mit einer leichten Verzögerung des Wachstums einher, so dass $OD_{600}=1$ nach 270 min erreicht war (siehe Abbildung 3.9). Die stärkste Beeinträchtigung des Wachstums wurde bei Zellen beobachtet, die MjK1 exprimierten. Hier war die Zellteilungsrate um etwa 60 % bezüglich des Wildtyps reduziert und $OD_{600}=1$ nach 510 min erreicht.

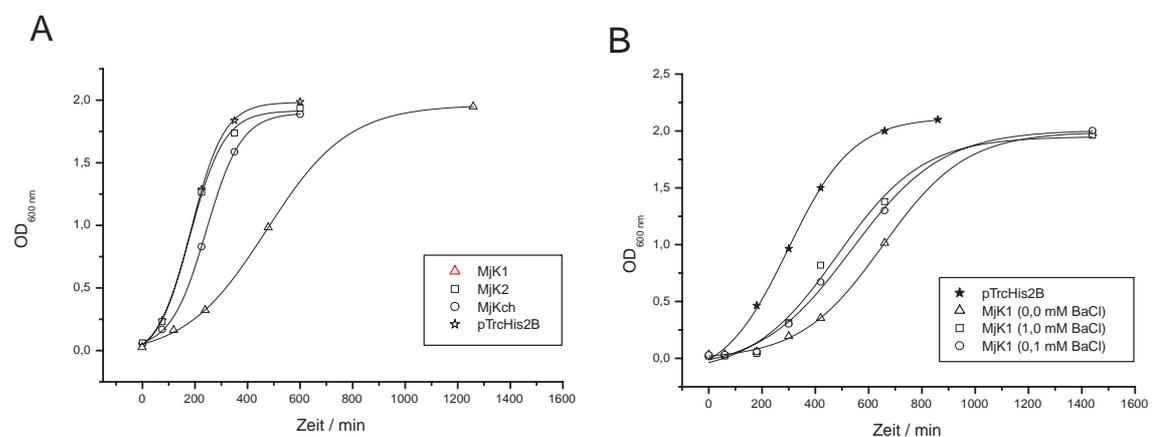


Abbildung 3.9: Wachstumskinetik von MjK1, MjK2 und MjKch exprimierenden TOP10 Zellen. Eine Einzelkolonie der jeweiligen Zelllinie wurde in LB(Amp) bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600}=0,4-0,9$) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 400 U min^{-1} kultiviert. Die Kulturen wurden nachfolgend in LB(Amp) auf eine OD_{600} von 0,03 eingestellt und BaCl wie angegeben zugesetzt. Unter fortgesetztem Schütteln bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 400 U min^{-1} wurde die OD_{600} ermittelt. (A) Wachstum der TOP10 Zelllinien ohne BaCl. (B) Einfluss von BaCl auf die Wachstumsgeschwindigkeit von MjK1 exprimierenden Zellen.

Die Toxizität von MjK1 konnte durch Suppression der Proteinexpression mittels 25 mM Glukose im Nährmedium reduziert werden. Der Transfer in LB Flüssignährmedien ($\sim 5\text{ mM}$ Kalium)

führte aber in 60-80 % der Fälle zum Absterben der Kulturen, während ein Transfer in LBK (87 mM Kalium) Flüssignährmedium nicht möglich war. XL1-Blue(pMj0138.1) Zellen konnten ebenfalls auf LB-Agar wachsen, reagierten aber empfindlicher auf Änderungen des Milieus als TOP10(pMj0138.1) Zellen. Der Transfer in Flüssignährmedium führte sowohl bei LB als auch bei LBK zum Absterben der Zellen. Die toxischen Effekte von MjK1 konnten durch Verwendung des Kaliumkanalblockers BaCl₂ teilweise unterdrückt werden. Der Effekt war ab einer Konzentration von 0,1 mM zu beobachten und war bei 1 mM BaCl₂ maximal (siehe Abbildung 3.9 B).

3.4 Komplementation des kaliumabhängigen Phänotyps von LB2003 Zellen

LB2003 Zellen weisen Mutationen in den Kaliumtransportergenen von Trk, Kup und Kdp auf (siehe Kapitel 2.2.2). Die Hauptsysteme für die Kaliumaufnahme sind damit nicht funktionsfähig, so dass die Zellen eine Konzentration von 25 mM Kalium im Nährmedium für halbmaximales Wachstum benötigen, während der *E. coli* Wildtyp in Gegenwart von 2 μ M Kalium wachsen kann [Epstein und Kim 1971]. Es konnte gezeigt werden, dass der kaliumabhängige Phänotyp von LB2003 Zellen durch die heterologe Expression der Kaliumaufnahmesysteme Kat1, Hkt1 und Kup1 (*A. thaliana*) komplementiert wird, so dass diese Zelllinie zur Identifikation von Kaliumtransportern und Kaliumkanälen verwendet werden kann [Uozumi 2001].

Um zu überprüfen, ob eine Komplementation der Kaliumsensitivität durch die Expression von MjK1, MjK2 und MjKch möglich ist, wurden LB2003 Zellen mit den Plasmiden pMj0138.1 pMj0139 pMj1357 und pTrcHis2B (Negativkontrolle) transformiert und auf synthetischen Nährmedien mit definierter Kaliumkonzentration kultiviert (siehe Abbildung 3.10).

Bei Zellen, die das Kontrollplasmid pTrcHis2B trugen und Zellen, die MjK2 exprimierten war nach 16 h Inkubation auf Festnährmedien ausschließlich Wachstum bei einer Kaliumkonzentration von 100 mM zu beobachten (siehe Abbildung 3.10). Die Expression von MjKch ermöglichte der *E. coli* Mutante über einen Konzentrationsbereich von 1-100 mM Kalium zu wachsen, während Zellen, die MjK1 exprimierten zwar bei einer Konzentration von 1 mM KCl, nicht aber in Gegenwart von 10 und 100 mM KCl wuchsen. Dies steht im Einklang mit den Wachstumskinetiken in LB Medium (siehe Kapitel 3.3), bei denen eine Kaliumkonzentration von 5 mM (Kaliumgehalt von LB-Medium) sich deutlich inhibierend auf das Wachstum von TOP10(Mj0138.1) Zellen auswirkte.

Die Inkubation von LB2003 Zellen in KML-Flüssignährmedium führte zu vergleichbaren Ergebnissen, wobei jedoch eine verstärkte Toxizität von Kalium im Vergleich zum Festnährmedium bei

Expression MjKch beobachtet wurde (vgl. Kapitel 3.3). Nach 16 h Inkubation in Gegenwart von 100 mM KCl befanden sich LB2003(pMj0139) Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600}=0,29$), während LB2003(pMj1357) und LB2003(pTrcHis2B) Zellen bereits die stationäre Wachstumsphase erreicht hatten. Nach einer Inkubationsdauer von 64 h erreichten auch LB2003(pMj0138.1) Zellen die stationäre Wachstumsphase. Es ist jedoch möglich, dass hierbei Zellen selektioniert wurden die MjK1 nicht exprimierten.

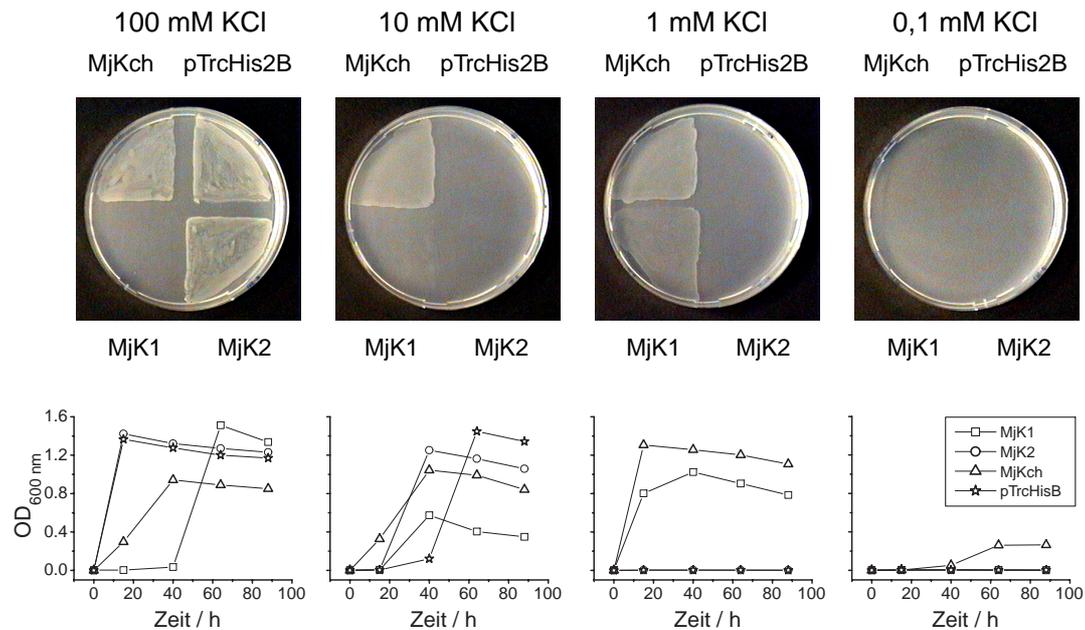


Abbildung 3.10: Kaliumabhängige Wachstumscharakteristik von LB2003 Zellen bei Expression von MjK1, MjK2 und MjKch. LB2003(pMj0138.1), LB2003(pMj0139), LB2003(pMj1357) und LB2003(pTrcHis2B) Zellen wurden in KML(Amp) Flüssignährmedien 16 h bei 37 °C und 350 U min^{-1} vorinkubiert. Die Kaliumkonzentration betrug dabei 100 mM für LB2003(pMj1357) und LB2003(pTrcHis2B) sowie 1 mM für LB2003(pMj0138.1), LB2003(pMj0139) Zellen. Durch dreimaliges sedimentieren der Zellen ($3500\times g$, 10 min) mit nachfolgender Resuspension in KML Medium ($20\text{ }\mu\text{M}$ Kalium als Kontamination) wurde die Kaliumkonzentration abgesenkt. Nachfolgend wurde die OD_{600} der Kulturen mit KML Medium auf 0,5 eingestellt. Obere Reihe: Je $50\text{ }\mu\text{l}$ der Zellsuspensionen wurden auf KML(Amp) Festnährmedium (0,1-100 mM KCl) transferiert und bei 37 °C für 16 h inkubiert. Untere Reihe: Jeweils $5\text{ }\mu\text{l}$ der Zellsuspensionen wurde in 20 ml KML(Amp) Flüssignährmedien (0,1-100 mM KCl) transferiert und bei 37 °C und 400 U min^{-1} geschüttelt. Die OD_{600} wurde über einen Zeitraum von 88 h gemessen.

In Gegenwart von 10 mM KCl war nach einer Inkubationsdauer von 16 h, ebenso wie bei Festnährmedien, ausschließlich Wachstum bei LB2003(pMj0139) Zellen zu beobachten. Nach einer Inkubationsdauer von 40 h hatten alle Zelllinien mit Ausnahme der Negativkontrolle ($OD_{600}=0,1$) die stationäre Wachstumsphase erreicht.

Bei einer Konzentration von 1 mM waren ausschließlich Zellen, die MjK1 und MjKch exprimierten, in der Lage zu wachsen. Zudem waren ihre Wachstumsgeschwindigkeiten sowie die maxi-

malen optischen Dichten höher als in Gegenwart von 10 oder 100 mM KCl. LB2003(pMj0139) Zellen waren als einzige in der Lage bei einer Kaliumkonzentration von 0,1 mM zu wachsen, benötigten jedoch 64 h, um eine OD_{600} von 0,26 zu erreichen. Die höchsten Wachstumsraten von LB2003(pMj1357) und LB2003(pTrcHis2B) Zellen wurden demnach bei 100 mM KCl beobachtet, während bei LB2003(pMj0138.1) und LB2003(pMj0139) Zellen eine Kaliumkonzentration von 1 mM optimal für das Wachstum war.

3.5 Einfluss von Kaliumkanalblockern auf die Komplementation

Kaliumkanäle werden durch zweiwertige Kationen wie Ba^{2+} und Cs^{2+} sowie durch zahlreiche Stickstoffverbindungen wie TEA (Tetraethylammonium) und 4-AP (4-Aminopyridin) inhibiert [Heginbotham und MacKinnon 1992, Munsey u. a. 2002]. Die Sensitivität für das jeweilige Agens wird dabei durch bestimmte Sequenzbereiche innerhalb der Porendomänen determiniert [Becker u. a. 1996].

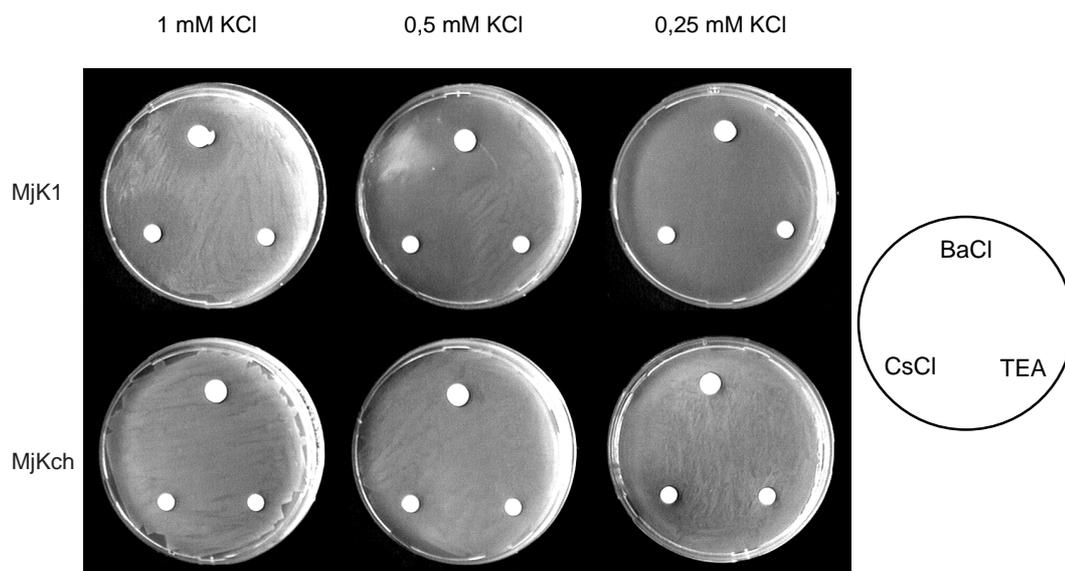


Abbildung 3.11: Wachstumsinhibition von LB2003(pMj0138.1) und LB(pMj0139) Zellen durch BaCl, CsCl und TEA in Abhängigkeit der Kaliumkonzentration. LB2003(pMj0138.1) und LB2003(pMj0139) Zellen wurden in 20 ml KML(Amp) Flüssignährmedium (1 mM KCl) 16 h bei 37 °C und 350 U min^{-1} vorinkubiert. Nachfolgend wurde durch dreimaliges sedimentieren der Zellen ($3500\times g$, 10 min) mit nachfolgender Resuspension in je 20 ml KML Medium ($20 \mu\text{M}$ Kalium als Kontamination) die Kaliumkonzentration abgesenkt. Die OD_{600} der Kulturen wurde mit KML Medium auf 0,5 eingestellt und je $200 \mu\text{l}$ der Zellsuspensionen auf KML(Amp) Festnährmedium (0,25, 0,5 und 1 mM KCl) transferiert. Die Applikation der Kaliumkanalblocker erfolgte durch Filterpapierplättchen ($\varnothing = 6 \text{ mm}$), die mit je $10 \mu\text{l}$ 1 M Lösungen von BaCl, CsCl oder TEA getränkt waren. Die Anzucht der Bakterien erfolgte für 16 h bei 37 °C.

Um die Sensitivität von MjK1 und MjKch für die Kaliumkanalblocker Ba^{2+} , Cs^{2+} und TEA zu bestimmen, wurden LB2003(pMj0138.1) und LB2003(pMj0139) Zellen auf Selektivnährmedien in Gegenwart von Kaliumkonzentrationen kultiviert, die nahe der wachstumslimitierenden Konzentration von 0,5 mM für MjK1 und 0,1 mM für MjKch lagen. Die Blocker sind mit Hilfe getränkter Filterpapiere appliziert worden, die auf den wachsenden Bakterienrasen gelegt wurden. Dadurch wurde eine Wachstumsinhibition verursacht, die sich als klarer Halo um das Filterpapier bemerkbar machte (siehe Abbildung 3.11).

MjK1 wurde bereits bei einer Kaliumkonzentration von 1 mM deutlich durch Ba^{2+} und Cs^{2+} inhibiert, während TEA keinen Effekt hatte. Die Größe des Halos war abhängig von der Kaliumkonzentration, so dass die Wachstumsinhibition in Gegenwart von 0,5 mM stärker ausgeprägt war. Zellen die MjKch exprimierten, wurden dagegen im Wachstum ausschließlich von Cs^{2+} gehemmt. Der Effekt trat ab einer Kaliumkonzentration von 0,5 mM KCl auf und war selbst bei 0,25 mM KCl deutlich schwächer als bei MjK1 in Gegenwart von 1 mM KCl. Niedrigere Kaliumkonzentrationen als 0,25 mM führten bei LB2003(pMj0139) Zellen zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen, da der Bakterienrasen unterhalb dieser Konzentration nicht gleichmäßig wuchs.

3.6 Die Na⁺/H⁺ Antiporter von *M. jannaschii*

Das Genom von *M. jannaschii* beinhaltet drei Gene, Mj0057, Mj1521 und Mj1275, deren Genprodukte zu Na⁺/H⁺ Antiportern homolog sind [Bult u. a. 1996]. Mj0057 und Mj1521 kodieren für Na⁺/H⁺ Antiporter der NhaP Familie und wurden demzufolge mit MjNhaP1 und MjNhaP2 bezeichnet. Das Genprodukt von Mj1275 ist zu Na⁺/H⁺ Antiportern der NapA Familie homolog und wurde entsprechend mit MjNapA bezeichnet.

3.6.1 Sequenzanalyse von MjNhaP1 und MjNhaP2

Ein Vergleich der Sequenzen zeigte, dass MjNhaP1 und MjNhaP2 zu 45 % identisch sind. Die nächstverwandten Proteine sind putative Na⁺/H⁺ Antiporter vom NhaP Typ, die in den Archaeobakterien *Methanopyrus kandleri* (43 % und 47 % Identität) und *Pyrococcus abyssi* (33 % und 30 % Identität) identifiziert wurden (siehe Abbildung 3.12). Die Verwandtschaft zu eukaryotischen Na⁺/H⁺ Antiportern wie SOS1 (*A. thaliana*) und Nhe1 (*Homo sapiens*) (18-21 % Identität) ist näher als zu den bakteriellen Antiportern NhaA und NhaB (*E. coli*) (10-16 % Identität). YcgO, ein Osmoregulationsprotein von *E. coli*, weist ebenfalls einen vergleichsweise hohen Verwandtschaftsgrad auf (20 % und 22 % Identität) [Verkhovskaya u. a. 2001].

MjNhaP1 und MjNhaP2 haben 12 (Goldman-Engelman-Steitz Algorithmus, www.tigr.org) oder 13 (Kyte-Doolittle Algorithmus) transmembranäre Domänen (T1-T13). Das zwölfte Segment, dessen Lokalisation nicht eindeutig ist, wurde mit T12? benannt (siehe Abbildung 3.13). An den C-Termini von MjNhaP1 und MjNhaP2 befinden sich zyto- oder periplasmatische Abschnitte (T12 oder T13 Modell) deren Länge 18-25 Aminosäuren beträgt. Regulatorische Domänen, wie sie beispielsweise bei SynNhaP1 (*Synechocystis sp. PCC6803*) [Waditee u. a. 2001] und Nhe1 (*H. sapiens*) [Wakabayashi u. a. 2000] auftreten, sind demnach bei MjNhaP1 und MjNhaP2 nicht vorhanden.

Innerhalb der NhaP Familie wurden drei stark konservierte Bereiche identifiziert, die sich in T5, T6 und dem putativ transmembranären Segment T12? befinden (siehe Abbildung 3.14). Das Motiv (I-X-X-A-T-D) in T5 tritt bei Na⁺/H⁺ Antiportern prokaryotischer Herkunft, wie z.B. NhaA (*E. coli*) und eukaryotischen Transportern, wie SOS1 (*A. thaliana*) auf. Mit Ausnahme des Aspartatrests existiert dagegen das Sequenzmotiv (E-S-F-N-D-P) aus T6 nur bei archaebakteriellen Na⁺/H⁺ Antiportern. Das Sequenzmotiv (G-P-R-G-V-V-P) in T12? tritt in dieser Konstellation nur bei Na⁺/H⁺ Antiportern archaebakterieller Herkunft auf, während die Glycinreste dieser Sequenz auch in Na⁺/H⁺ Antiportern anderer Familien (Nhe1, SOS1) konserviert sind.

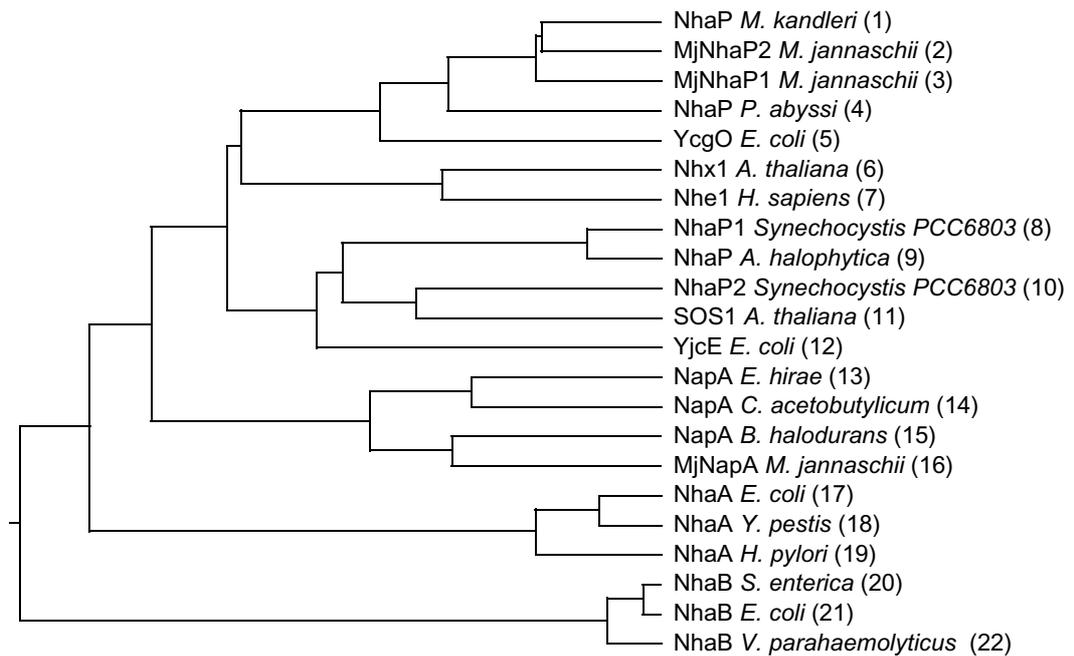


Abbildung 3.12: Phylogenetische Verwandtschaft von MjNhaP1, MjNhaP2, MjNapA zu Antiportern pro- und eukaryotischer Organismen. Der Stammbaum wurde erstellt mit Megalign (DNA-Star) unter Verwendung des ClustalW Algorithmus. Die Zugangsnummer bezieht sich auf die Nummerierung der Na⁺/H⁺ Antiporter im Stammbaum. (1) NP_613837, (2) NP_248529, (3) NP_247021, (4) NP_126974, (5) NP_415709, (6) NP_198067, (7) P19634, (8) BAA17925, (9) BAB69459, (10) BAA18490, (11) AAF76139, (12) P32703, (13) CAD22163, (14) NP_347084, (15) NP_243710, (16) NP_248271, (17) NP_285709, (18) NP_404112, (19) NP_224165, (20) NP_456313, (21) NP_287425, (22) BAA12073.

3.6.2 Sequenzanalyse von MjNapA

Sequenzvergleiche zeigen, dass MjNapA homolog zu Antiportern der NapA Familie ist. Verwandte Proteine sind u.a. der putative Na⁺/H⁺ Antiporter aus *Clostridium acetobutylicum* (31,7 % Identität) und NapA aus *Enterococcus hirae* (27,2 % Identität) [Strausak u. a. 1993]. Es besteht ebenfalls eine Homologie zu KefC (*E. coli*), einem glutathionregulierten K⁺/H⁺ Antiporter (22,4 % Identität) und zu Kha1, einem putativen K⁺/H⁺ Antiporter aus *Saccharomyces cerevisiae* [Ferguson u. a. 1995, Ramirez u. a. 1998].

Mit Hilfe von Hydrophobizitätsuntersuchungen wurden bei MjNapA 12 transmembranäre Domänen identifiziert, die etwa 65 % des Gesamtproteins ausmachen (siehe Abbildung 3.13). Den C-Terminus von MjNapA bildet ein hydrophiler Bereich von etwa 14 Aminosäuren Länge. Regulatorische, zytoplasmatische Domänen, wie sie am C-Terminus von KefC (~ Aminosäuren 383-620) [Loo u. a. 1995] und Kha1 (~ Aminosäuren 433-873) [Ramirez u. a. 1998] auftreten, sind demnach bei MjNapA nicht vorhanden.

Innerhalb der Proteinfamilie existieren 3 stark konservierte Sequenzbereiche in T2 (G-X-I(L)-X-

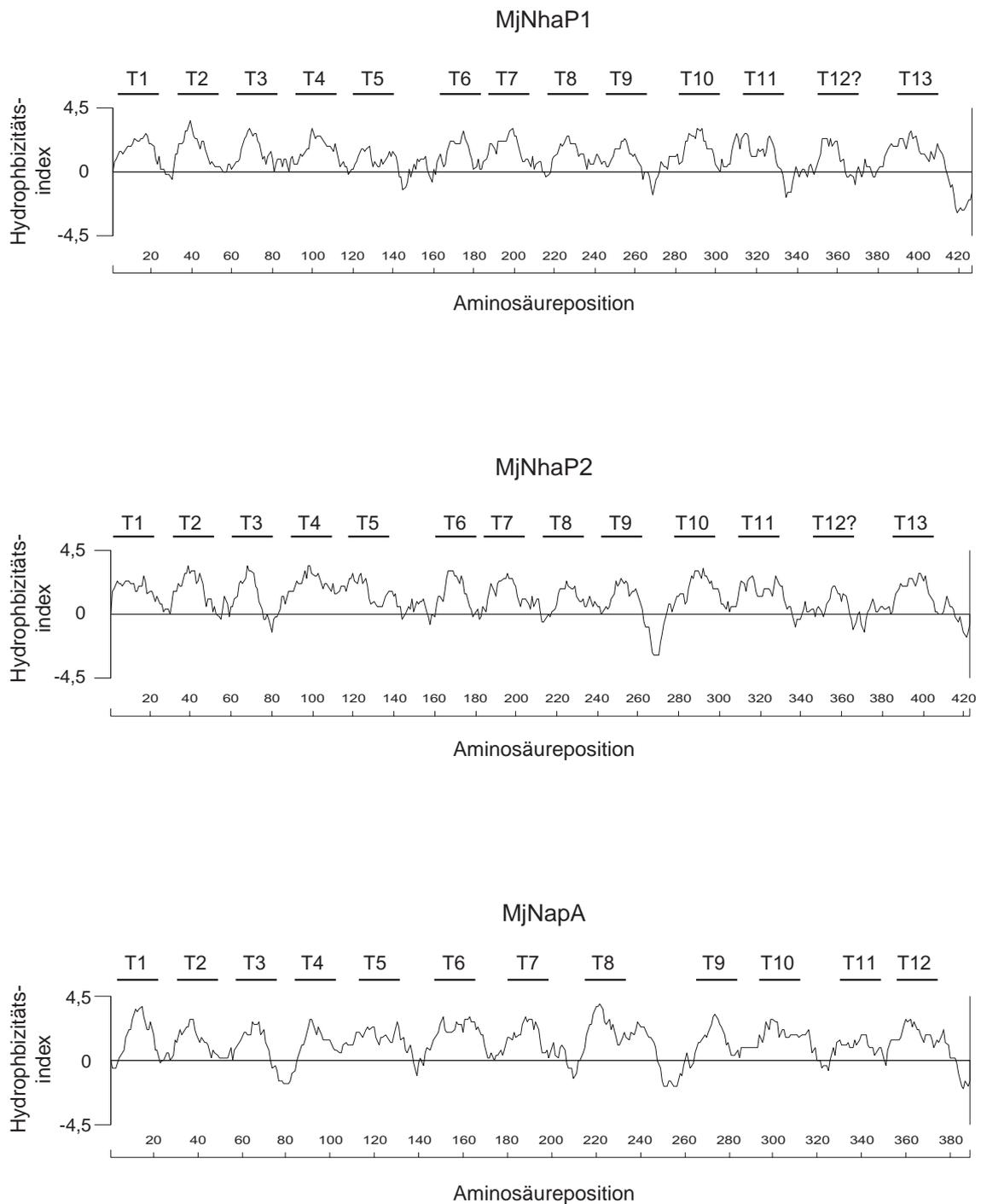


Abbildung 3.13: Hydrophobizitätsdiagramm der Na⁺/H⁺ Antiporter von *M. jannaschii*. Die transmembranären Domänen wurden anhand des Kyte-Doolittle Algorithmus unter Verwendung des Programms Protran (DNA-Star) berechnet und mit T1-T13 bezeichnet. Für die Berechnung wurden die Hydrophobizitätsindizes von jeweils 9 Aminosäuren gemittelt. Da unter Verwendung des Goldman-Engelman-Steitz Algorithmus (www.tigr.org) das zwölfte hydrophobe Segment von MjNahP1 und MjNhaP2 als putativ transmembranär eingestuft wird, wurde es mit T12? bezeichnet.

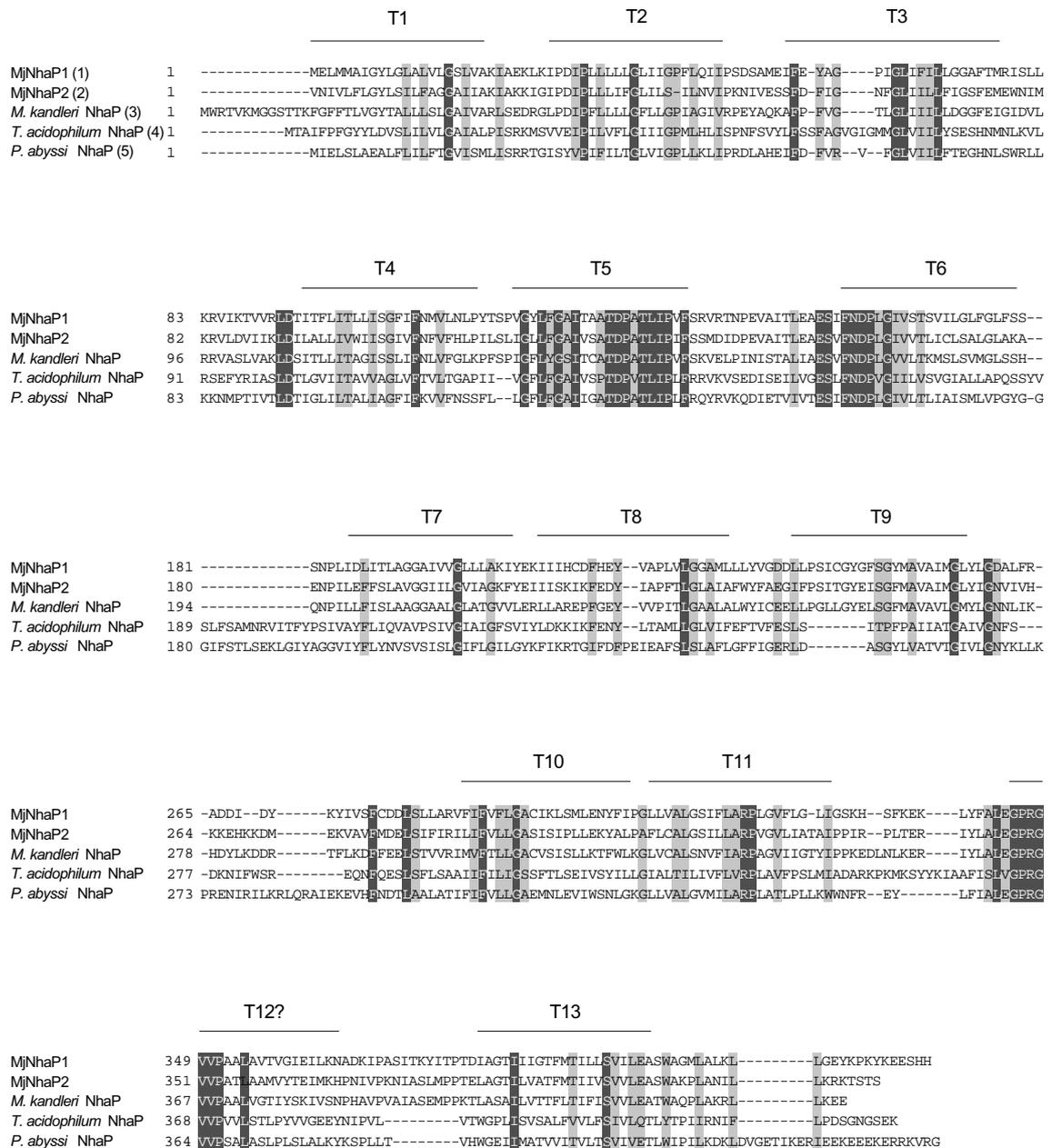


Abbildung 3.14: Sequenzvergleich von MjNhaP1 und MjNhaP2 mit Na⁺/H⁺ Antiportern der NhaP Familie. Identische und konservierte Aminosäurereste sind dunkel-, bzw. hellgrau unterlegt. Die transmembranären Segmente wurden mit T1-T13 bezeichnet. Für die Berechnung des Sequenzvergleichsschemas wurde das Programm Megalign (DNA-Star) verwendet. Die Zugangsnummern beziehen sich auf die willkürliche Nummerierung der Na⁺/H⁺ Antiporter im Sequenzvergleichsschema: (1) NP_247021, (2) NP_248529, (3) NP_613837, (4) NP_394359, (5) NP_126974.

G-P), T3 (F-X-X-G-I(L)-E) und T8 (G-A(S)-F(Y)-X-A(C)-G). 72 % der identischen Aminosäuren sind Glycinreste. Konservierte Aminosäuren mit negativ geladener Seitenkette, welche u.a für die Funktion von NhaA (*E. coli*) und NhaD (*Vibrio cholerae*) notwendig sind [Inoue u. a. 1995, Ostroumov u. a. 2002], befinden sich in T3 (E72), T5 (D155) und zwischen T3 und T4 (E76). Damit unterscheidet sich die Verteilung konservierter Negativladungen von der des NhaA Typs (T4 und T5) und der des NhaP Typs (T5 und T6).

3.7 Expression von MjNhaP1, MjNhaP2 und MjNapA in *E. coli*

Die putativen Na^+/H^+ Antiporter MjNhaP1, MjNhaP2 und MjNapA wurden mit Hilfe des Vektors pTrcHis2 TOPO[®] in *E. coli* exprimiert und konnten in Membranfraktionen immunchemisch nachgewiesen werden. Die theoretischen Molmassen der Fusionsproteine (siehe Kapitel 2.1.7) betragen 50 kD (MjNhaP1), 50 kD (MjNhaP2) und 46 kD (MjNapA). Nach Auftrennung durch SDS-PAGE weisen die Proteine scheinbare Molmassen von 40 kD (MjNhaP1), 40 kD (MjNhaP2) und 38 kD (MjNapA) auf (siehe Abbildung 3.16). Neben der monomeren Form konnten bei allen Proteinen auch Dimere mit apparenten Molmassen von etwa 80 kD nachgewiesen werden [Hellmer u. a. 2002]. Zudem trat eine weitere Bande auf, deren Molmasse etwa 3 kD kleiner war als die der monomeren Form. Die Bildung dieses verkürzten Produkts konnte weder durch den Einsatz von Proteaseinhibitoren noch durch die Verwendung proteasedefizienter Zellen reduziert werden. U.u. handelt es sich um Translationsprodukte, die an geninternen Startcodons initiiert werden, was kürzlich für einen archaebakteriellen Kaliumkanal gezeigt wurde [Jiang u. a. 2002].

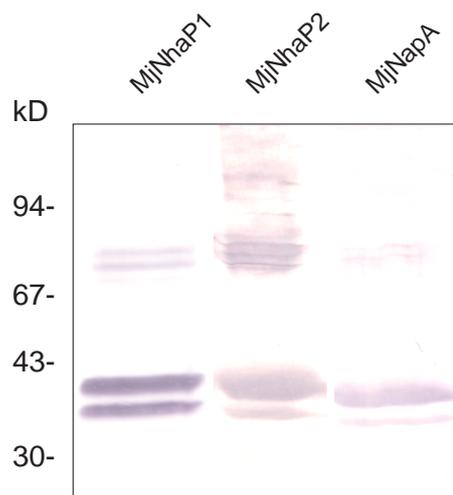


Abbildung 3.16: Immunchemischer Nachweis von MjNhaP1, MjNhaP2 und MjNapA. Evertierte Vesikel (40 μg Protein) sind durch SDS-PAGE aufgetrennt worden. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran elektrotransferiert und die myc-Epitope der Fusionsproteine mit Anti-myc Antikörper nachgewiesen.

3.7.1 Reinigung von MjNhaP1

Um die Grundlage für eine Kristallisation von MjNhaP1 zu schaffen sowie Rekonstitutionsexperimente zu ermöglichen, wurde ein Verfahren zu dessen Solubilisierung und Anreicherung entwickelt. Dazu wurde der Einfluss von Detergenzien, der NaCl Konzentration sowie des Detergenz-Lipidverhältnisses auf die Solubilisierung von MjNhaP1 untersucht. Desweiteren wurde eine Methode zur affinitätschromatographischen Reinigung mittels eines Imidazolgradienten erarbeitet. Aufgrund der niedrigen Expressionsrate von MjNhaP1 (1-3 μg Protein/ g Zellen) und der ebenfalls niedrigen Konzentration in gereinigten Fraktionen (1-2 $\mu\text{g ml}^{-1}$), wurde die Visualisierung immunchemisch durchgeführt.

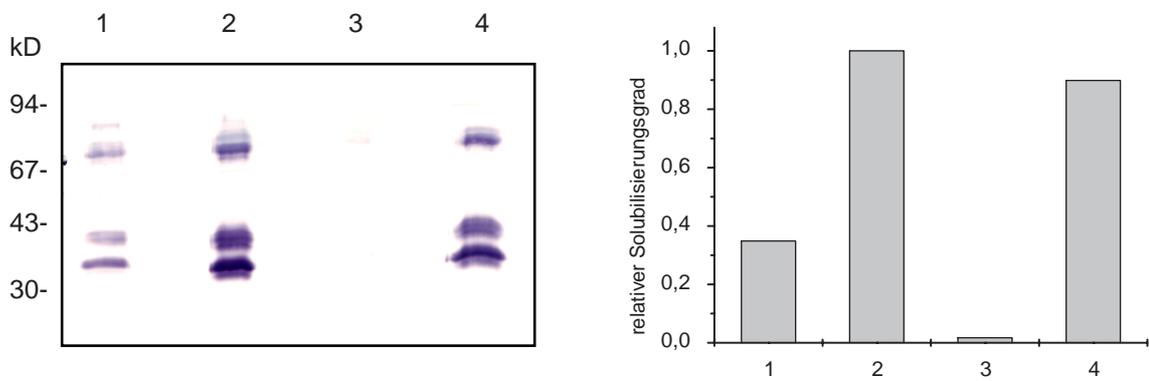


Abbildung 3.17: Einfluss von Detergenzien auf die Solubilisierung von MjNhaP1. *E. coli* Membranen (5 mg) wurden in 1 %-igen Lösungen der Detergenzien NP-40, NLS, CHAPS und DDM in Puffer A (50 mM KPi , 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol-HCl, 20 % Glycerin, pH 7,6), unter Verwendung eines Detergenz-Membranen Verhältnisses von 3:1 (w:w), solubilisiert. Nach 30 minütigem Schütteln der Suspension auf Eis wurden nicht solubilisierbare Bestandteile durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 200.000 $\times g$ entfernt. Der Überstand wurde mit 50 μl Ni-Sepharose Matrix versetzt und 60 min auf Eis geschüttelt. Nachfolgend wurde die Matrix 1 min bei 100 $\times g$ sedimentiert und der SDS-PAGE mit anschließendem Elektrotransfer unterzogen. (A) Immunchemischer Nachweis von MjNhaP1 mit anti-myc Antikörper nach Solubilisierung mit (1) NP40, (2) NLS, (3) CHAPS, (4) DDM. (B) Relativer Solubilisierungsgrad in Abhängigkeit des Detergenzes. Die immunchemischen Signalintensitäten wurden mit dem Programm Labimage (Kapelan) ausgewertet.

MjNhaP1 wurde in 1 %-igen Detergenzlösungen von N-Lauroylsarkosin (NLS, ionisch), Dodecylmaltosid (DDM, nichtionisch), Nonidet[®] P-40 (NP-40, nichtionisch) und CHAPS (zwitterionisch) in Lösung gebracht. Die beste Solubilisierungseffizienz wurde dabei mit NLS erzielt, so dass sich nach 30 minütiger Solubilisierung bei 0 °C etwa 75 % des Proteins in der löslichen Phase befand. Die Solubilisierungseffizienzen von DDM und NP-40 betragen etwa 90 % und 37 % der von NLS, während die von CHAPS mit etwa 2 % deutlich niedriger war. Trotz der effizienten Solubilisierung durch NLS wurde die weitere Optimierung der Reinigungsparameter in Gegenwart von DDM durchgeführt,

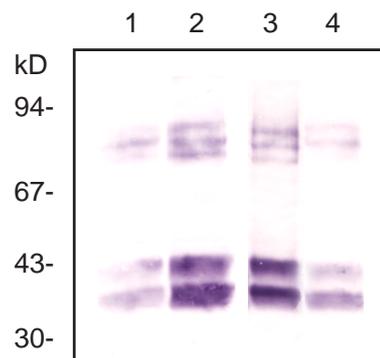


Abbildung 3.18: Immunchemischer Nachweis von MjNhaP1 nach Solubilisierung mit NLS. *E. coli* Membranen (5 mg) wurden in 1,5 ml Puffer S (50 mM KP_i , 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol-HCl, 20 % Glycerin, 1 % NLS, pH 7,6) 30 min bei 4° C solubilisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 200.000×g sedimentiert. Nach Zugabe von 50 μ l Ni-Sepharose Matrix wurde der Überstand unter Schütteln für 60 min auf Eis inkubiert. Das Sediment (Spur1) und die Affinitätsmatrix (Spur 2) wurden der SDS-Page mit nachfolgendem Elektrotransfer unterzogen und die Fusionsproteine mit anti-myc Antikörper nachgewiesen. Die Affinitätsmatrix einer identisch behandelten Probe wurde mit Puffer S1 (50 mM KP_i , 500 mM NaCl, 40 mM Imidazol-HCl, 20 % Glycerin, 0,1 % NLS) gewaschen und gebundenes Protein mit 3×300 μ l Puffer S2 (50 mM KP_i , 500 mM NaCl, 300 mM Imidazol-HCl, 20 % Glycerin, 0,1 % NLS, pH 7,6) eluiert. Nachfolgend wurde die Matrix (Spur 3) sowie 1/20 Volumen der vereinigten Eluatfraktionen (Spur 4) der SDS-PAGE unterzogen und wie bei den Proben 1 und 2 verfahren.

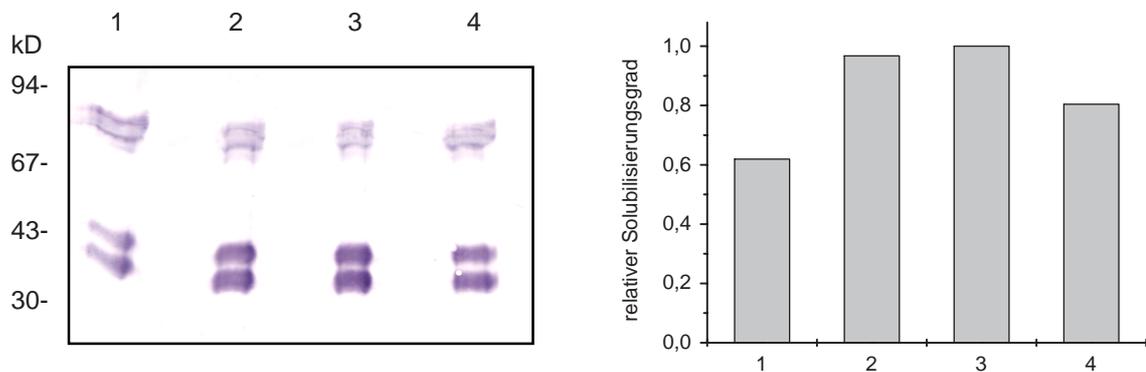


Abbildung 3.19: Einfluss des Detergenz-Lipidverhältnisses auf die Solubilisierung von MjNhaP1. 5 mg *E. coli* Membranen wurden mit variablen Detergenzmengen (5-20 mg) in Puffer A (50 mM KP_i , 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol-HCl, 20 % Glycerin, pH 7,6) bei einer DDM Konzentration von 1% solubilisiert. Nachfolgend sind die Fusionsproteine, wie in Abbildung 3.17 beschrieben, detektiert worden. (A) Immunchemischer Nachweis von MjNhaP1 nach Verwendung eines Detergenz-Lipidverhältnisses (w:w) von (1) 1:1, (2) 2:1, (3) 3:1, (4) 4:1. (B) Relativer Solubilisierungsgrad in Abhängigkeit des Detergenz-Lipidverhältnisses. Für die Quantifizierung der Bandenintensitäten wurde das Programm Labimage (Kape-lan) verwendet.

da MjNhaP1 unter dem Einfluss von NLS nichtlösliche Aggregate an der Affinitätsmatrix bildete, die nach einer Inkubationsdauer von 60 min etwa 15 % des Gesamtproteins ausmachten (siehe Abbildung 3.18). Neben der Wahl des Detergenzes hatte das Detergenz-Lipidverhältnis einen Einfluss auf die Solubilisierung. Untersucht wurden Detergenz-Lipidverhältnisse von 1:1-1:4 (w:w), wobei die höchste Solubilisierungseffizienz mit einem Detergenz-Lipidverhältnis von 1:3 erzielt wurde. Niedrigere aber auch höhere Detergenzkonzentrationen führten zu erniedrigter Effizienz. Während bei einem Verhältnis von 1:1 etwa 64 % der maximalen Proteinausbeute erreicht wurden, waren es bei einem Verhältnis von 1:4 etwa 82 % (siehe Abbildung 3.19).

Um den Einfluss von NaCl zu untersuchen, wurde MjNhaP1 in Gegenwart von NaCl Konzentrationen zwischen 0-500 mM solubilisiert. Die höchste Solubilisierungseffizienz trat bei einer Konzentration von 200-300 mM NaCl auf, während der prozentuale Anteil bei höheren und niedrigeren Konzentrationen abfiel. Bei 0 mM und 500 mM NaCl betrug die Proteinausbeute 65 %, bzw. 55 % des Maximalwertes (siehe Abbildung 3.20).

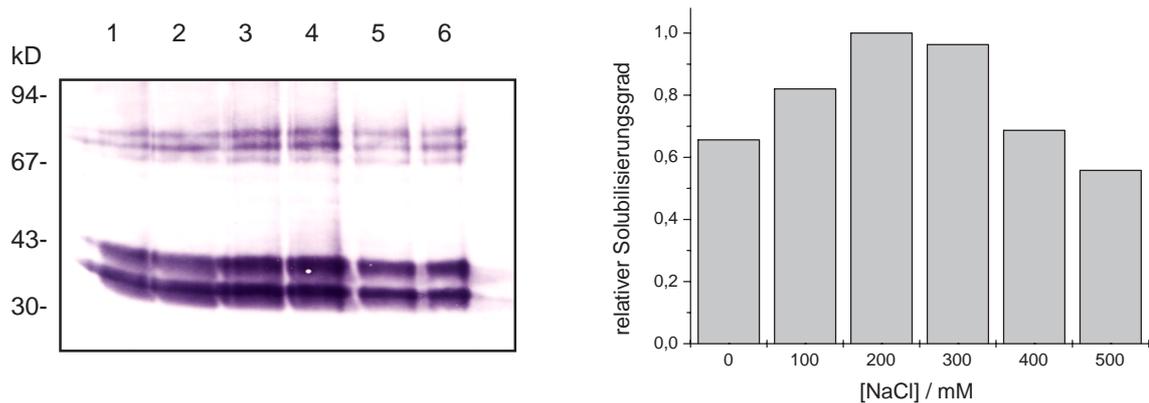


Abbildung 3.20: Einfluss der Salzkonzentration auf die Solubilisierung von MjNhaP1. 5 mg *E. coli* Membranen wurden bei einem Detergenz-Membranverhältnis von 3:1 (w:w) bei variabler NaCl Konzentration in Puffer B (50 mM KP_i , 0-500 mM NaCl, 10 mM Imidazol-HCl, 20 % Glycerin, 1% DDM, pH 7,6) solubilisiert. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte wie in Abbildung 3.17 beschrieben. (A) Immunchemischer Nachweis von MjNhaP1 nach Solubilisierung in Gegenwart von 0, 100, 200, 300, 400 und 500 mM NaCl (Spuren 1-5). (B) Relativer Solubilisierungsgrad in Abhängigkeit der Natriumkonzentration. Die Signalintensitäten des immunchemischen Nachweises wurden mit dem Programm Labimage (Kaplan) ausgewertet.

MjNhaP1 konnte mit Hilfe einer Ni-Sepharosematrix gereinigt werden. Dazu wurde solubiliertes Protein in Gegenwart von 10 mM Imidazol an die Matrix gebunden und durch Behandlung mit Imidazolkonzentrationen zwischen 10 und 500 mM eluiert. Die Dissoziation von MjNhaP1 von der Matrix geschah ab etwa 100 mM Imidazol. Bei 250 mM eluierte etwa 83 % des Proteins, während es bei 100 und bei 500 mM Imidazol 12 %, bzw. 3 % der Gesamtproteinmenge waren (siehe Abbildung 3.21).

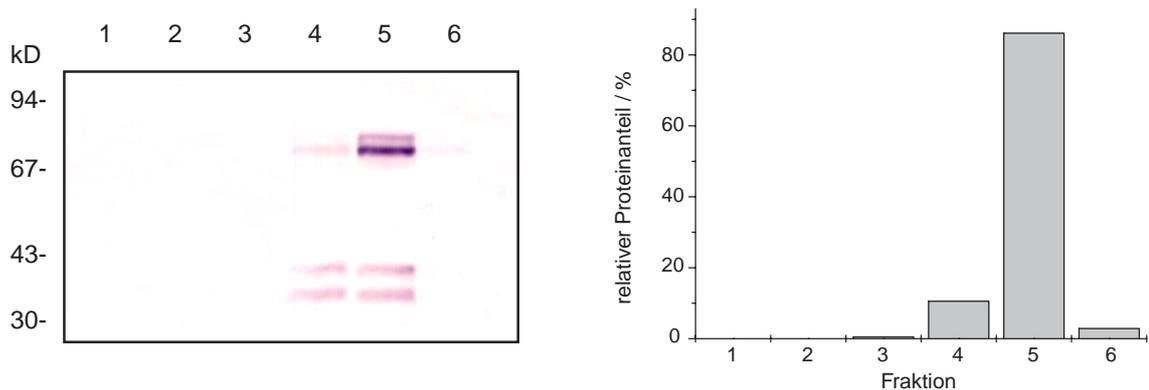


Abbildung 3.21: Elutionsverhalten von MjNhaP1. 5 mg *E. coli* Membranen wurden in Puffer B (50 mM KP_i, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol-HCl, 20 % Glycerin, 1 % DDM, pH 7,6), bei einem Detergenz-Lipidverhältnis von 3:1 (w:w), wie in Abbildung 3.17 beschrieben, solubilisiert und mit Ni-Sephrosematrix inkubiert. (A) Die Matrix wurde mit Imidazolkonzentrationen von 10, 20, 40, 100, 250 und 500 mM (Spuren 1-6) in Puffer C (50 mM KP_i, 300 mM NaCl, 20 % Glycerin, 0,1% DDM, pH 7,6) gewaschen und die Eluate der SDS-PAGE mit nachfolgendem Elektrottransfer unterzogen. Die immunchemische Detektion der Fusionsproteine erfolgte mit anti-*myc* Antikörper. (B) Prozentuale Verteilung von MjNhaP1 in den Eluatfraktionen. Zur Quantifizierung der immunchemischen Signale wurde das Programm Labimage (Kaplan) verwendet.

3.8 Messung der Na⁺/H⁺ Antiporteraktivität von MjNhaP1, MjNhaP2 und MjNapA in evertierten Vesikeln

Zur Bestimmung der Na⁺/H⁺ Antiporteraktivität von MjNhaP1, MjNhaP2 und MjNapA wurde der *E. coli* Stamm Frag114 (siehe Kapitel 2.2.2) mit den Plasmiden pMj0057, pMj1521 und pMj1275 transformiert. Als Negativkontrolle diente das Plasmid pTrcHis2B. Die daraus resultierenden Zelllinien wurden mit Frag114(pMj0057), Frag114(pMj1521), Frag114(pMj1275) und Frag114(pTrcHis2B) bezeichnet.

Frag(pTrcHis2B) Zellen weisen eine geringe Na⁺/H⁺ Antiporteraktivität bei pH-Werten oberhalb von 7,5 auf. Dieser Protonentransport ist bedingt durch einen unspezifischen K⁺/H⁺ Antiporter, dessen Transportkapazität durch Zugabe von 5 mM KCl zum Reaktionsmedium gesättigt werden kann [Brey u. a. 1980]. Die Protonentransportraten des Lactat/H⁺ Symporters variierten mit dem pH-Wert des Reaktionsmediums [Ten Brink und Konings 1980], wobei das Optimum bei etwa pH 7,5, dem zytoplasmatischen pH-Wert von *E. coli*, lag [Zilberstein u. a. 1982]. Der pH-Bereich, in dem eine ausreichende Aktivität für reproduzierbare Messungen vorlag, war zwischen pH 6,0 (ca. 30 % der Maximalaktivität) und pH 9,0 (ca. 15 % der Maximalaktivität).

In diesem pH-Bereich unterschieden sich evertierte Vesikel von Frag114(pMj1521) und Frag114(pMj1275) nicht signifikant von der Negativkontrolle. Vesikel von Frag114(pMj0057)

zeigten nach NaCl Zugabe einen Fluoreszenzanstieg über einen pH-Bereich von 6,0-7,5. Die prozentuale Fluoreszenzzunahme $(\Delta F_T/\Delta F_{ges}) \times 100$ (siehe Abbildung 3.22 und 3.28) war dabei abhängig vom pH-Wert des Reaktionsmediums. Sie betrug bei 20 mM NaCl $64 \pm 5\%$ (pH 6,0), $31 \pm 7\%$ (pH 6,5), $13 \pm 4\%$ (pH 7,0) und $6 \pm 4\%$ (pH 7,5).

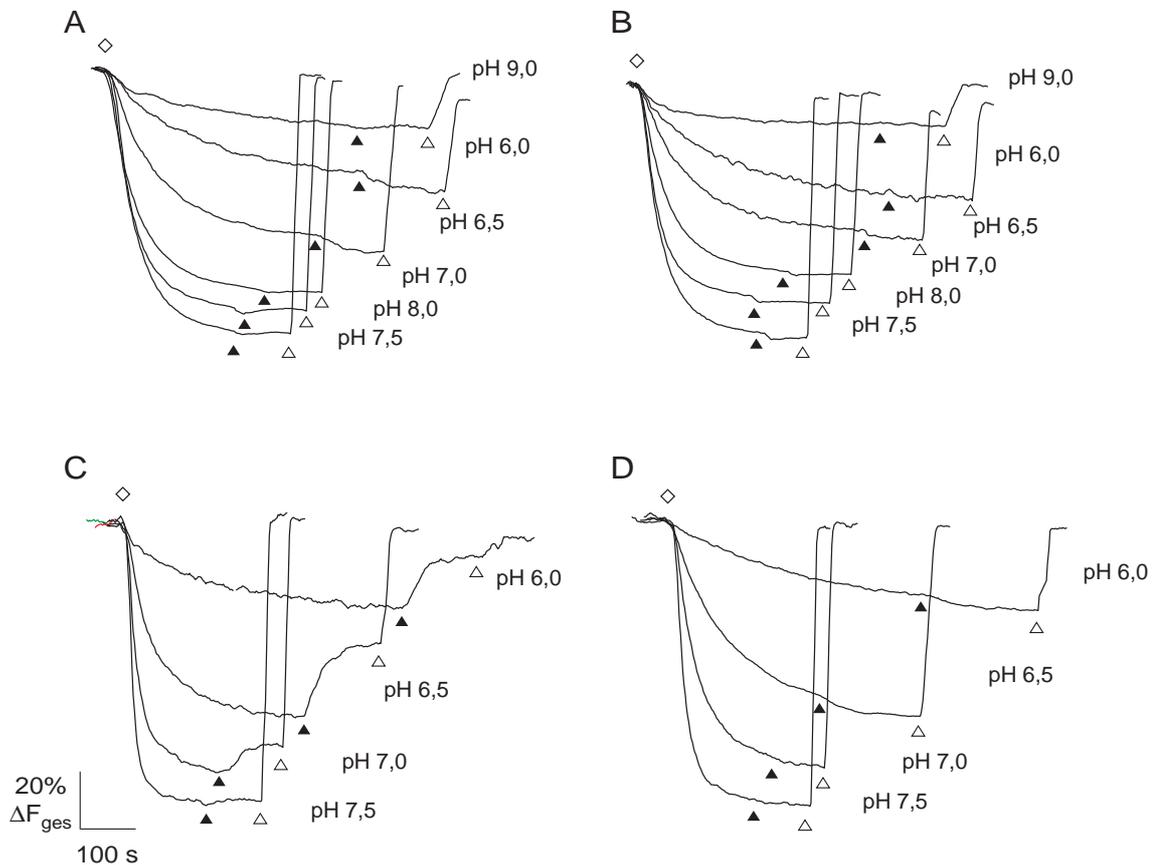


Abbildung 3.22: pH-Abhängigkeit der Na^+/H^+ Antiporteraktivitäten von MjNhaP1, MjNhaP2 und MjNapA in evertierten Vesikeln. Der *E. coli* Stamm Frag114 wurde mit den Plasmiden pMj1521 (A), pMj1275 (B), pMj0057 (C) sowie pTrcHis2B (D) als Negativkontrolle transformiert und evertierte Vesikel wie beschrieben präpariert. Die Reaktion wurde in einer 2 ml Küvette mit Rührereinheit bei 22 °C durchgeführt. Im Reaktionsansatz waren 10 mM MES/Tris (eingestellt auf den jeweiligen pH), 140 mM Cholinchlorid, 5 mM MgCl_2 , 5 mM KCl, 2 μM Acridinorange und 50 μl evertierte Vesikel enthalten. Zugabe von: (◇): 2 mM Tris-DL-Lactat (pH-Wert eingestellt auf den pH-Wert des Reaktionsmediums), (▲): 20 mM NaCl, (△): 25 mM NH_4Cl .

Die initiale Rate des Fluoreszenzanstiegs $(\Delta F_T/\Delta F_{ges}) \times s^{-1}$ war proportional zur NaCl Konzentration, so dass eine Bestimmung des scheinbaren K_M Wertes möglich war. Für einen pH-Wert von 6,0 betrug dieser etwa 10 mM (siehe Abbildung 3.23). Aufgrund der niedrigen Transportraten für LiCl war eine Auswertung nach dem Verfahren von Lineweaver und Burk nicht möglich. Der K_M Wert konnte daher lediglich anhand der LiCl Konzentration bei halbmaximaler Transportgeschwindigkeit abgeschätzt werden und betrug etwa 2,5 mM.

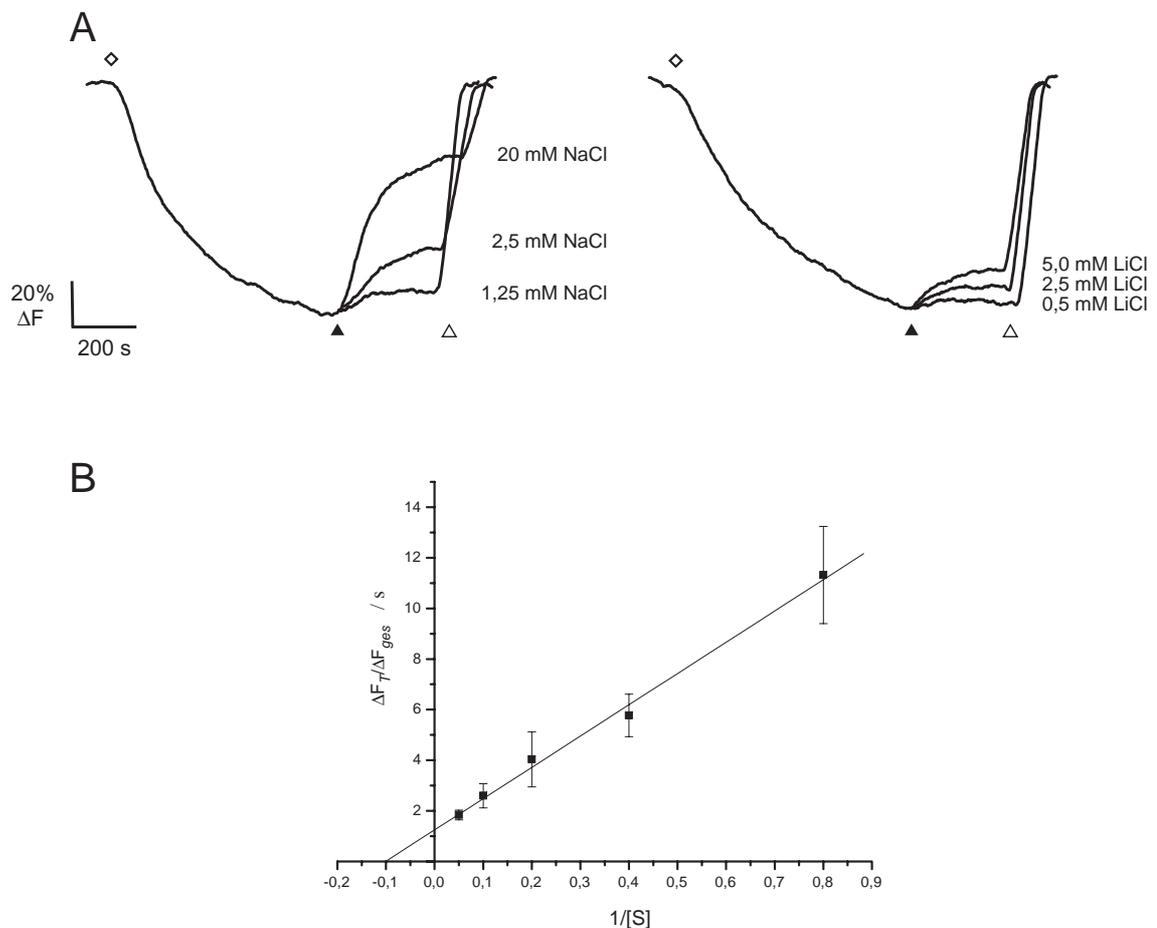


Abbildung 3.23: Konzentrationsabhängigkeit des Natrium- und Lithiumtransports von MjNhaP1. (A) Die Na⁺(Li⁺)/H⁺ Antiporteraktivität von evertierten Vesikeln wurde in Abhängigkeit der Na⁺ und Li⁺ Konzentration bei pH 6,0 ermittelt. Die Messungen sind bei 22 °C in einem Volumen von 2 ml in einer Küvette mit Rührereinheit durchgeführt worden. Der Reaktionsansatz enthielt 10 mM MES/Tris (pH 6,0), 140 mM Cholinchlorid, 5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 2 μM Acridinorange und 50 μl evertierte Vesikel (50 μg Protein). Zugabe von: (◇): 2 mM Tris-DL-Lactat, pH 6,0, (▲): NaCl oder LiCl (Konzentration wie angegeben), (Δ): 25 mM NH₄Cl. (B) $K_m(\text{Na}^+)$ Wert von MjNhaP1 in evertierten Vesikeln. Der K_m Wert wurde über die initiale Zunahme der Fluoreszenz nach Zugabe von NaCl berechnet. Dazu wurde die relative Änderung der Fluoreszenz ($\Delta F_T / F_{ges}$) pro Sekunde gegen die reziproke Substratkonzentration aufgetragen. Jeweils drei unabhängige Messungen wurden für die Berechnung verwendet.

3.9 Messung der Na⁺/H⁺ Antiporteraktivität von MjNhaP1 in Proteoliposomen

MjNhaP1 wurde in Proteoliposomen rekonstituiert, um die Effekte eines pH-Gradienten und des Membranpotentials unabhängig voneinander untersuchen zu können. Nach Suspension der Proteoliposomen in der Reaktionslösung baute sich an der Vesikelmembran ein pH-Gradient auf, wodurch die Fluoreszenzintensität von F_0 auf F_1 abfiel (siehe Kapitel 2.4.4). Der durch Leckströme

verursachte Anstieg des pH-Wertes im Vesikelinnern führte zu einem Fluoreszenzanstieg, der in Kontrollversuchen nach 300 s etwa 7 % von ΔF_{ges} ausmachte (siehe Abbildung 3.24 C). Während proteinfreie Liposomen nach Natriumzugabe keine Effekte bezüglich einer pH-Wert Änderung im Vesikelinnenraum zeigten, führte dies bei Liposomen in denen MjNhaP1 rekonstituiert war zu einer Entkopplung des pH-Gradienten. Dieses Phänomen wurde beobachtet, wenn durch Zugabe von Valinomycin ein Membranpotential an der Vesikelmembran existierte, während ein Protonengradient allein, nicht zu einer Aktivierung von MjNhaP1 führte (siehe Abbildung 3.24 A und B).

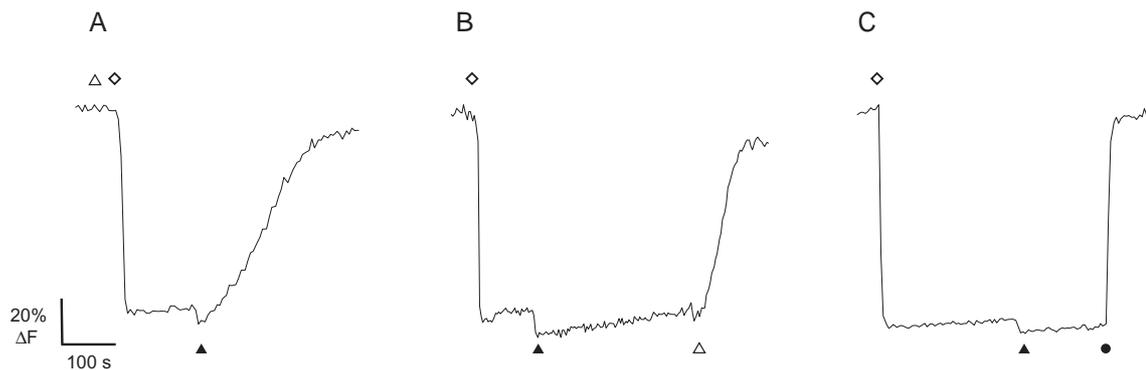


Abbildung 3.24: $\Delta\psi$ Abhängigkeit der MjNhaP1 Aktivität. Proteoliposomen ($20\text{ }\mu\text{l}$) wurden in 2 ml MTCM Puffer (10 mM MES/Tris , $140\text{ mM Cholinchlorid}$, 5 mM MgCl_2 , 5 mM KCl , $2\text{ }\mu\text{M Acridinorange}$, $\text{pH } 6,0$) suspendiert und unter konstantem Rühren mit einer Anregungswellenlänge von 495 nm bestrahlt. Zugabe von: (◇): Vesikeln, (▲): 20 mM NaCl , (Δ): $1\text{ }\mu\text{M Valinomycin}$, (●): $25\text{ mM NH}_4\text{Cl}$. (A) und (B): Vesikel mit rekonstituiertem MjNhaP1, (C) Kontrollvesikel ohne rekonstituiertes Protein

3.10 Komplementation des salzsensitiven Phänotyps von EP432 Zellen

Der *E. coli* Stamm EP432 zeichnet sich durch einen salzsensitiven Phänotyp aus, der durch die Deletion der Gene *nhaA* und *nhaB* bedingt ist (siehe Kapitel 2.2.2). Die Mutante ist nicht in der Lage bei $\text{pH } 7,5$ und einer NaCl Konzentration von $>50\text{ mM}$ zu wachsen [Pinner u. a. 1993]. Durch die plasmidvermittelte Expression verschiedener Na^+/H^+ Antiporter konnte der salzsensitive Phänotyp dieser oder vergleichbarer Mutanten komplementiert werden [Inoue u. a. 1999, Strausak u. a. 1993, Nozaki u. a. 1996].

Um zu überprüfen, ob MjNhaP1 in der Lage ist eine Salzresistenz zu vermitteln, wurden die Zelllinien EP432(pMj0057), EP432(pTrcHis2B) (Negativkontrolle) und TOP10(pTrcHis2B) (*nhaA*⁺, *nhaB*⁺, *chaA*⁺) in LBN Medien kultiviert, die unterschiedliche Konzentrationen an NaCl enthielten. TOP10(pTrcHis2B) Zellen waren in der Lage innerhalb von 15 Stunden bei einer NaCl Konzentration von 600 mM zu wachsen. Nach diesem Zeitraum waren EP432(pTrcHis2B) und

Zelllinie	[NaCl] / mM											
	0	20	40	60	80	100	150	200	400	600	800	
EP432(pMj0057)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EP432(pTrcHis2B)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOP10(pTrcHis2B)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabelle 3.1: Komplementation des salzsensitiven Phänotyps von EP432 Zellen. Die Zelllinien EP432(pMj0057), EP432(pTrcHis2B) und TOP10(pTrcHis2B) wurden 15 h bei 37 °C in LBK(Cam, Kan, Amp) kultiviert und nachfolgend in LBN(Cam, Kan, Amp) mit unterschiedlichen Konzentrationen von NaCl auf OD₆₀₀=0,005 verdünnt. Die Kultivierung wurde für 8 h fortgesetzt und das Wachstum der Zellen anhand der Absorptionsänderung bei 600 nm Wellenlänge beurteilt. (+): ΔOD_{600nm} > 0,01, (-): ΔOD_{600nm} < 0,01.

EP432(pMj0057) Zellen bis zu einer Konzentration von 40 mM NaCl gewachsen. Ein Einfluss von MjNhaP1 auf die Salztoleranz von EP432 Zellen konnte daher nicht festgestellt werden (siehe Tabelle 3.1).

3.11 Sequenzgerichtete Mutagenese von MjNhaP1

Trotz intensiver Forschung sind die molekularen Grundlagen des Transportmechanismus und der Regulation von Na⁺/H⁺ Antiportern bislang weitgehend ungeklärt. Die einzigen diesbezüglichen Hinweise wurden durch Mutagenesestudien erhalten bei denen man zwei Strategien, die sequenzgerichtete Mutagenese und die Zufallsmutagenese, verfolgte. Bei ersterer wurden zumeist geladene Aminosäuren ausgetauscht und nachfolgend die Auswirkungen auf die Ionentransportkapazität und die Ionenselektivität untersucht [Ostroumov u. a. 2002]. Die Zufallsmutagenese basiert auf der Selektion bestimmter phänotypischer Veränderungen und nachfolgender Identifikation der involvierten Aminosäuren [Noumi u. a. 1997]. Da MjNhaP1 nicht den salzsensitiven Phänotyp von EP432 Zellen komplementieren konnte [Hellmer u. a. 2002], kam nur das Verfahren der sequenzgerichteten Mutagenese in Frage, um Aussagen hinsichtlich des pH-Regulationsmechanismus und des Ionentransports machen zu können.

3.11.1 Homologieuntersuchungen von MjNhaP1

Zur Identifizierung funktionell relevanter Aminosäuren von MjNhaP1 wurde ein Sequenzvergleich mit Nhe1 (*H. sapiens*), NhaA (*E. coli*) und Antiportern der NhaP Familie durchgeführt. Dabei wurden insbesondere Histidinreste und Aminosäuren mit geladener Seitenkette berücksichtigt, da für diese bereits eine Funktion bei anderen Antiportern gezeigt wurde [Kizis u. a. 2001, Dibrov

u. a. 1998, Inoue u. a. 1995, Ostroumov u. a. 2002]. Die hierbei gefundenen Sequenzidentitäten dienten als Grundlage für die Auswahl der Aminosäuren bei der sequenzgerichteten Mutagenese.

Vier Aspartatreste (D65, D133, D163 und D164) befinden sich bei NhaA in transmembranären Sequenzabschnitten. D133, D163 und D164 (siehe Abbildung 3.25) sind für die Funktion des Transporters essentiell, während Mutationen von D65 zu veränderter Kationenselektivität führten [Padan u. a. 2001]. Der Sequenzvergleich zeigt, dass D132 und D161 (MjNhaP1) zu D133 und D164 (NhaA) homolog sind, während D93 (MjNhaP1) ausschließlich innerhalb der NhaP1 Familie konserviert ist (siehe Abbildung 3.14). Desweiteren ist E156 (MjNhaP1) zu E262 (Nhe1) homolog, welches die Kationenselektivität des menschlichen Transporters mitbestimmt (siehe Abbildung 3.25).

MjNhaP1 enthält fünf Histidinreste, die sich zwischen T7 und T8 (H211, H215), zwischen T11 und T12 (H333), sowie am C-Terminus (H425, H426) des Proteins befinden (siehe Abbildung 3.14 und 3.26). Keine dieser Aminosäuren ist innerhalb der NhaP Familie konserviert, noch bestehen Homologien zu Na⁺/H⁺ Antiportern anderer Klassen.

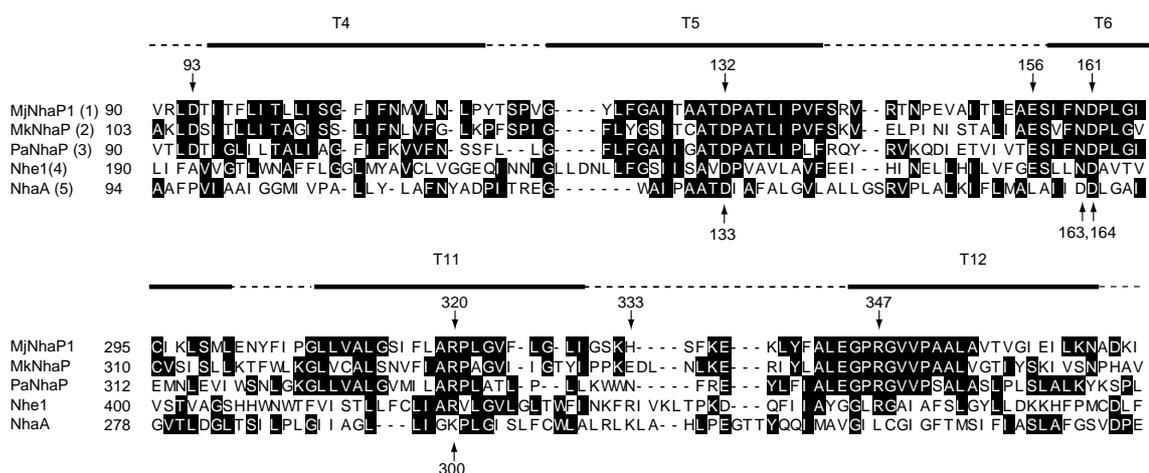


Abbildung 3.25: Homologien zwischen MjNhaP1, Nhe1, NhaA und anderen Antiportern der NhaP1 Familie. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm Megalign (DNA-Star) mit Hilfe des ClustalW Algorithmus durchgeführt. Für die Berechnungen wurden die Aminosäuren 90-168 und 295-369 (MjNhaP1) berücksichtigt. Transmembranäre Domänen (T) sind über dem Vergleichsschema gekennzeichnet. Ausgetauschte Aminosäuren von MjNhaP1 sind oberhalb des Vergleichsschemas markiert. Funktionell relevante Aminosäuren von NhaA sind unterhalb des Sequenzvergleichs gekennzeichnet. Zugangsnummer NhaA: Np_285709, MjNhaP1: NP_247021

Die NhaP1 Familie weist stark konservierte Sequenzbereiche in den transmembranären Domänen T11 und T12 auf (siehe Abbildung 3.25). Beide beinhalten je einen Argininrest (R320, bzw. R347) der u.a. auch beim menschlichen Na⁺/H⁺ Antiporter Nhe1 auftritt. Homologe Argininreste treten bei NhaA nicht auf, doch ist zu bemerken, dass sich an Aminosäureposition 300 ein Lysinrest befindet, der für die Funktion des Transporters relevant ist [Padan u. a. 2001].

Bei der sequenzgerichteten Mutagenese von MjNhaP1 wurden aufgrund der gefundenen Sequenzhomologien die geladenen Aminosäuren D93, D132, D161, E156, R320 und R347 gegen Alanin ausgetauscht. R320 wurde detaillierter untersucht und zusätzlich gegen Histidin und Aspartat ausgetauscht, um den Einfluss des pK-Wertes der Aminosäureseitenkette zu untersuchen. Da die Funktion von Histidinresten hinsichtlich der pH-Regulation für die Antiporter NhaA und *sod2* gezeigt worden ist, wurden, obwohl keine Homologien innerhalb der NhaP Familie ersichtlich sind, alle Histidinreste von MjNhaP1 gegen Arginin ausgetauscht oder deletiert (siehe Abbildung 3.26). Die Bezeichnungen der MjNhaP1 Mutanten und Wildtypformen sind in Tabelle A.4 und Tabelle A.5 aufgeführt.

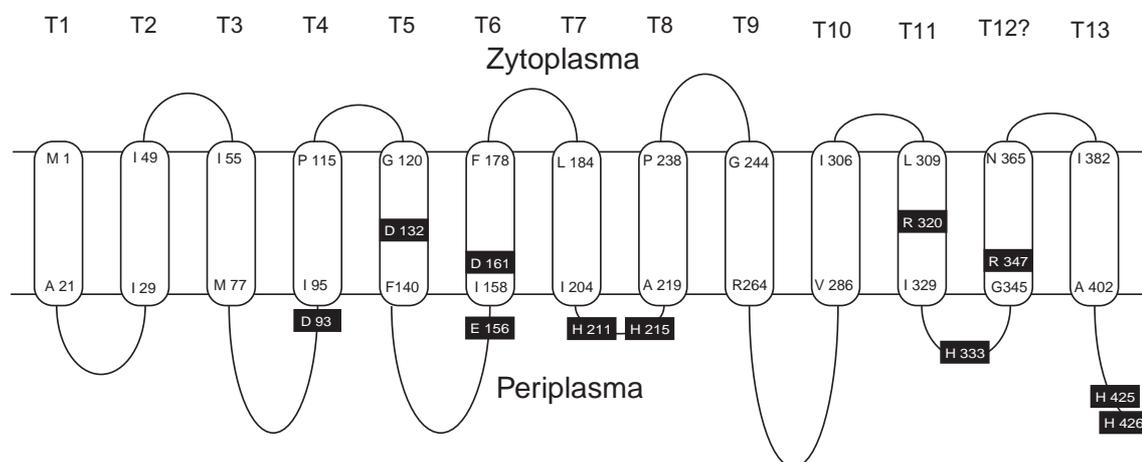


Abbildung 3.26: Schematisches Sekundärstrukturmodell von MjNhaP1. Die durch Mutagenese ausgetauschten Aminosäurereste sind schwarz unterlegt. Aminosäuren, die sich am Beginn, bzw. Ende einer transmembranären Domäne befinden, sind gekennzeichnet und transmembranäre Segmente mit T1-T13 nummeriert. Die Topologievorhersagen basieren auf den Daten der Kyte-Doolittle Analyse mit dem Programm Protean (DNA-Star).

3.11.2 Aktivitätsmessungen von MjNhaP1 Mutanten

Die Aktivitätsmessungen der MjNhaP1 Mutanten wurden, den Messungen von MjNhaP1, MjNhaP2 und MjNhaA analog, an evertierten Vesikeln durchgeführt (siehe Abbildung 3.27), die aus Frag114 Zellen präpariert wurden [Teubner 2003, Hellmer u. a. 2003]. Dabei erfolgte die Expression der Proteine mit Hilfe des pTrcHis2 TOPO[®] Vektors, so dass ein immunchemischer Nachweis in Membranpräparationen von *E. coli* aufgrund des myc-Fusionsproteins des Vektors möglich war ¹ (siehe Abbildung 3.28 D).

¹Der Klon H425Δ, H426Δ trägt ein Stopcodon am 3'-Ende des Mj0057 Gens, so dass das entsprechende Protein nicht immunaktiv ist.

Die Aktivitäten der Mutanten wurden auf die Aktivität des Wildtyps mit Fusionsprotein (WT-myc) bezogen, wobei die prozentuale Fluoreszenzzunahme nach NaCl Zugabe (ΔF_T) bezogen auf den gesamten Fluoreszenzanstieg (ΔF_{ges}) als Maß für die Transportaktivität diente.

Die Transportcharakteristik von WT-myc war gekennzeichnet durch eine kontinuierliche Abnahme des relativen Fluoreszenzanstiegs $\Delta F_T/\Delta F_{ges}$ zwischen pH 6,0 und pH 8,0 (siehe Abbildung 3.28). Diese Aktivierung bei saurem pH-Wert war ebenfalls charakteristisch für die Histidinmutanten H211R, H215R und H425 Δ , H426 Δ . Weder eine Verschiebung des pH-Optimums noch eine signifikante Änderung der Gesamtaktivität war zu beobachten (siehe Abbildung 3.27 und 3.28 A).

Der Austausch der negativ geladenen Aminosäuren D132 und D161 gegen Alanin führte dagegen zum Verlust der Antiporteraktivität innerhalb des gesamten Messbereichs. Durch immunchemischen Nachweis konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt nicht auf eine reduzierte Expressionsrate zurückzuführen ist (siehe Abbildung 3.28 D). Die Mutante D93A zeigte eine stark reduzierte Transportaktivität zwischen pH 6,0 und 8,0, so dass ausschließlich bei pH 6,0 und pH 6,5 ein Fluoreszenzanstieg beobachtet werden konnte. Keine signifikante Auswirkung auf die pH-Abhängigkeit Transports, hatte hingegen die Mutation E156A. Der Klon zeigte im Vergleich zum Wildtyp lediglich eine leicht erniedrigte Aktivität über den gesamten Messbereich (siehe Abbildung 3.28 A).

Die Mutation R320A führte zu einem vollständigen Verlust der Antiporteraktivität, wohingegen die Mutante R347A noch eine geringe Aktivität bei pH 6,0 besaß. Der immunchemische Nachweis zeigte, dass die verringerten Transportraten nicht mit einer gleichermaßen verringerten Expression einhergehen. Während der Klon R320D ebenfalls keine Transportaktivität aufwies, stimmte die Transportcharakteristik der Histidinmutante bezüglich der pH-abhängigen Aktivierung weitgehend mit der des Wildtyps überein. Lediglich eine leicht erniedrigte Aktivität bei pH 6,0 und 6,5 war zu beobachten.

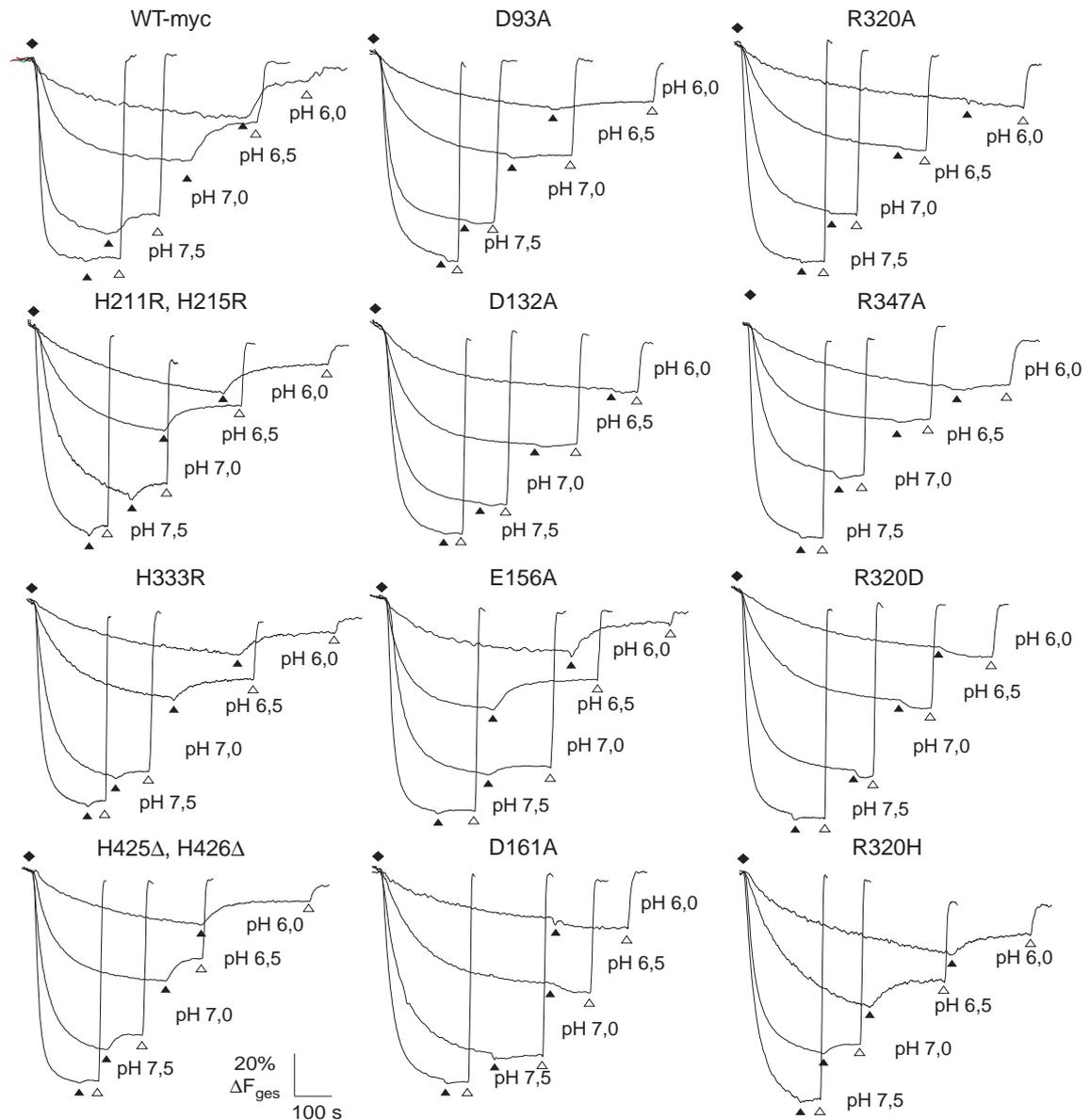


Abbildung 3.27: pH-Abhängigkeit des Natriumtransports von MjNhaP1 Mutanten. Evertierte Vesikel (50 μg Protein) wurden in 2 ml MTCM Puffer ((10 mM MES/Tris, 140 mM Cholinchlorid, 5 mM MgCl_2 , 5 mM KCl, 2 μM Acridinorange, eingestellt auf den jeweiligen pH-Wert) bei 20 °C in einer Küvette mit Rührereinheit mit Licht der Wellenlänge 495 nm bestrahlt und die Fluoreszenzemission bei 530 nm Wellenlänge gemessen. Zugabe von: (\diamond): 2 mM Tris-DL-Lactat (eingestellt auf den pH-Wert des MTCM Puffers), (\blacktriangle): 20 mM NaCl, (\triangle): 25 mM NH_4Cl .

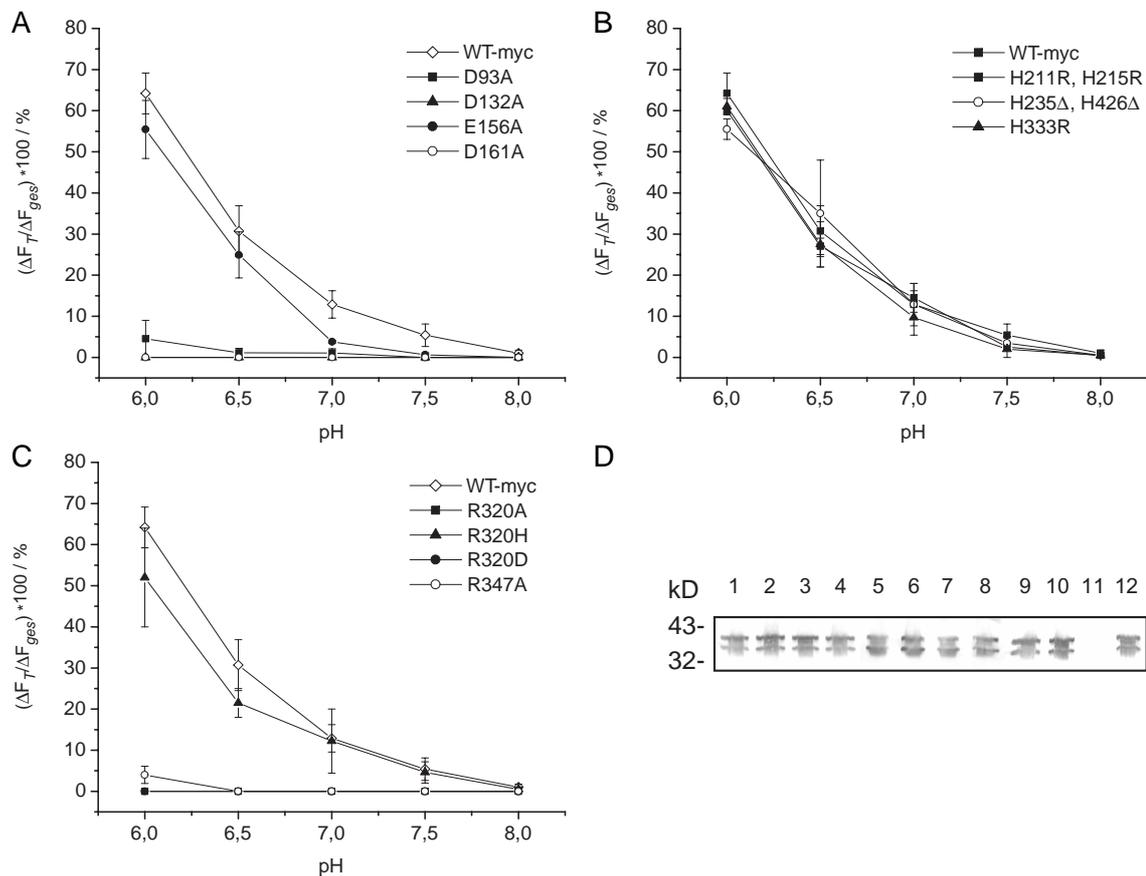


Abbildung 3.28: pH-Abhängigkeit des Natriumtransports von MjNhaP1 Mutanten (A-C). Evertierte Vesikel wurden von Frag114 Zellen präpariert, die die entsprechenden MjNhaP1 Mutanten exprimierten. Die Quantifizierung der Na^+/H^+ Antiporteraktivität erfolgte wie in Kapitel 2.3.4 und 2.4.3 beschrieben, wobei eine NaCl Konzentration von 20 mM verwendet wurde. Für die Bestimmung der Aktivität wurde die prozentuale Fluoreszenzzunahme nach NaCl Zugabe (ΔF_T) bezogen auf die maximale Fluoreszenzzunahme nach NH_4Cl Zugabe (ΔF_{ges}) berechnet. Jeweils drei unabhängige Messungen wurden dazu ausgewertet. (D) Immunchemischer Nachweis der MjNhaP1 Mutanten in Membranen von *E. coli*. Evertierte Vesikel (50 μg Protein) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, elektrotransferiert und die myc-Epitope der Fusionsproteine mit Anti-myc Antikörper nachgewiesen: (1) D93A, (2) D132A, (3) E156A, (4) D161A, (5) R320A, (6) R320H, (7) R320D, (8) R347A, (9) H211R, H215R, (10) H333R, (11) H425 Δ , H426 Δ (Konstrukt ohne myc-Epitop), (12) WT-myc.

Kapitel 4

Diskussion

Seit Mitte der 90er Jahre liefern genomische Sequenzierungsprojekte eine Fülle von Sequenzinformationen, deren Umfang derzeit etwa $28 \cdot 10^9$ Basenpaare ausmacht (www.ncbi.nlm.nih.gov). Darunter fallen 80 vollständig sequenzierte bakterielle Genome mit einer durchschnittlichen Größe von 3,3 MBp und ungefähr $2,7 \cdot 10^5$ offenen Leserahmen (www.tigr.org). Die Erforschung der Proteine und ihrer Funktion konnte jedoch mit der enormen Geschwindigkeit, mit der neue Sequenzen bekannt wurden, nicht schritthalten, was u.a. an dem vergleichsweise geringen Wissen über die Struktur archaebakterieller Proteine deutlich wird ¹. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, Ionentransporter und Ionenkanäle des marinen, hyperthermophilen Archaeobakteriums *M. jannaschii* zu untersuchen, um Aussagen bezüglich der Ionenhomöostase machen zu können. Dabei stand die Klonierung von Na^+/H^+ Antiporter- und Kaliumkanalgenen, die heterologe Expression der Genprodukte in *E. coli* sowie die Charakterisierung ihrer Funktionen mit Hilfe biophysikalischer, biochemischer und zellphysiologischer Verfahren im Vordergrund.

4.1 Die Na^+/H^+ Antiporter von *M. jannaschii*

Die Sequenzanalyse des *M. jannaschii* Genoms zeigte, dass drei offene Leserahmen, Mj0057, Mj1275 und Mj1521, existieren, deren Genprodukte zu Na^+/H^+ Antiportern homolog sind. Die Gene konnten kloniert und die entsprechenden Proteine, MjNhaP1, MjNhaP2 und MjNapA, in *E. coli* heterolog exprimiert werden [Hellmer u. a. 2002]. Mit Hilfe eines fluorimetrischen Messverfahrens wurde untersucht, ob die Proteine einen Natriumtransport in Gegenwart eines Protonengradienten vermitteln. Während dies bei MjNhaP1 der Fall war, konnte für MjNhaP2 und MjNapA keine Na^+/H^+ Antiporteraktivität nachgewiesen werden. Die möglichen Ursachen hierfür werden nachfolgend diskutiert.

¹Datenbankeinträge (www.pdb.org) *E. coli*: 2177, *M. jannaschii*: 55

Sequenzhomologien

MjNhaP2 weist Homologien zu YcgO, einem Osmoregulationsprotein von *E. coli*, auf. Der Funktionsmechanismus von YcgO ist bislang ungeklärt, es gibt jedoch Hinweise, dass das YcgO für die Regulation des Zellvolumens bei niedrigen Ionenstärken notwendig ist [Verkhovskaya u. a. 2001]. Es konnte ausgeschlossen werden, dass dies über einen protonengetriebenen Natriumtransport geschieht. Aufgrund der Sequenzhomologien ist es demnach möglich, dass es sich bei MjNhaP2 nicht um einen Na⁺/H⁺ Antiporter, sondern um ein Osmoregulationsprotein handelt.

Neben der Verwandtschaft zu Na⁺/H⁺ Antiportern weist MjNapA auch Sequenzhomologien zu den K⁺/H⁺ Antiportern KefC (*E. coli*) [Ferguson u. a. 1995] und Kha1 (*Saccharomyces cerevisiae*) auf [Ramirez u. a. 1998]. Zudem wurde beobachtet, dass Zellen, die MjNapA exprimieren, bei pH 8,0 eine erhöhte unspezifische Transportaktivität für Natrium aufweisen, die durch Kalium blockiert werden kann. Um diese Fragestellung zu klären, sind Messungen mit einer *E. coli* Mutante geplant, die keine K⁺/H⁺ Antiporteraktivität aufweist [Plack und Rosen 1980].

Temperatureinfluss auf Proteinaktivität und Faltung

Die Aktivität von Enzymen thermophiler Organismen ist gekennzeichnet durch eine starke Temperaturabhängigkeit. Für die P-Typ ATPase von *M. jannaschii* ist beispielsweise gezeigt worden, dass unterhalb von 40 °C keine Aktivität messbar ist [Morsomme u. a. 2002a]. Die mechanosensitiven Kanäle MscMj und MscMjLR (*M. jannaschii*) sind hingegen bei Raumtemperatur aktiv und benötigen vergleichbare (MscMjLR) oder gar niedrigere (MscMj) Aktivierungsenergien als der mechanosensitive Kanal Eco-MscL (*E. coli*) [Kloda und Martinac 2001].

Eine Temperaturabhängigkeit von Na⁺/H⁺ Antiportern hyperthermophiler Organismen ist bislang nicht untersucht worden, würde aber erklären, warum MjNhaP2 und MjNapA bei 20 °C nicht aktiv sind. Versuche, die Vesikelmessungen bei höheren Temperaturen durchzuführen, führten jedoch zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen, da oberhalb von 25 °C die Protonenleckströme zunahmen. Desweiteren sank die Protonentransportrate des Lactat/H⁺ Symporters, was vermutlich auf eine erhöhte Aktivität von Proteasen zurückzuführen ist.

Die optimale Wachstumstemperatur von *M. jannaschii* beträgt 86 °C [Bult u. a. 1996]. Derart hohe Temperaturen sind bei der Synthese thermostabiler Proteine mitunter notwendig, um eine korrekte Proteinfaltung zu gewährleisten, da für das 20S Proteasom von *M. jannaschii* gezeigt wurde, dass nach heterologer Expression in *E. coli* Proteinaktivität und Stabilität von der des Wildtyps abweichen [Frankenberg u. a. 2001]. Erst eine Denaturierung mit nachfolgender Rückfaltung bei 85 °C führte zu einem korrekt gefalteten Protein, das die Eigenschaften des Wildtypproteasoms aufwies.

Demnach wäre nicht auszuschließen, dass es bei der Expression von MjNhaP2 und MjNapA unter mesophilen Bedingungen zu einer Fehlfaltung kommt, die mit einem Verlust der Aktivität einhergeht.

Einfluss der Lipidkomposition auf die Proteinaktivität

Membranproteine sind in ihrer nativen Umgebung von Lipidmolekülen umgeben, deren Zusammensetzung zwischen den Spezies, aber auch in unterschiedlichen Wachstumsphasen einer Spezies beträchtlich variieren kann [Ungar u. a. 2001]. In Anpassung an die Lebensweise, synthetisieren hyperthermophile Organismen in Abhängigkeit der Temperatur makrozyklische Dietherlipide, Dietherlipide und Tetraetherlipide vor [Albers u. a. 2000], die mesophile Bakterien wie *E. coli* nicht aufweisen. Sie führen zu einer erniedrigten Fluidität der Membran, was notwendig ist, um bei Temperaturen von mehr als 86 °C eine niedrige Protonenpermeabilität zu gewährleisten.

Für den Kaliumkanal KcsA (*S. lividans*) ist kürzlich gezeigt worden, dass nur in Gegenwart einer definierten Lipidkomposition eine korrekte *in vitro* Assemblierung des Kanaltetramers und damit eine Funktion möglich ist [Cui und Adler 1996]. Es ist denkbar, dass bei MjNhaP2 und MjNapA ebensolche Lipidbindestellen existieren und dass die Lipidkomposition der *E. coli* Membran den Anforderungen an die Proteinfaltung von MjNhaP2 und MjNapA nicht gerecht wird.

4.1.1 Transportcharakteristik von MjNhaP1

MjNhaP1 wies in evertierten Vesikeln zwischen pH 6,0 und pH 7,5 eine pH abhängige Na⁺/H⁺ Antiporteraktivität auf, wobei die höchste Aktivität bei pH 6,0 gemessen wurde. Durch Messungen an evertierten Vesikeln kann ausschließlich der Einwärtsstrom von Natrium in den Vesikelinnenraum quantifiziert werden, der einem Auswärtsstrom aus der intakten Zelle entspricht. Demzufolge ist MjNhaP1 prinzipiell in der Lage, auswärtsgerichtete Natriumströme zu vermitteln. Eine Expression von MjNhaP1 in *E. coli* EP432 Zellen verbesserte jedoch nicht die Salztoleranz der Zelllinie, was auf den zytoplasmatischen pH-Wert von *E. coli*, welcher weitgehend konstant zwischen pH 7,6-7,8 liegt [Zilberstein u. a. 1982], zurückgeführt werden kann. Die Vesikelmessungen zeigen, dass MjNhaP1 bei pH 7,5 nur eine geringe Aktivität aufweist, während die Antiporter die NapA (*E. hirae*), NhaA (*H. pylori*) und SynNhaP1 (*Synechocystis spec.*), die in vergleichbaren Studien den salzsensitiven Pänotyp der Mutante komplementierten, in diesem pH Bereich aktiv sind [Strausak u. a. 1993, Inoue u. a. 1999, Hamada u. a. 2001].

Als eine weitere Ursache für die Eigenschaften von MjNhaP1 im Komplementationstest kommen die Transportraten des Antiporters in Betracht. MjNhaP1 benötigt für das Einstellen des Gleichgewichtszustandes F₂ bei vergleichbaren ΔF₇ Werten einen Zeitraum von Minuten, während dies bei

NapA, NhaA und SynNhaP1 innerhalb weniger Sekunden geschieht. Um eine Anreicherung von NaCl in der Zelle zu verhindern, müssen Auswärtstransport und Einwärtsstrom aber zumindest im Gleichgewicht stehen. Vermutlich wird dieses Kriterium unter den bei *E. coli* vorherrschenden Bedingungen (37 °C, pH 7,6) von MjNhaP1 nicht erfüllt.

4.1.2 Reinigung von MjNhaP1

Um eine Grundlage für die Rekonstitution und Kristallisation von MjNhaP1 zu schaffen, wurde ein Affinitätschromatographisches Reinigungsverfahren angewandt. Bezüglich der Solubilisierungsleistung wurde beobachtet, dass MjNhaP1 sich mit Hilfe von DDM und NLS effizient solubilisieren ließ, während die Proteinausbeuten mit NP40 und mit CHAPS deutlich niedriger waren. Trotz der guten Solubilisierungseffizienz erwies sich NLS jedoch als ungeeignet, da MjNhaP1 unter dessen Einfluss zur Bildung unlöslicher Proteinaggregate neigte. Insbesondere bei der Verwendung von Affinitätsmatrices ist dies bei Membranproteinen ein häufig beobachtetes Phänomen [Ungar u. a. 2001]. Zudem erwies sich DDM bei der Reinigung anderer NhaA und AtNhx1 als geeignet, da bezüglich der Proteinaktivität keine beeinträchtigenden Effekte beobachtet wurden [Venema u. a. 2002, Gerchman u. a. 1999], weshalb die Optimierung der Proteinreinigung in Gegenwart von DDM erfolgte.

Neben dem Einfluss von Detergenzien konnte ein Einfluss der Salzkonzentration und des Detergenz-Lipidverhältnisses auf die Solubilisierung von MjNhaP1 gezeigt werden. Die Schwankungsbreite hinsichtlich der Proteinausbeute war bei diesen Parametern deutlich niedriger, als es bei der Wahl des Detergenzes der Fall war. Dennoch kam es auch hier zu einer Optimierung, so dass sich ein Detergenz-Lipidverhältnis von 3:1 (w:w) und eine NaCl Konzentration von 200 mM als geeignet herausstellten.

Trotz der Optimierung der Solubilisierung ist zu bemerken, dass die Proteinkonzentration einer gereinigten Fraktion bei etwa 1-2 µg ml⁻¹ lag. Die Ursache hierfür ist vornehmlich die relativ niedrige Expressionsleistung unter Kontrolle des Trc Promotors, die zu Proteinausbeuten von etwa 1-3 µg Protein pro g *E. coli* Zellen führt. Um ausreichende Mengen für eine Proteinkristallisation bereitzustellen, soll künftig geklärt werden, ob eine Proteinexpression unter der Kontrolle eines T7 oder eines T5 Promotors zu verbesserten Ergebnissen führt.

Untereinheitenstöchiometrie der Na⁺/H⁺ Antiporter von *M. jannaschii*

Neben der monomeren Form wurden bei MjNhaP1, MjNhaP2 und MjNapA immunochemisch Dimere nachgewiesen. Eine weiterer Hinweis auf eine di- oder multimeren Untereinheitenstöchio-

metrie in der Detergenzmizelle liefert das Elutionsverhalten von MjNhaP1 bei affinitätschromatographischer Reinigung. Der Transporter dissoziiert bei einer Imidazolkonzentration von 100 mM (Ni^{2+} als komplexierendes Ion), während dies beim Kaliumkanal MjK1 (monomer) bereits bei einer Konzentration von 40 mM geschieht. Die Bildung von Di- oder Multimeren ist eine Eigenschaft, die auch auf andere Vertreter der Na^+/H^+ Antiporter Familie zutrifft, da ähnliche Beobachtungen bei der Reinigung des pflanzlichen Na^+/H^+ Antiporters AtNhx1 (*A. thaliana*) gemacht wurden [Venema u. a. 2002]. Zudem zeigen Quervernetzungsversuche und die Kristallstruktur, dass NhaA (*E. coli*) als Dimer vorliegt [Gerchman u. a. 2001, Williams 2000], so dass die Bildung von Dimeren eine Eigenschaft von Na^+/H^+ Antiportern zu sein scheint, die bei Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryoten gleichermaßen auftritt.

4.2 Sequenzgerichtete Mutagenese von MjNhaP1

Um Aussagen hinsichtlich der Struktur-Funktionsbeziehung bei Aminosäuren von MjNhaP1 machen zu können, wurde das Verfahren der sequenzgerichteten Mutagenese angewandt [Durell u. a. 1999], wobei Fragestellungen bezüglich des Transportmechanismus und der pH-Regulation bearbeitet wurden [Hellmer u. a. 2003].

Durch Austausch konservierter negativ geladener Aminosäuren konnte bestätigt werden, dass Aspartatreste am Kationentransport beteiligt sind. Die Mutationen D132A und D161A führten bei MjNhaP1 zu Verlust der Antiporteraktivität, was mit den Ergebnissen der Mutationsstudien über NhaA korreliert, da der Austausch der zu MjNhaP1 homologen Aminosäuren D133, D163 und D164 ebenso einen Funktionsverlust zur Folge hatte [Inoue u. a. 1995]. Ähnlich verhielt es sich bei sod2, bei welchem die Doppelmutation D266N-D267N zum Verlust der Na^+ und Li^+ Transportaktivität führte, während die Mutation D241N im Wesentlichen den Li^+ Transport beeinträchtigte [Dibrov u. a. 1998].

Die gegenwärtig akzeptierte Theorie bezüglich des Ionentransportmechanismus nimmt an, dass die negativ geladenen Seitenketten der Aspartatreste die Ladungen der transportierten Kationen in einer Struktur koordinieren, die einem Kronenether vergleichbar ist [Boyer 1988]. Die involvierten Aminosäuren müssen dabei nicht zwangsläufig in transmembranären Bereichen lokalisiert sein, sondern können sich, wie für Melibiose Permease (*E. coli*) angenommen, auch am Übergangsbereich zwischen wässriger und Lipidphase befinden [Poolman u. a. 1996].

Hinweise auf eine mögliche Porengeometrie können bislang nur aus den Röntgenstrukturdaten von NhaA abgeleitet werden, wobei die kristallographischen Daten zwei Bereiche niedriger Elektronendichte zeigen, die als Pore in Frage kämen [Williams 2000]. Beide putativen Porenbereiche werden durch je drei transmembranäre Domänen gebildet, die zu einer Art Bündel verdrillt sind.

Unter Annahme der Kronenethertheorie wäre ein Modell denkbar bei dem D132, D162 und D163 (NhaA) in zwei und D93, D132 und D161 (MjNhaP1) in drei dieser Domänen lokalisiert sind (siehe Abbildung 4.1). Letztendlich werden aber hochauflösende Röntgenstrukturanalysen notwendig sein, um diese Fragen zu klären.

Hinsichtlich der pH-Regulation konnten die Effekte, die der Austausch von Histidinresten von NhaA und *sod2* auf deren pH-Optimum hatte, nicht bestätigt werden. Die Mutation H225R führte bei NhaA zu einer Verschiebung des pH-Optimums zu sauren Werten, während *sod2* durch die Mutation H367R inaktiviert wurde [Rimon u. a. 1995, Dibrov u. a. 1998]. Die Mutationen H211R-H215R, H333R und H425 Δ -H426 Δ hatten jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das pH-Profil und die Aktivität von MjNhaP1, so dass eindeutige mechanistische Unterschiede bezüglich der pH-Regulation bei Antiportern angenommen werden müssen.

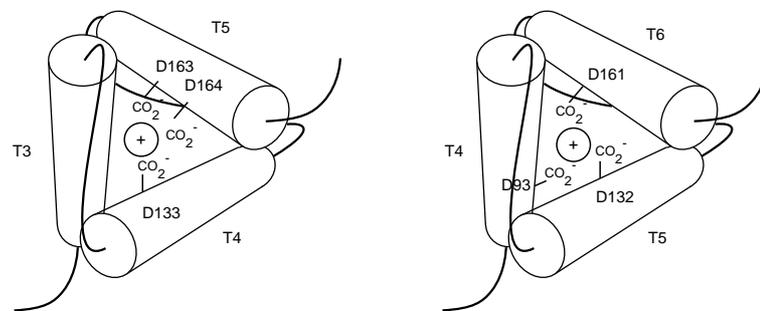


Abbildung 4.1: Hypothetisches Porenmodell von NhaA und MjNhaP1, basierend auf den Daten der Röntgenstrukturanalyse von NhaA und Mutagenesestudien von NhaA und MjNhaP1. Transmembranäre Domänen (T) sind durch Zylinder dargestellt. Das Modell zeigt die Pore mit Blick entlang der Porenachse. Ein Kation (+) befindet sich im Zentrum und wird von den Carbonylgruppen der Aspartatreste (siehe Text) koordiniert.

Die Untersuchungen an NhaA zeigten, dass nicht notwendigerweise (de)protonierbare Aminosäuren die pH-Regulation bestimmen, da ein Einfluss von Glycin gezeigt werden konnte. Die Mutation G338S hebt die pH-Regulation von NhaA vollständig auf und führt zu einer starken Aktivierung des Antiporters im pH-Bereich von 6,0-8,0 [Rimon u. a. 1998]. Konservierte Glycinreste existieren innerhalb der NhaP Familie und bei Nhe1 in unmittelbarer Nähe und sind daher interessant für künftige Mutagenesestudien.

Um den Einfluss basischer Aminosäuren bezüglich der Aktivität von MjNhaP1 zu studieren, wurden die konservierten Aminosäuren R320 und R347 gegen Alanin ausgetauscht. Während die Mutante R347 noch eine geringe Aktivität besaß, führte die Mutation R320A zum Verlust der Antiporteraktivität. Diese Ergebnisse korrelieren mit Mutagenesestudien an K300 (NhaA, siehe Abbildung 3.25), welches für die Funktion des Antiporters essentiell ist [Padan u. a. 2001].

Da der Austausch von R320 gegen Histidin, welches negativ geladen oder neutral ist, nur geringfügige Auswirkungen auf die Transportcharakteristik hatte, ist eine Positivladung (obwohl bei

vielen Antiportern an dieser Position konserviert) offensichtlich nicht notwendig für die Transportfunktion. Die gemeinsame Eigenschaft von Lysin, Arginin und Histidin sind NH-Gruppen. Die Annahme, dass diese Gruppen an H-Brücken beteiligt sind, würde erklären warum die R320H Mutation nur wenig Einfluss auf die Transportercharakteristik hat, während der Austausch von R320 gegen Aspartat zum Funktionsverlust von MjNhaP1 führt.

4.3 Die Kaliumkanäle von *M. jannaschii*

Drei Gene, Mj0138.1, Mj0139 und Mj1357, deren Genprodukte homolog zu Kaliumkanälen sind, wurden im Genom von *M. jannaschii* identifiziert [Bult u. a. 1996]. Die Gene wurden kloniert und die entsprechenden Genprodukte, MjK1, MjK2 und MjKch, heterolog in *E. coli* exprimiert [Hellmer und Zeilinger 2003].

4.3.1 Charakterisierung von MjK1

Mit Hilfe von Hydrophobizitätsuntersuchungen konnten zwei N-terminale transmembranäre Domänen bei MjK1 identifiziert werden, die den Selektivitätsfilter flankieren. Der C-Terminus, welcher etwa zwei Drittel des Proteins ausmacht, ist hydrophil und beinhaltet die konservierten Sequenzen TrkA-N und TrkA-C. Aufgrund des Hydrophobizitätsprofils und der Sequenzhologien zu MthK kann daher eine ähnliche Domänenorganisation für MjK1 angenommen werden. Während MthK jedoch durch Kalzium reguliert ist, weist die TrkA-N Domäne von MjK1 ein Rossmann Motiv auf, das bei Kaliumtransportern NAD/NADH bindet [Roosild u. a. 2002]. Eine Regulation von MjK1 durch NAD/NADH ist daher wahrscheinlicher, zumal keine zu MthK homologe Kalziumbindestelle existiert.

Der immunchemische Nachweis von MjK1 in *E. coli* Membranen zeigt, dass der Kanal als Tetramer vorliegt, so dass von einer funktionellen Expression ausgegangen werden kann. Im Komplementationstest ermöglichte MjK1 der *E. coli* Mutante LB2003 das Wachstum in Gegenwart von 1 mM KCl, wohingegen Kontrollzellen 100 mM KCl benötigten, um mit vergleichbaren Zellteilungsraten zu wachsen. Die vermittelten Kaliumströme sind demnach einwärtsgerichtet, so dass MjK1, im Gegensatz zu KcsA, offenbar unter den zellphysiologischen Bedingungen von *E. coli* geöffnet ist [Irizarry u. a. 2002].

Die minimale Kaliumkonzentration, die Wachstum von LB2003 Zellen ermöglichte, lag bei etwa 0,5 mM KCl. Diese Ergebnisse korrelieren mit den bei Pflanzen und Hefen gefundenen Werten (0,3 bzw. 0,6 mM KCl) und deuten darauf hin, dass MjK1 eine intrazelluläre Kaliumakkumulation vermitteln kann [Schroeder u. a. 1994, Sentenac u. a. 1992].

4.3.2 Charakterisierung von MjK2

Das Mj1357 Gen kodiert für ein Membranprotein mit zwei transmembranären Domänen, die eine für Kaliumkanäle typische Signatursequenz flankieren. Der C-Terminus weist, ebenso wie bei MjK1, die konservierten Domänen TrkA-N und TrkA-C und ein Rossmannmotiv auf, so dass bezüglich der Domänenorganisation und der Regulation die gleichen Annahmen gemacht werden können wie für MjK1.

Nach Expression von MjK2-CT in *E. coli* konnten zwei Proteine mit apparenten Molmassen von 41 kD und 32 kD immunchemisch nachgewiesen werden. Durch Peptidsequenzierung wurde gezeigt, dass p41 der vollen Länge von MjK2 entspricht, während es sich bei p32 um eine verkürzte Form von MjK2 handelt, deren Translation am dritten Startcodon des offenen Leserahmens beginnt [Hellmer 1998]. Ähnliche Beobachtungen wurden kürzlich für die Kaliumkanäle MthK und Kch beschrieben, bei denen es neben der Expression des gesamten Proteins zu einer Expression der RCK Domäne kam [Jiang u. a. 2002]. Da die separate Expression von RCK Domänen bei Kaliumkanälen aus drei unterschiedlichen Spezies beobachtet wurde, scheint es sich hierbei um einen konservierten Mechanismus zu handeln, der darauf hindeutet, dass es sich bei MjK2 um einen Kaliumkanal handelt.

Die nachgewiesenen Molmassen von MjK2 in *E. coli* Membranen sowie nach affinitätschromatographischer Reinigung entsprechen in beiden Fällen der Molmasse einer Kanaluntereinheit. Es wäre möglich, dass MjK2 aufgrund der denaturierenden Bedingungen bei der SDS-PAGE zerfällt. Die hohe SDS- und Thermostabilität bereits beschriebener Kaliumkanäle (KcsA, Kch und MthK) und insbesondere die außerordentliche Stabilität von Proteinen thermophiler Organismen sprechen jedoch gegen eine Sensitivität gegenüber SDS. Das Elutionsverhalten bei affinitätschromatographischer Reinigung deutet zudem darauf hin, dass MjK2 bereits vor der SDS-PAGE als Monomer vorliegt, da das Protein mit einer für Monomere typischen Konzentration von 40 mM Imidazol von der Matrix dissoziiert.

Die hohen Expressionausbeuten von MjK2, die Vitalität der Wirtszellen in Gegenwart hoher Kaliumkonzentrationen und die monomere Untereinheitenstöchiometrie deuten darauf hin, dass MjK2 nicht funktionell in *E. coli* exprimiert wird. Diese Befunde werden zusätzlich durch die Komplementationsexperimente gestützt, bei denen LB2003(pMj1357) Zellen nur unwesentlich schneller wuchsen als Zellen mit Kontrollplasmid. Es ist möglich, dass die leicht erhöhten Wachstumsraten der LB2003(pMj1357) Zellen in Gegenwart von 10 mM KCl auf einen kleinen Anteil funktionellem Kanalprotein zurückzuführen ist. Die unspezifische Induktion zelleigener Transporter, wie z.B. Tet^R, die ebenfalls in geringem Maße Kalium transportieren, können jedoch ebenfalls für einen solchen Effekt verantwortlich sein [Krulwich u. a. 2001].

Einfluss des Fusionsproteins auf die Tetramerisierung

MjK2 wurde mit N- und C-terminalen Fusionsproteinen versehen, um den Einfluss auf die Tetramerisierung zu untersuchen. Unabhängig von der Position der Fusionproteine kam es jedoch nicht zur Bildung von Tetrameren. Zudem wurde eine verkürzte Form von MjK2 erzeugt, die ausschließlich die transmembranären Domänen umfasste und damit eine zu KcsA analoge Struktur aufwies. Während die Expression von KcsA mit dem gleichen Vektorsystem keine Auswirkungen auf die tetramere Struktur hatte (Zeilinger, C., persönliche Mitteilung), konnten bei MjK2 überwiegend Monomere nachgewiesen werden. Unabhängig von der Proteinlänge und der Position des Fusionsproteins ist offenbar keine korrekte Assemblierung der MjK1 Untereinheiten unter den in *E. coli* vorherrschenden Bedingungen möglich.

***In vitro* Assemblierung von MjK2 Untereinheiten**

Ein *in vitro* Verfahren, welches stöchiometrische Mengen an Dimeren von MjK2 erzeugte, war die Inkubation in gebundenem Zustand auf einer Affinitätsmatrix über einen Zeitraum von mehreren Stunden. Da dieser Effekt zu einer Aggregation des Proteins an der Affinitätsmatrix führte, ist davon auszugehen, dass das Protein in einer denaturierten Form vorliegt, was für die Bestimmung physikochemischer Eigenschaften nicht geeignet erscheint.

Es wäre denkbar, dass Kofaktoren notwendig sind, um eine Assemblierung von MjK2 Untereinheiten zu ermöglichen. Versuche mit unterschiedlichen Detergenzien, Salzen und pH-Werten blieben weitgehend ohne Einfluss auf die Assemblierung [Klein 2002]. Es konnte dagegen gezeigt werden, dass bestimmte Lipidkompositionen zumindest eine teilweise Tetramerisierung von MjK2 herbeiführen können [Zeilinger u. a. 2003]. Diese Ergebnisse korrelieren mit den bereits genannten Studien über KcsA, bei denen eine *in vitro* Assemblierung durch Lipide induziert wurde [van Dalen u. a. 2002].

Einfluss der Porensequenz auf die Tetramerstabilität

Ein Vergleich der Sequenzen im Porenbereich verschiedener Kaliumkanäle zeigt, dass sich unmittelbar vor der Signatursequenz (G-Y-G-D) die Aminosäuren Valin oder Threonin befinden. Mutagenesestudien an KcsA zufolge, ist diese Aminosäureposition von maßgeblicher Bedeutung für die Tetramerstabilität. Der Austausch von V76 gegen Alanin und Glutamat führte in beiden Fällen dazu, dass eine Tetramerisierung bei Expression in *E. coli* ausblieb [Splitt u. a. 2000]. Es ist zu bemerken, dass die Kanäle KcsA, MjK1 und MthK, die in *E. coli* Tetramere bilden, an

bezüglich des Verhältnisses von mono- und tetramerer Form auftreten [Uozumi 2001], die mit dem Cardiolipin/Phosphatidylglycerin der Plasmamembran in Verbindung gebracht werden konnten [Ungar u. a. 2001]. Die Heterogenität hinsichtlich der Tetramerisierung von MjKch, könnte demnach durch Variabilitäten in der Fettsäurekomposition der *E. coli* Membran begründet sein.

Die funktionelle Expression von MjKch wird durch die Ergebnisse der Komplementation bestätigt. Hier ermöglichte der Kanal der *E. coli* Mutante das Wachstum in Gegenwart von 0,1 mM KCl. Das Wachstum ist bei diesen Konzentrationen jedoch deutlich eingeschränkt, so dass mindestens 0,25 mM KCl notwendig sind, um Wachstumsraten zu erreichen, die denen des Wildtyps gleichen [Hellmer und Zeilinger 2003, Sesti u. a. 2003]. Diese Werte korrelieren, ebenso wie die Befunde bei MjK1, mit den bei Pflanzen gefundenen Konzentrationen von etwa 0,3 mM K⁺ und deuten darauf hin, dass MjKch bei *M. jannaschii* als niedrigaffines Kaliumaufnahme-system fungiert [Schroeder u. a. 1994].

4.4 Toxizität von Kalium bei *E. coli*

Der *E. coli* Wildtyp reguliert die intrazelluläre Kaliumkonzentration hauptsächlich mit Hilfe der Kaliumaufnahme-systeme Trk, Kup und Kdp (siehe Kapitel 1.3 und Tabelle 4.1), während der Kaliumkanal Kch für die Kaliumaufnahme nicht von Bedeutung ist (Bakker, E. persönliche Mitteilung). Da die Zytoplasmamembran bezüglich der passiven Diffusion von K⁺ weitgehend undurchlässig ist, hat eine extrazelluläre Kaliumkonzentration von 100 mM KCl keine toxischen Effekte auf den *E. coli* Wildtyp. Durch die Expression von Kaliumkanälen kommt es jedoch zu einer erhöhten Kaliumpermeabilität der Zytoplasmamembran und, der Nernstschen Gleichung zu Folge, zu einer Abhängigkeit der intrazellulären Kaliumkonzentration vom Membranpotential sowie der extrazellulären Kaliumkonzentration (siehe Gleichung 4.2).

$$\Delta\psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K_i]}{[K_a]} \quad (4.1)$$

$$e^{\frac{\Delta\psi}{RT} F} [K_a] = [K_i] \quad (4.2)$$

Ein für *E. coli* typisches Membranpotential von -120 mV würde den Zellen demnach eine etwa 110-fache Kaliumakkumulation bezüglich des Außenmediums ermöglichen. Da die zytoplasmatische Kaliumkonzentration von *E. coli* bei ungefähr 100-200 mM liegt, erklärt dieses Modell warum LB2003 Zellen bei Expression von MjK1 und MjKch in Gegenwart von 1 mM KCl wachsen können, während bei 0,1 mM KCl keine ausreichende Versorgung der Zellen mit Kalium mehr gewährleistet ist [Meury und Kepes 1981].

Unter der Annahme, dass sich MjK1 elektrophysiologisch ähnlich verhält, wie der strukturanaloge Kanal MthK [Jiang u. a. 2002], läge das Umkehrpotential bei symmetrischer Kaliumverteilung (100 mM intrazellulär und extrazellulär) bei 0 mV (siehe Abbildung 4.3). Sobald die Zelle ein Membranpotential aufbaut, käme es demnach zur Depolarisation durch gleichzeitigen Kaliumeinstrom, so dass potentialgetriebene Transportvorgänge nicht möglich wären. Ein physiologisches Membranpotential von -120 mV hätte zudem eine intrazelluläre Kaliumakkumulation bis zu einer Konzentration von etwa 10 M zur Folge, was die Ursache der Toxizität von Kalium bei Expression von MjK1 sein kann.

Die intrazelluläre Kaliumkonzentration von *M. jannaschii* ist nicht bekannt. Da selbst die meisten nichthalophilen Archaeen eine höhere intrazelluläre Kaliumkonzentration aufweisen als *E. coli* (0,6-1,1 M), wären extrazellulär 6-11 mM Kalium tolerierbar, ohne dass es zu toxischen Effekten käme [Martin u. a. 1999]. Dies entspricht ungefähr den Kaliumkonzentrationen von 9,1-10,7 mM, die im Meerwasser, also dem Lebensraum von *M. jannaschii*, auftreten [Atkinson und Bingman 1997].

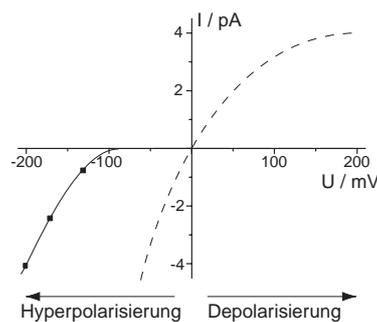


Abbildung 4.3: Stromspannungskennlinie von MjKch und MjK1. Durchgezogene Linie: Strom-Spannungskennlinie von MjKch bei Einzelkanalmessungen an Hefespheroblasten bei symmetrischer Kaliumverteilung. Unterbrochene Linie: Hypothetische Strom-Spannungskennlinie von MjK1 bei symmetrischer Kaliumverteilung, basierend auf den elektrophysiologischen Eigenschaften des strukturanalogen Kanals MthK (siehe Text).

Die toxischen Effekte in Gegenwart von 10 und 100 mM waren bei Expression von MjKch nur schwach ausgeprägt, so dass die Aktivität von MjKch reguliert zu sein scheint. Da MjKch ein Schwellenpotential (siehe Abbildung 4.3) von etwa 100 mV aufweist [Hellmer und Zeilinger 2003, Sesti u. a. 2003], käme es zur Inaktivierung des Kanals, sobald das Membranpotential durch Kaliumeinstrom gleich dem Schwellenpotential wird. Dieser Mechanismus würde einen weiteren Kaliumeinstrom verhindern und gewährleisten, dass das Membranpotential nicht unter das Schwellenpotential von MjKch abfallen kann. Die potentialgetriebenen Transportvorgänge der Zelle kämen damit nicht zum Erliegen, was als Ursache für die geringere Kaliumtoxizität bei Expression von MjKch in Betracht kommt. Die Beantwortung dieser Fragestellungen wird künftig durch die Bestimmung der intrazellulären Kaliumkonzentration von *M. jannaschii*, einer Messung

des Membranpotentials von *E. coli* (pMj0138.1) und *E. coli* (pMj0139) Zellen als Funktion der extrazellulären Kaliumkonzentration sowie durch eine elektrophysiologische Charakterisierung von MjK1 zu klären sein.

4.5 Natriumhomöostase von *M. jannaschii*

Die Ergebnisse des Komplementationstests zeigen, dass MjNhaP1 keinen Einfluss auf die Natriumsensitivität von *E. coli* Zellen hat, was u.a. auf den zytoplasmatischen pH-Wert von 7,6-7,8 bei *E. coli* zurückgeführt wird. Die Bestimmung der zytoplasmatischen pH-Werte der methanogenen Archaeen *Methanopirillum hungatei* GP1 und *Methanobacterium thermoautotrophicum* zeigt jedoch, dass Archaeobakterien mit pH 6,7 einen deutlich niedrigen zytoplasmatischen pH-Wert aufweisen können. Da MjNhaP1 bei pH 6,7 aktiv ist, ist eine Funktion bezüglich der Natriumextrusion bei *M. jannaschii* in Betracht zu ziehen. Mit einem $K_M(\text{Na}^+)$ Wert von 10 mM wäre MjNhaP1 aktiv, bevor Na^+ intrazellulär toxische Konzentrationen erreicht würden. Zudem wurde kürzlich eine P-Typ ATPase mit einem Aktivitätsoptimum bei pH 4,0 identifiziert [Morsomme u. a. 2002b], die diesen Prozess antreiben könnte (siehe Abbildung 4.4)

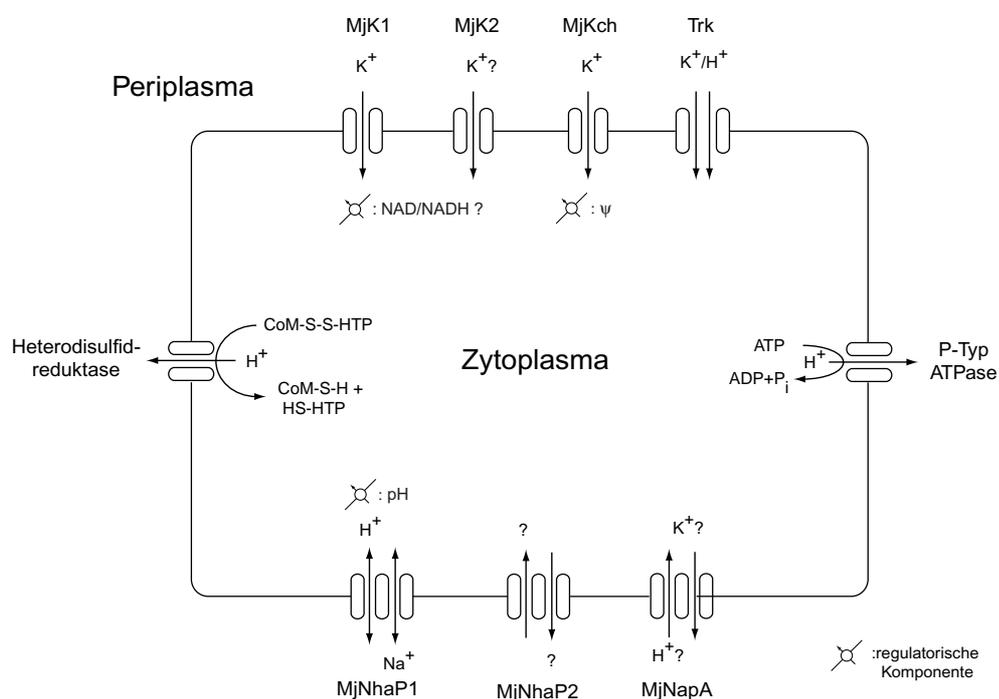


Abbildung 4.4: Na^+/H^+ Antiporter und Kaliumkanäle von *M. jannaschii*. Modellschema der in dieser Studie untersuchten Transporter und Kanäle. Primäre Transporter wie P-Typ ATPase (*) und Heterodisulfidreduktase (**) erzeugen die protonenmotorische Kraft für den Ionentransport. Datenbankzugangsnummern: (*) AAB99229, (**) Untereinheit (UE) A: Mj1190 (keine NCBI Zugangsnummer vorhanden), UE B1: AAB98737, UE B2: AAB98868, UE C1: AAB98730, UE C2: AAB98869.

Das Modell der Natriumextrusion durch MjNhaP1 wird zudem durch die Ergebnisse der Vesikelmessungen gestützt, bei denen auswärtsgerichteter Natriumtransport gezeigt wurden. Die Befunde der Rekonstitution belegen weiterhin, dass MjNhaP1 bezüglich der spannungsabhängigen Regulation und der pH-Regulation ähnliche Eigenschaften wie der Na⁺/H⁺ Antiporter aus *H. Halobium* aufweist. Da dieser Antiporter für die extreme Salztoleranz von *H. Halobium* verantwortlich gemacht wird, ist eine durch MjNhaP1 vermittelte Natriumextrusion für *M. jannaschii* wahrscheinlich. Der Vesikelttest zeigt jedoch ebenfalls, dass MjNhaP1 über einen zytoplasmatischen pH-Sensor verfügt, so dass eine Kontrolle des intrazellulären pH-Wertes, wie für Nhe1 und sod2 gezeigt, gleichermaßen möglich ist. *In vivo* Untersuchungen an *M. jannaschii* werden künftig zur Klärung dieser Fragen beitragen müssen.

4.6 Kaliumhomöostase von *M. jannaschii*

Ein Vergleich der Kaliumaufnahmesysteme von *M. jannaschii* und *E. coli* zeigt, dass mit Ausnahme von Trk keines der Transportsysteme bei *M. jannaschii* vorkommt (siehe Tabelle 4.1). *M. jannaschii* besitzt hingegen einwärtsrektifizierende Kaliumkanäle, die wiederum bei *E. coli* nicht auftreten. Da die Kaliumaufnahmesysteme von *M. jannaschii* mit Hilfe von Homologieuntersuchungen identifiziert wurden, ist jedoch nicht auszuschließen, dass andere nicht homologe Systeme existieren. Es wird jedoch deutlich, dass *E. coli* die Kaliumaufnahme ausschließlich über Transporter reguliert, während bei *M. jannaschii* Kanäle und Transporter diese Funktion gemeinsam übernehmen.

Der Transporter Trk wird bei *E. coli* konstitutiv exprimiert und transportiert Kalium mit niedriger Affinität ($K_M = 1$ mM). Es ist daher denkbar, dass Trk bei *M. jannaschii* eine analoge Funktion hat und die konstitutive Kaliumversorgung der Zelle gewährleistet. Da Kalium im Meerwasser in einer Konzentration von etwa 10 mM vorliegt, sind hochaffine Transportsysteme nicht notwendig, was wahrscheinlich die Ursache dafür ist, Transporter wie Kdp ($K_m = 2$ μ M) bei *M. jannaschii* nicht existieren.

Die Wechselzahlen von Transportern liegen jedoch um 4-5 Größenordnungen unter denen von Kaliumkanälen [Morais-Cabral u. a. 2001, Strausak u. a. 1993, Cabantchik 1999]. Um vergleichbare Transportraten für Kalium zu erzielen, müsste die Zelle demnach 10^4 - 10^5 mal mehr Transporter als Kaliumkanäle exprimieren. Die Synthese von Kaliumkanälen wäre demnach mit dem Vorteil einer deutlich geringeren Stoffwechselleistung der Zelle verbunden.

Bislang ist nicht bekannt, welchen Temperaturschwankungen und Konzentrationsgradienten *M. jannaschii* in seiner natürlichen Umgebung, den hydrothermalen Quellen, ausgesetzt ist. Temperatur- und Konzentrationsschwankungen in einer Umgebung von 86 °C und einem Druck

Kaliumtransporter		
<i>E. coli</i>	<i>M. jannaschii</i>	Identität [%]
TrkA (1)	TrkA (13*)	28,0
TrkE (2)	TrkE (14*)	24,7
TrkG (3)	TrkG (15*)	25,7
TrkH (4)	TrkG (15*)	26,2
Kup (5)	-	-
KdpFABC (6,7,8,9)	-	-
KdpDE (10,11)	-	-
Kaliumkanäle		
<i>E. coli</i>	<i>M. jannaschii</i>	Identität [%]
-	MjK1 (16)	-
-	MjK2 (17**)	-
Kch (12**)	MjKch (18)	-

Tabelle 4.1: Kaliumtransportsysteme bei *E. coli* und *M. jannaschii*. Die Proteindatenbank des NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) wurde mit Hilfe des BLAST Algorithmus und den von *E. coli* bekannten Sequenzen auf Kaliumkanäle und Kaliumtransporter untersucht. (*): bislang nicht untersuchtes Protein, (**): Protein untersucht aber keine Funktion nachweisbar. Die willkürliche Nummerierung bezieht sich auf die Zugangsnummer der ENTREZ Datenbank: (1) AAC76315, (2) AAC74373, (3) AAC74445, (4) AAC76852, (4) AAB98584, (5) AAC76770, (6) NP_415227, (7) AAC73792, (8) Q8X9F9, (9) AAC73790, (10) AAC73789, (11) NP_752709, (12) AAB60119, (13) AAB99108, (14) AAB98791, (15) AAB99495, (16) Q57604, (17) Q58752, (18) NP_247105.

von 200 Bar könnten jedoch eine schnelle Umverteilung von Kalium in Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen nötig machen, die mit Hilfe von Kaliumkanälen schneller stattfinden könnte, als mit Transportern.

Aufgrund der Ergebnisse der Komplementationsexperimente und der Sequenzanalyse ist ein Modell denkbar, bei dem MjKch die Kaliumaufnahme bei Membranpotentialen gewährleistet, die negativer als das Schwellenpotential sind, wodurch die Kaliumaufnahme unter der Kontrolle des Membranpotentials stünde. MjK1 hingegen wäre, in einer zu MthK analogen Weise, bei hohen und niedrigen Membranpotentialen aktiv, aber aufgrund des Rossman Motivs durch NAD/NADH reguliert (siehe Abbildung 4.4). Auf diese Weise wäre die Kaliumaufnahme durch zwei unterschiedliche Faktoren reguliert, die beide einen Indikator der Energiebilanz der Zelle darstellen.

Für MjK2 kommen unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften im Vergleich zu MjK1, oder regulative Mechanismen auf der Ebene der Expression und Transkription als Ursache für die Existenz eines dritten Kanalgenes in Betracht. Die Aktivität einiger eukaryotischer Kanäle wird

zudem durch die Bildung heteromerer Kanäle moduliert. Da MjK1 und MjK2 bezüglich der putativen Domänenorganisation starke Ähnlichkeiten aufweisen, ist die Bildung heteromerer Kanäle und eine damit verbundene Erweiterung der molekularen Adaptationsleistung nicht ausgeschlossen.

4.7 Abschließende Bemerkungen

Durch die Sequenzierung zahlreicher Genome richtete sich das Interesse der Forschung im letzten Jahrzehnt in zunehmendem Maße auf die Funktion von Membranproteinen. Verglichen mit dem Wissen über lösliche Proteine sind die Kenntnisse über Membranproteine jedoch vergleichsweise gering, da die Expression von Membranproteinen in vielen Fällen mit toxischen Effekten verbunden ist.

Diese Arbeit bietet erstmalig eine umfangreiche Charakterisierung aller putativen Na^+/H^+ Antiporter und Kaliumkanäle eines Organismus. Mit der auf Trc Promotoren basierenden Expression, wurde ein System gefunden, das selbst die Charakterisierung toxischer Proteine wie MjK1 in *E. coli* ermöglichte und damit für nahezu jedes Membranprotein geeignet erscheint. Zudem erlaubt das TOPO Verfahren die effiziente Klonierung von Genen, so dass problemlos ganze Proteinfamilien simultan untersucht werden können.

Durch die Verwendung der *E. coli* Mutanten EP432, Frag114 und LB2003 wurde weiterhin bestätigt, wie wichtig der Einsatz defizienter Bakterienstämme für die Untersuchung von Membranproteinen ist. Zahlreiche Na^+/H^+ Antiporter konnten bislang mit Hilfe von EP432 Zellen charakterisiert werden und LB2003 Zellen wurden zur Untersuchung pflanzlicher Kaliumkanäle eingesetzt. Die Charakterisierung archaebakterieller Kaliumkanäle und Na^+/H^+ Antiporter wird in der vorliegenden Arbeit jedoch erstmalig beschrieben.

Diese Arbeit zeigt, dass die Gesetzmäßigkeiten bezüglich der temperaturabhängigen Aktivierung, die für Enzyme aus thermophilen Organismen gelten, für Ionentransportsysteme nur in eingeschränktem Maße gültig sind. So konnte für MjNhaP1 eine Aktivität bei 22 °C und für MjK1 und MjKch eine Aktivität bei 37 °C gezeigt werden, obwohl die optimale Wachstumstemperatur von *M. jannaschii* bei 86 °C liegt. Mit dem zunehmenden Verständnis über die Funktion dieser Proteine, werden sich daher künftig in biotechnologischer Hinsicht Anwendungsmöglichkeiten ergeben, die nicht nur auf thermophile Organismen beschränkt sind. Dies ist insbesondere von Interesse, da Archaeobakterien häufig an extreme Standorte mit hohen Salzkonzentration, stark basischen/sauren pH-Werten oder hohen/niedrigen Temperaturen angepasst sind.

Anhang A

Tabellen

Schritt	Temperatur [°C]	Zyklusdauer [s]
1	94	120
2	94	30
3	55	30
4	72	60
Rücksprung zu Schritt 2: 30 mal		
5	72	300
6	4	Pause

Tabelle A.1: Standard PCR Programm

Gen	Funktion	Zugangsnummer NCBI Datenbank
Mj0138.1	Kaliumkanal	Q57604
Mj0139	Kaliumkanal	NP_247105
Mj1357	putativer Kaliumkanal	AAB99365
Mj0057	Na ⁺ /H ⁺ Antiporter	NP_247021
Mj1275	putativer Na ⁺ /H ⁺ Antiporter	NP_248271
Mj1521	putativer Na ⁺ /H ⁺ Antiporter	NP_248529

Tabelle A.2: Klonierte Gene von *M. jannaschii*

Gen	Expressionsvektor	Bezeichnung des Plasmids	Bezeichnung des Proteins
Mj0138.1	pTrcHis2 TOPO	pMj0138.1	MjK1
Mj0139	pTrcHis2 TOPO	pMj0139	MjKch
Mj1357	pTrcHis2B	pMj1357CT	MjK2-CT
	pTrcHisB	pMj1357NT	MjK2-NT
	pTrcHisB	pMj1357-303-NT	MjK2-101-NT
Mj0057	pTrcHis2 TOPO	pMj0057	MjNhaP1
Mj1275	pTrcHis2 TOPO	pMj1275	MjNapA
Mj1521	pTrcHis2 TOPO	pMj1521	MjNhaP2

Tabelle A.3: Plasmidkonstrukte und exprimierte Proteine.

Gen	Vektor	Primer
Mj0138.1	pTrcHis2 TOPO	A: 5'-ATG GAA ACT TAT GAG AAG ATA GAG CTT-3' B: 5'-TTC TAC TCC CTC AAC ATA TCT TTT TAA-3'
Mj0139	pTrcHis2 TOPO	A: 5'-ATG AAC TTA AAA GAT AGG CGG TTA AAG A-3' B: 5'-ATC TCC CTT TAA TGC CTT TTG TAA AGA G-3'
Mj1357	pTrcHisB	A: 5'-TAA gga tcc GAT GGA GAC GTC-3' B: 5'-AGC Caa gct tTC ATA ACT TTT TCT T-3'
Mj1357	pTrcHis2B	A: 5'-ATg gat ccG ATG GAG ACG TCA A-3' B: 5'-TTT GTT CTA GAa agc ttT GTA ACT-3'
Mj1357 303 Bp	pTrcHisB	A: 5'-TAA gga tcc GAT GGA GAC GTC-3' B: 5'-Taa gct tTC AAT TTT TCA TCT TTT TCA-3'
Mj0057 (WT- myc) WT	pTrcHis2 TOPO	A: 5'-ATG GAA CTT ATG ATG GCT ATT GGT TAC-3' B: 5'-ATG GTG GGA TTC TTC TTT ATA CTT TG-3' B: 5'-TCA ATG GTG GGA TTC TTC TTT ATA CTT TG-3'
Mj1275	pTrcHis2 TOPO	A: 5'-ATG GAA AGT TAT TAT TAT GTG TTC TTC-3' B: 5'-ATT TTT AGC TTT TTT ATT ACA TTT TGC-3'
Mj1521	pTrcHis2 TOPO	A: 5'-GTG AAT ATT GTA TTA TTT CTC GGC-3' B: 5'-GGA GGT TGA GGT CTT TCT TTT C-3'

Tabelle A.4: Primer für die Klonierung in Vektoren der pTrcHis Serie. Die erzeugten Restriktionsschnittstellen sind fettgedruckt (aagctt: *Bam*H I, ggatcc: *Hind* III). WT-myc: MjNhaP1 mit Fusionsprotein. WT: MjNhaP1 ohne Fusionsprotein (siehe Kapitel 2.1.7).

Mutation	Mutagene Primer	Codonaustausch
H211R,	A: 5'-CATACTCA c GGAAGTCACAA c GTATAAT-3'	CAT → CGT
H215R	B: 5'-ATTATAC g TTGTGACTTCC g TGAGTATG-3'	
H333R	A: 5'-GATAGGTTCAAAA g TTCATTTAAAGAAAAAC-3'	CAT → CGT
	B: 5'-GTTTTTCTTTAAATGAA c GTTTTGAACCTATC-3'	
ΔH425, ΔH426	A: 5'-GAAGCTTTTAGGATTCTTCTTTATACTTTG-3'	
D93A	A: 5'-GTAATTA AAAATGTTATTGTAG g CTAACCTC-3'	GAT → GCT
	B: 5'-GAGGTTAG c TACAATAACATTTTTAATTAC-3'	
D132A	A: 5'-GTTGCTGGG g CTGTAGCAG-3'	GAC → GCC
	B: 5'-CTGCTACAG c CCCAGCAAC-3'	
D161A	A: 5'-TATCCCAATGGG g CGTTAAAGAT A-3'	GAC → GCC
	B: 5'-TATCTTTAACG c CCCATTGGGAATA-3'	
E156A	A: 5'-TTAAAGATACTC g CCGCCTCTAAC-3'	GAG → GCG
	B: 5'-GTTAGAGGCGG c GAGTATCTTTAA-3'	
R320A	A: 5'-CCAAGAGGT g cTGCTAAGAATATAG-3'	AGA → GCA
	B: 5'-CTATATTCTTAGCA g cACCTCTTGG-3'	
R347A	A: 5'-ACAACACCT g cTGGTCCCTC-3'	AGA → GCA
	B: 5'-GAGGGACCA g cAGGTGTTGT-3'	

Tabelle A.5: Primer für die Sequenzgerichtete Mutagenese. Ausgetauschte Nukleotide sind durch fettgedruckte Kleinschrift hervorgehoben.

Medium	Zusammensetzung
LB	10 g l ⁻¹ Trypton 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt 171 mM NaCl
LBK	10 g l ⁻¹ Trypton 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt 87 mM KCl
LBN	10 g l ⁻¹ Trypton 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt 70 mM MES/Tris (pH 7,5) 200 mM NaCl
TB	23 g l ⁻¹ Hefeextrakt 12 g l ⁻¹ Proteinhydrolysat N-Z Amin 10 g l ⁻¹ Glycerin 54 mM K ₂ HPO ₄ 16 mM KH ₂ PO ₄
SOB	20 g l ⁻¹ Trypton 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄
SOC	20 g l ⁻¹ Trypton 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose
KML	46 mM Na ₂ HPO ₄ 23 mM NaH ₂ PO ₄ 8 mM NH ₄ SO ₄ 0,4 mM MgSO ₄ 6 μM FeSO ₄ 11 mM Glukose Thiaminhydrochlorid 1 mg l ⁻¹

Tabelle A.6: Flüssignährmedien für die Bakterienzellkultur

Antibiotikum	Eingesetzte Konzentration [$\mu\text{g ml}^{-1}$]
Ampicillin (Amp)	100
Kanamycin (Kan)	50
Choramphenicol (Cam)	50
Tetracyclin (Tet)	12

Tabelle A.7: Konzentrationen der für die Selektion eingesetzten Antibiotika

Elektrophoresepuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Sammelgel	6 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 125 mM Tris-HCl (pH 6,8) 0,1 % SDS 0,2 % TEMED 0,08 % APS
Trenngel	12 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 375 mM Tris-HCl (pH 8,8) 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,25 % TEMED 0,08 % Ammoniumpersulfat (APS)
Ladepuffer	0,35 M Tris-HCl (pH 6,8) 10,28 % SDS 36 % Glycerin 5 % Mercaptoethanol 0,012 % Bromophenolblau
Elektrotransferpuffer	48 mM Tris (pH 8,8) 35 mM Glycin 0,1 % SDS 20 % Methanol

Tabelle A.8: Reagenzien für SDS-PAGE und Elektrotransfer

Anhang B

Geräteliste

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Aufschlusszelle	French Pressure Cell	Aminco
Brutschrank	BV60 K1	Memmert
Dampfsterilisator	Varioklav 500	H+P Labortechnik
CCD-Kamera (Stickstofflaser)	Instaspec IV	Lot-Oriel-GmbH
Eismaschine	UBE-125	Ziegler
Elektrophoresekammer (Agarosegele)	BlueMarin 100	Serva
Elektroporator	2510 Electroporator	Eppendorf
Elektrotransferapparatur	Fastblot	Biometra
Feinwaage	MC1 Analytic AC 210 S	Sartorius
Fermenter	Biostat M	B. Braun
Heizblock	TechneDRi-Block DB-3	Thermo-Dux
Heizplatte mit Magnetrührer	IKAMAG RET	IKA Labortechnik
Kühlzentrifuge	Megafuge1.0R	Haereus Sepatech
Kühlzentrifuge	J2-MC Centrifuge	Beckman
Netzgerät (Agarosegele)	74557	Biometra
Netzgerät (SDS-PAGE)	Blue Power 3000	Serva
PCR-Gerät	Personal Cyclor	Biometra
pH-Meter	Metrohm 691	Herisau
Photometer	Uvikon Spectrophotometer 932	Kontron
Pipettierhilfe	Pipettus-Akku	Hirschmann
Reinluftbank	HBB2448 LaminAir	Haereus
Schüttler	Unimax 2010	Heidolph
Schüttler (Brutschrank)	Swip	Edmund Bühler
Schüttelheizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf
Spektrometer	MS125	Lot-Oriel-GmbH
Stickstofflaser	MSG 801 SD	LTB
Thermostat	KT-2	Haake
Thermostat	Polystat CC-1	Huber
Tischzentrifuge	miniSpin ^{plus}	Eppendorf
Ultrazentrifuge	Optima-TL	Beckman
Ultrazentrifuge	L8-70M	Beckman
Vakuumrotationsverdampfer	Alpha RVC	Christ
Waage	MC1 LC2200P	Sartorius
Wasserdemineralisierung	Milli-Q-Plus	Millipore

Anhang C

Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acridinorange	Merk
Acrylamid	Roth
Agar	Duchefa
Agarose	Eurogentech
Ammoniumchlorid	Sigma
Ammoniumpersulfat	Roth
Ampicillin	Roth
BCIP	Roth
Borsäure	Fluka
Bromphenolblau	Sigma
CHAPS	Roth
Chloramphenicol	Sigma
Cholinchlorid	Sima
Cobaltchlorid	Sigma
Coumarin 102	Sigma
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth
DDM	Glycon
DMSO	Sigma
DTT	Biomol
dNTP	Eurogentech
EDTA	Roth
Eisensulfat	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Glukose	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Duchefa
Imidazol	Sigma
IPTG	Duchefa
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumhydroxid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka

Substanz	Hersteller
Lactat	Merk
LB Medium	Bio101
Lithiumchlorid	Fluka
Magnesiumchlorid	Sigma
Mercaptoethanol	Sigma
Mes	Roth
Methanol	Roth
Milchpulver	handelsüblich
Natriumdihydrogenphosphat	Merk
Natriumhydroxid	Merk
NBT	Roth
Nickelsulfat	Sigma
N-Lauroylsarkosin	Fluka
Nonidet P-40	Fluka
Phosphatidylcholin Typ IV-S	Sigma
Pipes	Roth
Rinderserumalbumin	Roth
Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
SDS	Biomol
TB-Medium	Fluka
TEMED	Roth
Thiamin-HCl	Sigma
Tris	Roth
Trypton	Duchefa
Tween-20	Sigma
Valinomycin	Sigma

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematisches Modell verschiedener Transporterklassen.	2
1.2	Kaliumtransporter und Na ⁺ /H ⁺ Antiporter von <i>E. coli</i>	3
1.3	Struktur von NhaA	5
1.4	Schematisches Sekundärstrukturmodell verschiedener Kaliumkanaltypen.	7
1.5	Kaliumkanäle bei Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryoten	8
1.6	Strom-Spannungsbeziehung bei K _V -Kanälen.	9
1.7	Domänenorganisation von 6 TM Kanälen.	11
1.8	Strom-Spannungsdiagramm eines einwärtsrektifizierenden Kanals	12
1.9	Domänenorganisation von KcsA.	13
1.10	Domänenorganisation von MthK.	14
2.1	Vektorkarten: pCR [®] 4-TOPO und pTrcHis [®] Serie	19
2.2	Fluoreszenzemissionsspektrum von Acridinorange.	29
2.3	Aufbau des Laserspektrometers.	29
2.4	Modellschema eines evertierten Vesikels.	30
2.5	Modellschema eines Proteoliposoms.	31
3.1	Phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen der Kaliumkanäle von <i>M. jannaschii</i>	34

3.2	Hydrophobizitätsdiagramm der Kaliumkanäle MjK1 und MjK2	35
3.3	Sequenzvergleich von MjK1 und MjK2	36
3.4	Hydrophobizitätsdiagramm und Domänenorganisation von MjKch.	37
3.5	Sequenzvergleich von MjKch mit 6TM Kaliumkanälen pro- und eukaryotischer Herkunft.	38
3.6	Immunchemischer Nachweis von MjK1 und MjKch.	39
3.7	Affinitätschromatographische Reinigung von MjK2.	40
3.8	Untereinheitenstöchiometrie von MjK2 Konstrukten.	41
3.9	Einfluss von MjK1, MjK2 und MjKch auf das Wachstum von <i>E. coli</i>	42
3.10	Komplementation des kaliumabhängigen Phänotyps von LB2003 Zellen.	44
3.11	Wachstumsinhibition von LB2003(pMj0138.1) und LB2003(pMj0139) Zellen durch BaCl, CsCl und TEA.	45
3.12	Phylogenetische Verwandtschaft von MjNhaP1, MjNhaP2, MjNapA zu Antiportern pro- und eukaryotischer Organismen.	48
3.13	Hydrophobizitätsdiagramm der Na ⁺ /H ⁺ Antiporter von <i>M. jannaschii</i>	49
3.14	Sequenzvergleich von MjNhaP1 und MjNhaP2 mit Na ⁺ /H ⁺ Antiportern der NhaP Familie.	50
3.15	Sequenzvergleich von MjNapA1 mit Na ⁺ /H ⁺ Antiportern der NapA Familie.	51
3.16	Immunchemischer Nachweis von MjNhaP1, MjNhaP2 und MjNapA.	52
3.17	Einfluss von Detergenzien auf die Solubilisierung von MjNhaP1.	53
3.18	Immunchemischer Nachweis von MjNhaP1 nach Solubilisierung mit NLS.	54
3.19	Einfluss des Detergenz-Lipidverhältnisses auf die Solubilisierung von MjNhaP1.	54
3.20	Einfluss der Salzkonzentration auf die Solubilisierung von MjNhaP1	55
3.21	Elutionsverhalten von MjNhaP1.	56

3.22	pH-Abhängigkeit der Na ⁺ /H ⁺ Antiporteraktivitäten von MjNhaP1, MjNhaP2 und MjNapA in evertierten Vesikeln.	57
3.23	Konzentrationsabhängigkeit des Natrium- und Lithiumtransports von MjNhaP1. . .	58
3.24	Δψ Abhängigkeit der MjNhaP1 Aktivität.	59
3.25	Homologien zwischen MjNhaP1, Nhe1, NhaA und anderen Antiportern der NhaP1 Familie.	61
3.26	Schematisches Sekundärstrukturmodell von MjNhaP1.	62
3.27	pH-Abhängigkeit des Natriumtransports bei MjNhaP1 Mutanten	64
3.28	pH-Abhängigkeit des Natriumtransports bei MjNhaP1 Mutanten / Immunchemischer Nachweis von MjNhaP1 Mutanten	65
4.1	Porenmodell von NhaA und MjNhaP1	71
4.2	Sequenzvergleich im Porenbereich verschiedener Kaliumkanäle.	75
4.3	Stromspannungskennlinie von MjKch und MjK1.	77
4.4	Na ⁺ /H ⁺ Antiporter und Kaliumkanäle von <i>M. jannaschii</i>	78

Literaturverzeichnis

- [Albers u. a. 2000] ALBERS, S. V. ; VOSSENBERG, J. L. d. ; DRIESSEN, A. J. ; KONINGS, W. N.: Adaptations of the archaeal cell membrane to heat stress. In: *Front Biosci* 5 (2000), S. D813–20.
- [Altschul u. a. 1990] ALTSCHUL, S. F. ; GISH, W. ; MILLER, W. ; MYERS, E. W. ; LIPMAN, D. J.: Basic local alignment search tool. In: *J Mol Biol* 215 (1990), Nr. 3, S. 403–10.
- [Apse u. a. 1999] APSE, M. P. ; AHARON, G. S. ; SNEDDEN, W. A. ; BLUMWALD, E.: Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. In: *Science* 285 (1999), Nr. 5431, S. 1256–8. – 0036-8075 Journal Article
- [Atkinson und Bingman 1997] ATKINSON, M. J. ; BINGMAN, C.: Elemental composition of commercial seasalts. In: *Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences* 8 (1997), S. 39–43
- [Becker u. a. 1996] BECKER, D. ; DREYER, I. ; HOTH, S. ; REID, J. D. ; BUSCH, H. ; LEHNEN, M. ; PALME, K. ; HEDRICH, R.: Changes in voltage activation, Cs⁺ sensitivity, and ion permeability in H5 mutants of the plant K⁺ channel KAT1. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), Nr. 15, S. 8123–8.
- [Honer zu Bentrup u. a. 1997] BENTRUP, K. Honer z. ; UBBINK-KOK, T. ; LOLKEMA, J. S. ; KONINGS, W. N.: An Na⁺-pumping V1V0-ATPase complex in the thermophilic bacterium *Clostridium fervidus*. In: *J Bacteriol* 179 (1997), Nr. 4, S. 1274–9.
- [Bernard und Couturier 1992] BERNARD, P. ; COUTURIER, M.: Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA- topoisomerase II complexes. In: *J Mol Biol* 226 (1992), Nr. 3, S. 735–45.
- [Bernard u. a. 1994] BERNARD, P. ; GABANT, P. ; BAHASSI, E. M. ; COUTURIER, M.: Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. In: *Gene* 148 (1994), Nr. 1, S. 71–4.
- [Berneche und Roux 2001] BERNECHE, S. ; ROUX, B.: Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. In: *Nature* 414 (2001), Nr. 6859, S. 73–7.

- [Bossemeyer u. a. 1989] BOSSEMAYER, D. ; SCHLOSSER, A. ; BAKKER, E. P.: Specific cesium transport via the *Escherichia coli* Kup (TrkD) K⁺ uptake system. In: *J Bacteriol* 171 (1989), Nr. 4, S. 2219–21.
- [Boyer 1988] BOYER, P. D.: Bioenergetic coupling to protonmotive force: should we be considering hydronium ion coordination and not group protonation? In: *Trends Biochem Sci* 13 (1988), Nr. 1, S. 5–7.
- [Brey u. a. 1980] BREY, R. N. ; ROSEN, B. P. ; SORENSEN, E. N.: Cation/proton antiporter systems in *Escherichia coli*. Properties of the potassium/proton antiporter. In: *J Biol Chem* 255 (1980), Nr. 1, S. 39–44.
- [Brosius u. a. 1985] BROSIUS, J. ; ERFLE, M. ; STORELLA, J.: Spacing of the -10 and -35 regions in the *tac* promoter. Effect on its *in vivo* activity. In: *J Biol Chem* 260 (1985), Nr. 6, S. 3539–41.
- [Bruggemann u. a. 1993] BRUGGEMANN, A. ; PARDO, L. A. ; STUHMER, W. ; PONGS, O.: Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP. In: *Nature* 365 (1993), Nr. 6445, S. 445–8.
- [Bult u. a. 1996] BULT, C. J. ; WHITE, O. ; OLSEN, G. J. ; ZHOU, L. ; FLEISCHMANN, R. D. ; SUTTON, G. G. ; BLAKE, J. A. ; FITZGERALD, L. M. ; CLAYTON, R. A. ; GOCAYNE, J. D. ; KERLAVAGE, A. R. ; DOUGHERTY, B. A. ; TOMB, J. F. ; ADAMS, M. D. ; REICH, C. I. ; OVERBEEK, R. ; KIRKNESS, E. F. ; WEINSTOCK, K. G. ; MERRICK, J. M. ; GLODEK, A. ; SCOTT, J. L. ; GEOGHAGEN, N. S. ; VENTER, J. C.: Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. In: *Science* 273 (1996), Nr. 5278, S. 1058–73.
- [Cabantchik 1999] CABANTCHIK, Z. I.: Erythrocyte membrane transport. In: *Novartis Found Symp* 226 (1999), S. 6–16. – Using Smart Source Parsing discussion 16-9
- [Cassel u. a. 1986] CASSEL, D. ; KATZ, M. ; ROTMAN, M.: Depletion of cellular ATP inhibits Na⁺/H⁺ antiporter in cultured human cells. Modulation of the regulatory effect of intracellular protons on the antiporter activity. In: *J Biol Chem* 261 (1986), Nr. 12, S. 5460–6.
- [Cha u. a. 1999] CHA, A. ; SNYDER, G. E. ; SELVIN, P. R. ; BEZANILLA, F.: Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. In: *Nature* 402 (1999), Nr. 6763, S. 809–13.
- [Christian und Waltho 1962] CHRISTIAN, J. H. B. ; WALTHO, J. A.: In: *Biochim. Biophys. Acta*. 65 (1962), 506–508 S

- [Cortes u. a. 2001] CORTES, D. M. ; CUELLO, L. G. ; PEROZO, E.: Molecular architecture of full-length KcsA: role of cytoplasmic domains in ion permeation and activation gating. In: *J Gen Physiol* 117 (2001), Nr. 2, S. 165–80.
- [Cui und Adler 1996] CUI, C. ; ADLER, J.: Effect of mutation of potassium-efflux system, KefA, on mechanosensitive channels in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. In: *J Membr Biol* 150 (1996), Nr. 2, S. 143–52.
- [van Dalen u. a. 2002] DALEN, A. van ; HEGGER, S. ; KILLIAN, J. A. ; KRUIJFF, B. de: Influence of lipids on membrane assembly and stability of the potassium channel KcsA. In: *FEBS Lett* 525 (2002), Nr. 1-3, S. 33–8.
- [Derst und Karschin 1998] DERST, C. ; KARSCHIN, A.: Evolutionary link between prokaryotic and eukaryotic K⁺ channels. In: *J Exp Biol* 201 (1998), Nr. Pt 20, S. 2791–9.
- [Dibrov u. a. 1998] DIBROV, P. ; YOUNG, P. G. ; FLIEGEL, L.: Functional analysis of amino acid residues essential for activity in the Na⁺/H⁺ exchanger of fission yeast. In: *Biochemistry* 37 (1998), Nr. 23, S. 8282–8.
- [Doupnik u. a. 1995] DOUPNIK, C. A. ; DAVIDSON, N. ; LESTER, H. A.: The inward rectifier potassium channel family. In: *Curr Opin Neurobiol* 5 (1995), Nr. 3, S. 268–77.
- [Doyle u. a. 1996] DOYLE, D. A. ; LEE, A. ; LEWIS, J. ; KIM, E. ; SHENG, M. ; MACKINNON, R.: Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein- binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. In: *Cell* 85 (1996), Nr. 7, S. 1067–76.
- [Doyle u. a. 1998] DOYLE, D. A. ; MORAIS CABRAL, J. ; PFUETZNER, R. A. ; KUO, A. ; GULBIS, J. M. ; COHEN, S. L. ; CHAIT, B. T. ; MACKINNON, R.: The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. In: *Science* 280 (1998), Nr. 5360, S. 69–77.
- [Durell u. a. 1999] DURELL, S. R. ; HAO, Y. ; NAKAMURA, T. ; BAKKER, E. P. ; GUY, H. R.: Evolutionary relationship between K(+) channels and symporters. In: *Biophys J* 77 (1999), Nr. 2, S. 775–88.
- [Dzioba u. a. 2002] DZIOBA, J. ; OSTROUMOV, E. ; WINOGRODZKI, A. ; DIBROV, P.: Cloning, functional expression in *Escherichia coli* and primary characterization of a new Na⁺/H⁺ antiporter, NhaD, of *Vibrio cholerae*. In: *Mol Cell Biochem* 229 (2002), Nr. 1-2, S. 119–24.
- [Epstein 1992] EPSTEIN, W.: Kdp, a bacterial P-type ATPase whose expression and activity are regulated by turgor pressure. In: *Acta Physiol Scand Suppl* 607 (1992), S. 193–9. – Using Smart Source Parsing

- [Epstein und Kim 1971] EPSTEIN, W. ; KIM, B. S.: Potassium transport loci in *Escherichia coli* K-12. In: *J Bacteriol* 108 (1971), Nr. 2, S. 639–44.
- [Evan u. a. 1985] EVAN, G. I. ; LEWIS, G. K. ; RAMSAY, G. ; BISHOP, J. M.: Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto- oncogene product. In: *Mol Cell Biol* 5 (1985), Nr. 12, S. 3610–6.
- [Ferguson u. a. 1995] FERGUSON, G. P. ; MCLAGGAN, D. ; BOOTH, I. R.: Potassium channel activation by glutathione-S-conjugates in *Escherichia coli*: protection against methylglyoxal is mediated by cytoplasmic acidification. In: *Mol Microbiol* 17 (1995), Nr. 6, S. 1025–33.
- [Fink u. a. 1996] FINK, M. ; DUPRAT, F. ; LESAGE, F. ; REYES, R. ; ROMÉY, G. ; HEURTEAUX, C. ; LAZDUNSKI, M.: Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. In: *Embo J* 15 (1996), Nr. 24, S. 6854–62.
- [Frankenberg u. a. 2001] FRANKENBERG, R. J. ; HSU, T. S. ; YAKOTA, H. ; KIM, R. ; CLARK, D. S.: Chemical denaturation and elevated folding temperatures are required for wild-type activity and stability of recombinant *Methanococcus jannaschii* 20S proteasome. In: *Protein Sci* 10 (2001), Nr. 9, S. 1887–96.
- [Gassel und Altendorf 2001] GASSEL, M. ; ALTENDORF, K.: Analysis of KdpC of the K⁽⁺⁾-transporting KdpFABC complex of *Escherichia coli*. In: *Eur J Biochem* 268 (2001), Nr. 6, S. 1772–81.
- [Geck und Pfeiffer 1985] GECK, P. ; PFEIFFER, B.: Na⁺ + K⁺ + 2Cl⁻ cotransport in animal cells—its role in volume regulation. In: *Ann N Y Acad Sci* 456 (1985), S. 166–82. – Using Smart Source Parsing
- [Gerchman u. a. 1993] GERCHMAN, Y. ; OLAMI, Y. ; RIMON, A. ; TAGLICHT, D. ; SCHULDNER, S. ; PADAN, E.: Histidine-226 is part of the pH sensor of NhaA, a Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993), Nr. 4, S. 1212–6.
- [Gerchman u. a. 1999] GERCHMAN, Y. ; RIMON, A. ; PADAN, E.: A pH-dependent conformational change of NhaA Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporter of *Escherichia coli* involves loop VIII-IX, plays a role in the pH response of the protein, and is maintained by the pure protein in dodecyl maltoside. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Nr. 35, S. 24617–24.
- [Gerchman u. a. 2001] GERCHMAN, Y. ; RIMON, A. ; VENTURI, M. ; PADAN, E.: Oligomerization of NhaA, the Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* in the membrane and its functional and structural consequences. In: *Biochemistry* 40 (2001), Nr. 11, S. 3403–12.
- [Gulbis u. a. 1999] GULBIS, J. M. ; MANN, S. ; MACKINNON, R.: Structure of a voltage-dependent K⁺ channel beta subunit. In: *Cell* 97 (1999), Nr. 7, S. 943–52.

- [Gulbis u. a. 2000] GULBIS, J. M. ; ZHOU, M. ; MANN, S. ; MACKINNON, R.: Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage- dependent K⁺ channels. In: *Science* 289 (2000), Nr. 5476, S. 123–7.
- [Hamada u. a. 2001] HAMADA, A. ; HIBINO, T. ; NAKAMURA, T. ; TAKABE, T.: Na(+)/H(+) Antiporter from *Synechocystis* Species PCC 6803, Homologous to SOS1, Contains an Aspartic Residue and Long C-Terminal Tail Important for the Carrier Activity. In: *Plant Physiol* 125 (2001), Nr. 1, S. 437–46.
- [Harms u. a. 2001] HARMS, C. ; DOMOTO, Y. ; CELIK, C. ; RAHE, E. ; STUMPE, S. ; SCHMID, R. ; NAKAMURA, T. ; BAKKER, E. P.: Identification of the ABC protein SapD as the subunit that confers ATP dependence to the K⁺-uptake systems Trk(H) and Trk(G) from *Escherichia coli* K-12. In: *Microbiology* 147 (2001), Nr. Pt 11, S. 2991–3003.
- [Heginbotham und MacKinnon 1992] HEGINBOTHAM, L. ; MACKINNON, R.: The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. In: *Neuron* 8 (1992), Nr. 3, S. 483–91.
- [Helenius u. a. 1979] HELENIUS, A. ; MCCASLIN, D. R. ; FRIES, E. ; TANFORD, C.: Properties of detergents. In: *Methods Enzymol* 56 (1979), S. 734–49
- [Hellmer 1998] HELLMER, J.: Heterologe Expression eines archaebakteriellen Kaliumkanals zur biochemischen und strukturbiochemischen Charakterisierung. In: *Diplomarbeit, IFB Hannover* (1998)
- [Hellmer u. a. 2002] HELLMER, J. ; PATZOLD, R. ; ZEILINGER, C.: Identification of a pH regulated Na(+)/H(+) antiporter of *Methanococcus jannaschii*. In: *FEBS Lett* 527 (2002), Nr. 1-3, S. 245–9.
- [Hellmer u. a. 2003] HELLMER, J. ; TEUBNER, A. ; ZEILINGER, C.: Conserved Arginine and Aspartate residues are critical for function of MjNhaP1, a Na⁺/H⁺ antiporter of *M. jannaschii*. In: *FEBS Letters* Artikel im Druck (2003)
- [Hellmer und Zeilinger 2003] HELLMER, J. ; ZEILINGER, C.: K⁺ channels required for potassium accumulation in the deep-sea archaeon *Methanococcus jannaschii*. In: *PNAS* eingereichtes Manuskript (2003)
- [Ho u. a. 1989] HO, S. N. ; HUNT, H. D. ; HORTON, R. M. ; PULLEN, J. K. ; PEASE, L. R.: Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. In: *Gene* 77 (1989), Nr. 1, S. 51–9.
- [Hoshi u. a. 1990] HOSHI, T. ; ZAGOTTA, W. N. ; ALDRICH, R. W.: Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. In: *Science* 250 (1990), Nr. 4980, S. 533–8.

- [Inoue u. a. 1990] INOUE, H. ; NOJIMA, H. ; OKAYAMA, H.: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *Gene* 96 (1990), Nr. 1, S. 23–8.
- [Inoue u. a. 1995] INOUE, H. ; NOUMI, T. ; TSUCHIYA, T. ; KANAZAWA, H.: Essential aspartic acid residues, Asp-133, Asp-163 and Asp-164, in the transmembrane helices of a Na⁺/H⁺ antiporter (NhaA) from *Escherichia coli*. In: *FEBS Lett* 363 (1995), Nr. 3, S. 264–8.
- [Inoue u. a. 1999] INOUE, H. ; SAKURAI, T. ; UJIKE, S. ; TSUCHIYA, T. ; MURAKAMI, H. ; KANAZAWA, H.: Expression of functional Na⁺/H⁺ antiporters of *Helicobacter pylori* in antiporter-deficient *Escherichia coli* mutants. In: *FEBS Lett* 443 (1999), Nr. 1, S. 11–6.
- [Irizarry u. a. 2002] IRIZARRY, S. N. ; KUTLUAY, E. ; DREWS, G. ; HART, S. J. ; HEGINBOTHAM, L.: Opening the KcsA K⁺ channel: tryptophan scanning and complementation analysis lead to mutants with altered gating. In: *Biochemistry* 41 (2002), Nr. 46, S. 13653–62.
- [Ivey u. a. 1991] IVEY, D. M. ; GUFFANTI, A. A. ; BOSSEWITCH, J. S. ; PADAN, E. ; KRULWICH, T. A.: Molecular cloning and sequencing of a gene from alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 that functionally complements an *Escherichia coli* strain carrying a deletion in the nhaA Na⁺/H⁺ antiporter gene. (1991)
- [Ivey u. a. 1993] IVEY, D. M. ; GUFFANTI, A. A. ; ZEMSKY, J. ; PINNER, E. ; KARPEL, R. ; PADAN, E. ; SCHULDINER, S. ; KRULWICH, T. A.: Cloning and characterization of a putative Ca²⁺/H⁺ antiporter gene from *Escherichia coli* upon functional complementation of Na⁺/H⁺ antiporter- deficient strains by the overexpressed gene. In: *J Biol Chem* 268 (1993), Nr. 15, S. 11296–303.
- [Jacob und Monod 1961] JACOB, F. ; MONOD, J.: Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins. In: *J. Mol. Biol.* 3 (1961), S. 318–28
- [Jiang u. a. 2002] JIANG, Y. ; LEE, A. ; CHEN, J. ; CADENE, M. ; CHAIT, B. T. ; MACKINNON, R.: Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. In: *Nature* 417 (2002), Nr. 6888, S. 515–22.
- [Jiang u. a. 2001] JIANG, Y. ; PICO, A. ; CADENE, M. ; CHAIT, B. T. ; MACKINNON, R.: Structure of the RCK domain from the *E. coli* K⁺ channel and demonstration of its presence in the human BK channel. In: *Neuron* 29 (2001), Nr. 3, S. 593–601.
- [Kaupp und Seifert 2002] KAUPP, U. B. ; SEIFERT, R.: Cyclic nucleotide-gated ion channels. In: *Physiol Rev* 82 (2002), Nr. 3, S. 769–824.
- [Ketchum u. a. 1995] KETCHUM, K. A. ; JOINER, W. J. ; SELLERS, A. J. ; KACZMAREK, L. K. ; GOLDSTEIN, S. A.: A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. In: *Nature* 376 (1995), Nr. 6542, S. 690–5.

- [Kim u. a. 2000] KIM, Y. ; BANG, H. ; KIM, D.: TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 13, S. 9340–7.
- [Kizis u. a. 2001] KIZIS, D. ; LUMBRERAS, V. ; PAGES, M.: Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. In: *FEBS Lett* 498 (2001), Nr. 2-3, S. 187–9. – 0014-5793 Journal Article Review Review, Tutorial
- [Klein 2002] KLEIN, M.: Untersuchungen zur in vitro Faltung von Kaliumkanälen und Identifizierung assoziativer Bindungsdomänen. In: *Diplomarbeit, IFB Hannover* (2002)
- [Kloda und Martinac 2001] KLODA, A. ; MARTINAC, B.: Structural and functional differences between two homologous mechanosensitive channels of *Methanococcus jannaschii*. In: *Embo J* 20 (2001), Nr. 8, S. 1888–96.
- [Konishi und Murakami 1990] KONISHI, T. ; MURAKAMI, N.: Solubilization and functional reconstitution of the DCCD-sensitive Na⁺/H⁺-antiporter from *Halobacterium halobium*. In: *Biochem Biophys Res Commun* 170 (1990), Nr. 3, S. 1339–45.
- [Kreusch u. a. 1998] KREUSCH, A. ; PFAFFINGER, P. J. ; STEVENS, C. F. ; CHOE, S.: Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. In: *Nature* 392 (1998), Nr. 6679, S. 945–8.
- [Krulwich 1983] KRULWICH, T. A.: Na⁺/H⁺ antiporters. In: *Biochim Biophys Acta* 726 (1983), Nr. 4, S. 245–64.
- [Krulwich u. a. 2001] KRULWICH, T. A. ; JIN, J. ; GUFFANTI, A. A. ; BECHHOFFER, H.: Functions of tetracycline efflux proteins that do not involve tetracycline. In: *J Mol Microbiol Biotechnol* 3 (2001), Nr. 2, S. 237–46.
- [Kyte und Doolittle 1982] KYTE, J. ; DOOLITTLE, R. F.: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. In: *J Mol Biol* 157 (1982), Nr. 1, S. 105–32.
- [Laemmli 1970] LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Nr. 259, S. 680–5.
- [Latorre u. a. 1984] LATORRE, R. ; CORONADO, R. ; VERGARA, C.: K⁺ channels gated by voltage and ions. In: *Annu Rev Physiol* 46 (1984), S. 485–95. – Using Smart Source Parsing
- [Li u. a. 1984] LI, S. C. ; SQUIRES, C. L. ; SQUIRES, C.: Antitermination of *E. coli* rRNA transcription is caused by a control region segment containing lambda nut-like sequences. In: *Cell* 38 (1984), Nr. 3, S. 851–60.

- [Lichtenberg u. a. 1983] LICHTENBERG, D. ; ROBSON, R. J. ; DENNIS, E. A.: Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. In: *Biochim Biophys Acta* 737 (1983), Nr. 2, S. 285–304.
- [Loo u. a. 1995] LOO, T. W. ; HO, C. ; CLARKE, D. M.: Expression of a functionally active human renal sodium-calcium exchanger lacking a signal sequence. In: *J Biol Chem* 270 (1995), Nr. 33, S. 19345–50.
- [Marrion und Tavalin 1998] MARRION, N. V. ; TAVALIN, S. J.: Selective activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by co-localized Ca²⁺ channels in hippocampal neurons. In: *Nature* 395 (1998), Nr. 6705, S. 900–5.
- [Martin u. a. 1999] MARTIN, D. D. ; CIULLA, R. A. ; ROBERTS, M. F.: Osmoadaptation in archaea. In: *Appl Environ Microbiol* 65 (1999), Nr. 5, S. 1815–25.
- [Meury und Kepes 1981] MEURY, J. ; KEPES, A.: The regulation of potassium fluxes for the adjustment and maintenance of potassium levels in *Escherichia coli*. In: *Eur J Biochem* 119 (1981), Nr. 1, S. 165–70.
- [Miller 2000] MILLER, C.: An overview of the potassium channel family. In: *Genome Biol* 1 (2000), Nr. 4. – Using Smart Source Parsing Reviews0004
- [Mitchell und Moyle 1968] MITCHELL, P. ; MOYLE, J.: Proton translocation coupled to ATP hydrolysis in rat liver mitochondria. In: *Eur J Biochem* 4 (1968), Nr. 4, S. 530–9.
- [Müller-Hill u. a. 1968] MÜLLER-HILL, B. ; CRAPO, L. ; GILBERT, W.: Mutants that make more lac repressor. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 59 (1968), Nr. 4, S. 1259–64.
- [Morais-Cabral u. a. 2001] MORAIS-CABRAL, J. H. ; ZHOU, Y. ; MACKINNON, R.: Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. In: *Nature* 414 (2001), Nr. 6859, S. 37–42.
- [Morell 1996] MORELL, V.: Life's last domain. In: *Science* 273 (1996), Nr. 5278, S. 1043–5.
- [Morsomme u. a. 2002a] MORSOMME, P. ; CHAMI, M. ; MARCO, S. ; NADER, J. ; KETCHUM, K. A. ; GOFFEAU, A. ; RIGAUD, J. L.: Characterization of a hyperthermophilic P-type ATPase from *Methanococcus jannashii* expressed in yeast. In: *J Biol Chem* 4 (2002), S. 4. – Using Smart Source Parsing Jun
- [Morsomme u. a. 2002b] MORSOMME, P. ; CHAMI, M. ; MARCO, S. ; NADER, J. ; KETCHUM, K. A. ; GOFFEAU, A. ; RIGAUD, J. L.: Characterization of a hyperthermophilic P-type ATPase from *Methanococcus jannaschii* expressed in yeast. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Nr. 33, S. 29608–16.

- [Mulligan u. a. 1985] MULLIGAN, M. E. ; BROSIUS, J. ; MCCLURE, W. R.: Characterization in vitro of the effect of spacer length on the activity of Escherichia coli RNA polymerase at the TAC promoter. In: *J Biol Chem* 260 (1985), Nr. 6, S. 3529–38.
- [Mullis u. a. 1986] MULLIS, K. ; FALOONA, F. ; SCHARF, S. ; SAIKI, R. ; HORN, G. ; ERLICH, H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 (1986), Nr. Pt 1, S. 263–73.
- [Munsey u. a. 2002] MUNSEY, T. S. ; MOHINDRA, A. ; YUSAF, S. P. ; GRAINGE, A. ; WANG, M. H. ; WRAY, D. ; SIVAPRASADARAO, A.: Functional properties of Kch, a prokaryotic homologue of eukaryotic potassium channels. In: *Biochem Biophys Res Commun* 297 (2002), Nr. 1, S. 10–6.
- [Naftalin 1984] NAFTALIN, R. J.: The thermostatics and thermodynamics of cotransport. In: *Biochim Biophys Acta* 778 (1984), Nr. 1, S. 155–75.
- [Namba u. a. 1996] NAMBA, N. ; INAGAKI, N. ; GONOI, T. ; SEINO, Y. ; SEINO, S.: Kir2.2v: a possible negative regulator of the inwardly rectifying K⁺ channel Kir2.2. In: *FEBS Lett* 386 (1996), Nr. 2-3, S. 211–4.
- [Noumi u. a. 1997] NOUMI, T. ; INOUE, H. ; SAKURAI, T. ; TSUCHIYA, T. ; KANAZAWA, H.: Identification and characterization of functional residues in a Na⁺/H⁺ antiporter (NhaA) from Escherichia coli by random mutagenesis. In: *J Biochem (Tokyo)* 121 (1997), Nr. 4, S. 661–70.
- [Nozaki u. a. 1996] NOZAKI, K. ; INABA, K. ; KURODA, T. ; TSUDA, M. ; TSUCHIYA, T.: Cloning and sequencing of the gene for Na⁺/H⁺ antiporter of Vibrio parahaemolyticus. In: *Biochem Biophys Res Commun* 222 (1996), Nr. 3, S. 774–9.
- [Ohyama u. a. 1994] OHYAMA, T. ; IGARASHI, K. ; KOBAYASHI, H.: Physiological role of the chaA gene in sodium and calcium circulations at a high pH in Escherichia coli. In: *J Bacteriol* 176 (1994), Nr. 14, S. 4311–5.
- [Olins u. a. 1988] OLINS, P. O. ; DEVINE, C. S. ; RANGWALA, S. H. ; KAVKA, K. S.: The T7 phage gene 10 leader RNA, a ribosome-binding site that dramatically enhances the expression of foreign genes in Escherichia coli. In: *Gene* 73 (1988), Nr. 1, S. 227–35.
- [Orlowski und Grinstein 1997] ORLOWSKI, J. ; GRINSTEIN, S.: Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Nr. 36, S. 22373–6.
- [Ostroumov u. a. 2002] OSTROUMOV, E. ; DZIOBA, J. ; LOEWEN, P. C. ; DIBROV, P.: Asp(344) and Thr(345) are critical for cation exchange mediated by NhaD, Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporter of Vibrio cholerae. In: *Biochim Biophys Acta* 1564 (2002), Nr. 1, S. 99–106.

- [Padan und Schuldiner 1993] PADAN, E. ; SCHULDINER, S.: Na⁺/H⁺ antiporters, molecular devices that couple the Na⁺ and H⁺ circulation in cells. In: *J Bioenerg Biomembr* 25 (1993), Nr. 6, S. 647–69.
- [Padan u. a. 2001] PADAN, E. ; VENTURI, M. ; GERCHMAN, Y. ; DOVER, N.: Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporters. In: *Biochim Biophys Acta* 1505 (2001), Nr. 1, S. 144–57. – 0006-3002 Journal Article Review Review, Tutorial
- [Pilot u. a. 2001] PILOT, G. ; LACOMBE, B. ; GAYMARD, F. ; CHEREL, I. ; BOUCHEREZ, J. ; THIBAUD, J. B. ; SENTENAC, H.: Guard cell inward K⁺ channel activity in arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 5, S. 3215–21.
- [Pinner u. a. 1993] PINNER, E. ; KOTLER, Y. ; PADAN, E. ; SCHULDINER, S.: Physiological role of nhaB, a specific Na⁺/H⁺ antiporter in Escherichia coli. In: *J Biol Chem* 268 (1993), Nr. 3, S. 1729–34.
- [Pinner u. a. 1992] PINNER, E. ; PADAN, E. ; SCHULDINER, S.: Cloning, sequencing, and expression of the nhaB gene, encoding a Na⁺/H⁺ antiporter in Escherichia coli. In: *J Biol Chem* 267 (1992), Nr. 16, S. 11064–8.
- [Pinner u. a. 1994] PINNER, E. ; PADAN, E. ; SCHULDINER, S.: Kinetic properties of NhaB, a Na⁺/H⁺ antiporter from Escherichia coli. In: *J Biol Chem* 269 (1994), Nr. 42, S. 26274–9.
- [Plack und Rosen 1980] PLACK, Jr. ; ROSEN, B. P.: Cation/proton antiport systems in Escherichia coli. Absence of potassium/proton antiporter activity in a pH-sensitive mutant. In: *J Biol Chem* 255 (1980), Nr. 9, S. 3824–5.
- [Poolman u. a. 1996] POOLMAN, B. ; KNOL, J. ; DOES, C. van d. ; HENDERSON, P. J. ; LIANG, W. J. ; LEBLANC, G. ; POURCHER, T. ; MUS-VETEAU, I.: Cation and sugar selectivity determinants in a novel family of transport proteins. In: *Mol Microbiol* 19 (1996), Nr. 5, S. 911–22.
- [Ramirez u. a. 1998] RAMIREZ, J. ; RAMIREZ, O. ; SALDANA, C. ; CORIA, R. ; PENA, A.: A Saccharomyces cerevisiae mutant lacking a K⁺/H⁺ exchanger. In: *J Bacteriol* 180 (1998), Nr. 22, S. 5860–5.
- [Rhoads u. a. 1976] RHOADS, D. B. ; WATERS, F. B. ; EPSTEIN, W.: Cation transport in Escherichia coli. VIII. Potassium transport mutants. In: *J Gen Physiol* 67 (1976), Nr. 3, S. 325–41.
- [Rimon u. a. 1998] RIMON, A. ; GERCHMAN, Y. ; KARIV, Z. ; PADAN, E.: A point mutation (G338S) and its suppressor mutations affect both the pH response of the NhaA-Na⁺/H⁺

- antiporter as well as the growth phenotype of *Escherichia coli*. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Nr. 41, S. 26470–6.
- [Rimon u. a. 1995] RIMON, A. ; GERCHMAN, Y. ; OLAMI, Y. ; SCHULDINER, S. ; PADAN, E.: Replacements of histidine 226 of NhaA-Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli*. Cysteine (H226C) or serine (H226S) retain both normal activity and pH sensitivity, aspartate (H226D) shifts the pH profile toward basic pH, and alanine (H226A) inactivates the carrier at all pH values. In: *J Biol Chem* 270 (1995), Nr. 45, S. 26813–7.
- [Roosild u. a. 2002] ROOSILD, T. P. ; MILLER, S. ; BOOTH, I. R. ; CHOE, S.: A mechanism of regulating transmembrane potassium flux through a ligand-mediated conformational switch. In: *Cell* 109 (2002), Nr. 6, S. 781–91.
- [Rosen 1986] ROSEN, B. P.: Ion extrusion systems in *Escherichia coli*. In: *Methods Enzymol* 125 (1986), S. 328–36
- [Rothman u. a. 1996] ROTHMAN, A. ; PADAN, E. ; SCHULDINER, S.: Topological analysis of NhaA, a Na⁺/H⁺ antiporter from *Escherichia coli*. In: *J Biol Chem* 271 (1996), Nr. 50, S. 32288–92.
- [Sambrook u. a. 1989] SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E. F. ; MANIATIS, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Bd. 1-3. 2. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [Schlosser u. a. 1995] SCHLOSSER, A. ; MELDORF, M. ; STUMPE, S. ; BAKKER, E. P. ; EPSTEIN, W.: TrkH and its homolog, TrkG, determine the specificity and kinetics of cation transport by the Trk system of *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 177 (1995), Nr. 7, S. 1908–10.
- [Schoner u. a. 1986] SCHONER, B. E. ; BELAGAJE, R. M. ; SCHONER, R. G.: Translation of a synthetic two-cistron mRNA in *Escherichia coli*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986), Nr. 22, S. 8506–10.
- [Schrempf u. a. 1995] SCHREMPF, H. ; SCHMIDT, O. ; KUMMERLEN, R. ; HINNAH, S. ; MULLER, D. ; BETZLER, M. ; STEINKAMP, T. ; WAGNER, R.: A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. In: *Embo J* 14 (1995), Nr. 21, S. 5170–8.
- [Schroeder u. a. 2000] SCHROEDER, B. C. ; WALDEGGER, S. ; FEHR, S. ; BLEICH, M. ; WARTH, R. ; GREGER, R. ; JENTSCH, T. J.: A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. In: *Nature* 403 (2000), Nr. 6766, S. 196–9.
- [Schroeder u. a. 1994] SCHROEDER, J. I. ; WARD, J. M. ; GASSMANN, W.: Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K⁺ channels in higher plants: biophysical

- implications for K⁺ uptake. In: *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23 (1994), S. 441–71. – Using Smart Source Parsing
- [Schumacher u. a. 2001] SCHUMACHER, M. A. ; RIVARD, A. F. ; BACHINGER, H. P. ; ADELMAN, J. P.: Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin. In: *Nature* 410 (2001), Nr. 6832, S. 1120–4.
- [Sentenac u. a. 1992] SENTENAC, H. ; BONNEAUD, N. ; MINET, M. ; LACROUTE, F. ; SALMON, J. M. ; GAYMARD, F. ; GRIGNON, C.: Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. In: *Science* 256 (1992), Nr. 5057, S. 663–5.
- [Seoh u. a. 1996] SEOH, S. A. ; SIGG, D. ; PAPAIZIAN, D. M. ; BEZANILLA, F.: Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. In: *Neuron* 16 (1996), Nr. 6, S. 1159–67.
- [Sesti u. a. 2003] SESTI, F. ; RAJAN, S. ; GONZALEZ-COLASO, R. ; NIKOLAEVA, N. ; GOLDSTEIN, S. A.: Hyperpolarization moves S4 sensors inward to open MVP, a methanococcal voltage-gated potassium channel. In: *Nat Neurosci* 6 (2003), Nr. 4, S. 353–361.
- [Shechter 1986] SHECHTER, E.: [Secondary active transport]. In: *Biochimie* 68 (1986), Nr. 3, S. 357–65.
- [Sheng u. a. 1993] SHENG, M. ; LIAO, Y. J. ; JAN, Y. N. ; JAN, L. Y.: Presynaptic A-current based on heteromultimeric K⁺ channels detected in vivo. In: *Nature* 365 (1993), Nr. 6441, S. 72–5.
- [Shi u. a. 2003] SHI, H. ; LEE, B. H. ; WU, S. J. ; ZHU, J. K.: Overexpression of a plasma membrane Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. In: *Nat Biotechnol* 21 (2003), Nr. 1, S. 81–5.
- [Splitt u. a. 2000] SPLITT, H. ; MEUSER, D. ; BOROVOK, I. ; BETZLER, M. ; SCHREMPF, H.: Pore mutations affecting tetrameric assembly and functioning of the potassium channel KcsA from *Streptomyces lividans*. In: *FEBS Lett* 472 (2000), Nr. 1, S. 83–7.
- [Stock und Roseman 1971] STOCK, J. ; ROSEMAN, S.: A sodium-dependent sugar co-transport system in bacteria. In: *Biochem Biophys Res Commun* 44 (1971), Nr. 1, S. 132–8.
- [Strausak u. a. 1993] STRAUSAK, D. ; WASER, M. ; SOLIOZ, M.: Functional expression of the *Enterococcus hirae* NaH-antiporter in *Escherichia coli*. In: *J Biol Chem* 268 (1993), Nr. 35, S. 26334–7.
- [Stumpe und Bakker 1997] STUMPE, S. ; BAKKER, E. P.: Requirement of a large K⁺-uptake capacity and of extracytoplasmic protease activity for protamine resistance of *Escherichia coli*. In: *Arch Microbiol* 167 (1997), Nr. 2/3, S. 126–36.

- [Taglicht u. a. 1991] TAGLICHT, D. ; PADAN, E. ; SCHULDINER, S.: Overproduction and purification of a functional Na⁺/H⁺ antiporter coded by nhaA (ant) from Escherichia coli. In: *J Biol Chem* 266 (1991), Nr. 17, S. 11289–94.
- [Tanford und Reynolds 1976] TANFORD, C. ; REYNOLDS, J. A.: Characterization of membrane proteins in detergent solutions. In: *Biochim Biophys Acta* 457 (1976), Nr. 2, S. 133–70.
- [Ten Brink und Konings 1980] TEN BRINK, B. ; KONINGS, W. N.: Generation of an electrochemical proton gradient by lactate efflux in membrane vesicles of Escherichia coli. In: *Eur J Biochem* 111 (1980), Nr. 1, S. 59–66.
- [Teubner 2003] TEUBNER, R.: Funktionsanalyse von Na⁺/H⁺ Antiportern. In: *Diplomarbeit, IFB Hannover* (2003)
- [Thompson u. a. 1994] THOMPSON, J. D. ; HIGGINS, D. G. ; GIBSON, T. J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. In: *Nucleic Acids Res* 22 (1994), Nr. 22, S. 4673–80.
- [Trchounian und Kobayashi 1999] TRCHOUNIAN, A. ; KOBAYASHI, H.: Kup is the major K⁺ uptake system in Escherichia coli upon hyper- osmotic stress at a low pH. In: *FEBS Lett* 447 (1999), Nr. 2-3, S. 144–8.
- [Turner und Silverman 1977] TURNER, R. J. ; SILVERMAN, M.: Sugar uptake into brush border vesicles from normal human kidney. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977), Nr. 7, S. 2825–9.
- [Ungar u. a. 2001] UNGAR, D. ; BARTH, A. ; HAASE, W. ; KAUNZINGER, A. ; LEWITZKI, E. ; RUIZ, T. ; REILANDER, H. ; MICHEL, H.: Analysis of a putative voltage-gated prokaryotic potassium channel. In: *Eur J Biochem* 268 (2001), Nr. 20, S. 5386–96.
- [Uozumi 2001] UOZUMI, N.: Escherichia coli as an expression system for K(+) transport systems from plants. In: *Am J Physiol Cell Physiol* 281 (2001), Nr. 3, S. C733–9.
- [Uozumi u. a. 1998] UOZUMI, N. ; NAKAMURA, T. ; SCHROEDER, J. I. ; MUTO, S.: Determination of transmembrane topology of an inward-rectifying potassium channel from Arabidopsis thaliana based on functional expression in Escherichia coli. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Nr. 17, S. 9773–8.
- [Venema u. a. 2002] VENEMA, K. ; QUINTERO, F. J. ; PARDO, J. M. ; DONAIRE, J. P.: The arabidopsis Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Nr. 4, S. 2413–8.

- [Verkhovskaya u. a. 2001] VERKHOVSKAYA, M. L. ; BARQUERA, B. ; WIKSTROM, M.: Deletion of one of two *Escherichia coli* genes encoding putative Na⁺/H⁺ exchangers (*ycgO*) perturbs cytoplasmic alkali cation balance at low osmolarity. In: *Microbiology* 147 (2001), Nr. Pt 11, S. 3005–13.
- [Waditee u. a. 2002] WADITEE, R. ; HIBINO, T. ; NAKAMURA, T. ; INCHAROENSAKDI, A. ; TAKABE, T.: Overexpression of a Na⁺/H⁺ antiporter confers salt tolerance on a freshwater cyanobacterium, making it capable of growth in sea water. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Nr. 6, S. 4109–14.
- [Waditee u. a. 2001] WADITEE, R. ; HIBINO, T. ; TANAKA, Y. ; NAKAMURA, T. ; INCHAROENSAKDI, A. ; TAKABE, T.: Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains an Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporter, homologous to eukaryotic ones, with novel ion specificity affected by C-terminal tail. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 40, S. 36931–8.
- [Wainger u. a. 2001] WAINGER, B. J. ; DEGENNARO, M. ; SANTORO, B. ; SIEGELBAUM, S. A. ; TIBBS, G. R.: Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. In: *Nature* 411 (2001), Nr. 6839, S. 805–10.
- [Wakabayashi u. a. 1994] WAKABAYASHI, S. ; BERTRAND, B. ; IKEDA, T. ; POUYSSEGUR, J. ; SHIGEKAWA, M.: Mutation of calmodulin-binding site renders the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) highly H⁽⁺⁾-sensitive and Ca²⁺ regulation-defective. In: *J Biol Chem* 269 (1994), Nr. 18, S. 13710–5.
- [Wakabayashi u. a. 2000] WAKABAYASHI, S. ; PANG, T. ; SU, X. ; SHIGEKAWA, M.: A novel topology model of the human Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoform 1. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 11, S. 7942–9.
- [Williams 2000] WILLIAMS, K. A.: Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA. In: *Nature* 403 (2000), Nr. 6765, S. 112–5.
- [Williams u. a. 1999] WILLIAMS, K. A. ; GELDMACHER-KAUFER, U. ; PADAN, E. ; SCHULDINER, S. ; KUHLEBRANDT, W.: Projection structure of NhaA, a secondary transporter from *Escherichia coli*, at 4.0 Å resolution. In: *Embo J* 18 (1999), Nr. 13, S. 3558–63.
- [Wilson u. a. 1976] WILSON, D. M. ; ALDERETTE, J. F. ; MALONEY, P. C. ; WILSON, T. H.: Protonmotive force as the source of energy for adenosine 5'-triphosphate synthesis in *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 126 (1976), Nr. 1, S. 327–37.
- [Xia u. a. 2002] XIA, X. M. ; ZENG, X. ; LINGLE, C. J.: Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. In: *Nature* 418 (2002), Nr. 6900, S. 880–4.

- [Yellen 2002] YELLEN, G.: The voltage-gated potassium channels and their relatives. In: *Nature* 419 (2002), Nr. 6902, S. 35–42.
- [Zeilinger u. a. 2003] ZEILINGER, C. ; KLEIN, M. ; HELLMER, J.: *In vitro* refolding required for functional reconstitution of MjK2 K⁺ channel. In: *eingereichtes Manuskript* (2003)
- [Zhang und Blumwald 2001] ZHANG, H. X. ; BLUMWALD, E.: Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. In: *Nat Biotechnol* 19 (2001), Nr. 8, S. 765–8. – 1087-0156 Journal Article
- [Zhu 2001] ZHU, J. K.: Plant salt tolerance. In: *Trends Plant Sci* 6 (2001), Nr. 2, S. 66–71. – 1360-1385 Journal Article
- [Zilberstein u. a. 1982] ZILBERSTEIN, D. ; AGMON, V. ; SCHULDINER, S. ; PADAN, E.: The sodium/proton antiporter is part of the pH homeostasis mechanism in *Escherichia coli*. In: *J Biol Chem* 257 (1982), Nr. 7, S. 3687–91.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Albert Kolb für die Möglichkeit bedanken, diese Dissertation am Institut für Biophysik der Universität Hannover anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Epstein und Frau Dr. Marina Verkhovskaya danke ich für die Bereitstellung der *E. coli* Mutante Frag114, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Frau Prof. Dr. Etana Padan sei gedankt für die Bereitstellung der *E. coli* Mutante EP432.

Ich danke Prof. Dr. Evert Bakker dafür, dass er die *E. coli* Mutante LB2003 zur Verfügung gestellt hat.

Frau Prof. Dr. Anders danke ich für die kooperative Zusammenarbeit bezüglich der Nutzung ihres Laserlabors.

Ich bedanke mich bei Frau Priv.-Doz. Dr. Jutta Pappenbrock für die Übernahme des Koreferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Carsten Zeilinger für die ausgezeichnete Betreuung, die vielen Anregungen sowie zahllosen Diskussionen, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Die Anfertigung dieser Arbeit wäre ohne die Hilfe der Mitarbeiter des Instituts für Biophysik der Universität Hannover nicht möglich gewesen. Bei denjenigen die nicht namentlich aufgeführt sind möchte ich mich für das ausgezeichnete Arbeitsklima bedanken.

Ingrid Buchwald und Heidi Bliedung danke ich für die technische Unterstützung.

Bei Oliver Enders möchte ich mich für die Unterstützung bedanken, wenn es um Fragen der elektronischen Datenverarbeitung ging. Ihm sei weiterhin gedankt für kritische Anmerkungen zum Manuskript.

Mein Dank gilt Melanie Steffens. Sie war immer hilfsbereit wenn es um Fragen der Literaturbeschaffung ging.

Ich danke Andreas Teubner für die gute Zusammenarbeit während seiner Diplomarbeit.

Den Mitarbeitern der Lasergruppe Thilo Reeck, Harald Hake und Ralf Pätzold möchte ich danken für die Vermittlung der für Laser relevanten Arbeitstechniken. Ralf Pätzold danke ich für die Programmierung der Software der Lasersteuerung. Thilo Reek und Harald Hake waren stets hilfsbereit, wenn es um Fragen der Latex Programmierung ging.

Ich danke Beate Schulte für kritische Anmerkungen zum Manuskript, für moralische Unterstützung und für Verständnis, wenn es "abends mal etwas später wurde".

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern für die langjährige finanzielle und moralische Unterstützung, die mich diesen Weg hat gehen lassen können. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Publikationen

Diese Arbeit wurde auszugsweise publiziert:

HELLMER, J., ZEILINGER, C.: K⁺ channels assemble under heat. *Posterbeitrag GBM Herbsttagung*, (2002)

HELLMER, J., PÄTZOLD, R., ZEILINGER, C.: Identification of a pH regulated Na⁺/H⁺ antiporter of *Methanococcus jannaschii*. In: *FEBS Letters* (2002), 527, S.:245-9

HELLMER, J., TEUBNER, A., ZEILINGER, C.: Conserved Arginine and Aspartate residues are critical for function of MjNhaP1, a Na⁺/H⁺ antiporter of *M. jannaschii*. In: *FEBS Letters*, akzeptiertes Manuskript

HELLMER, J. ZEILINGER, C.: K⁺ channels required for potassium accumulation in the deep-sea archaeon *Methanococcus jannaschii*. In Vorbereitung

Lebenslauf

Berufliche Tätigkeit

seit 02/2000

Universität Hannover

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biophysik.
Promotion mit dem Thema: Untersuchung putativer Kaliumkanäle und Na^+/H^+ Antiporter von *M. jannaschii* anhand heterologer Expression in *E. coli*.
Abschluss: Promotion mit der Note „sehr gut“.

Hochschulausbildung

10/1991 - 04/1994

Technische Universität Clausthal

Studium der Chemie. Abschluss: Vordiplom mit der Note „sehr gut“

10/1994 - 12/1998

Universität Hannover

Studium der Biochemie mit den Schwerpunkten:

- Dendritischer BC1-RNA Transport
- Aktivierung von NF κ -B durch IL-1b bei Typ I Diabetes
- Hybridisierungskinetik von AML1/MTG8 RNA mit antisense RNA: Genterapeutische Ansätze bei akuter myelogener Leukämie.

Diplomarbeit mit dem Thema: Heterologe Expression eines archaebakteriellen Kaliumkanals zur biochemischen und strukturbiophysikalischen Charakterisierung.

Abschluss: Diplom Biochemiker mit der Note „sehr gut“.

Schulbildung

1984 - 1991

Goethegymnasium Hildesheim

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife mit der Note „gut“.

sonstige Tätigkeiten

01/1999 - 01/2000

Zivildienst an den Behindertenwerkstätten des Niels-Stensen-Hauses Hannover

1991 - 1994

Studentische Nebentätigkeiten: Bosch-Blaupunkt AG (Hildesheim), Schülde GmbH (Sehnde), Warendorffsche Kliniken (Ilten)

Veröffentlichungen

- 09/2001 Hellmer, J., Zeilinger, C.: K⁺ channels assemble under heat, Posterbeitrag, GBM Herbsttagung
- 09/2002 Hellmer, J., Pätzold, R., Zeilinger, C.: Identification of a pH regulated Na⁺/H⁺ antiporter of *Methanococcus jannaschii*, FEBS Lett. 2002 Sep 11;527(1-3):245-9.
- 05/2003 Hellmer, J., Teubner, A., Zeilinger, C.: Conserved Arginine and Aspartate residues are critical for function of MjNhaP1, a Na⁺/H⁺ antiporter of *M. jannaschii*, FEBS Lett. 2003 May 8; 542(1-3):32-6.
- 05/2003 Hellmer, J., Zeilinger, C.: MjK1, a K⁺ channel from *M. jannaschii*, mediates potassium uptake and potassium sensitivity, eingereichtes Manuskript, FEBS Letters

Auslandsaufenthalt

- 10-12/1997 Projektstudie am Science Health Center (New York) mit dem Thema „Dendritischer BC1-RNA Transport“

Besondere Kenntnisse

- EDV Microsoft und Macintosh Betriebssysteme, Excel, Powerpoint, Pagemaker, Illustrator, Photoshop, Origin, MapDraw, Protean, EditSeq, PrimerSelect, Endnote, Labimage, Latex
- Sprachen Englisch: Publikationsqualität, Französisch: Grundkenntnisse

Freizeitaktivitäten

- Alpin- und Langlaufski, Windsurfen
- Djembee