INTERAKTION DER Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPASE MIT PALYTOXIN UND HERZAKTIVEN STEROIDEN AN DREI VERSCHIEDENEN ISOFORMEN DER α-UNTEREINHEIT SOWIE DIE IDENTIFIKATION VON AMINOSÄUREN AUS DEM IONOPHOR DER NA<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPASE, DIE KRITISCH FÜR DEN IONENTRANSPORT UND DIE ENZYMFUNKTION SIND

### **MICHAELA BARTZ**

#### INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. oec.troph. beim Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

#### édition scientifique VVB LAUFERSWEILER VERLAC

#### Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen Printed in Germany



### **VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890 email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Biochemie der Ernährung des Fachbereichs Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. Katja Becker

### Interaktion der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase mit Palytoxin und herzaktiven Steroiden an drei

verschiedenen Isoformen der  $\alpha$ -Untereinheit sowie die Identifikation von

Aminosäuren aus dem Ionophor der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, die kritisch für den

Ionentransport und die Enzymfunktion sind

### **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Dr. oec.troph. beim Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

### MICHAELA BARTZ

Dipl.-Oecotroph. aus Andernach

Gießen 2007

### Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten..

## I. Inhaltsverzeichnis

1	E	inleitun	g	1
2	N	laterial	und Methoden	17
	2.1	Mate	erial	17
	2	.1.1	Zellen	17
	2	.1.2	Vektoren	17
	2	.1.3	Oligonukleotide (Primer)	20
	2	.1.4	Restriktionsendonukleasen und DNA- modifizierende Enzyme	22
	2	.1.5	Antikörper	22
	2	.1.6	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	22
	2	.1.7	Kits	24
	2	.1.8	Puffer und Medien	24
	2	.1.9	Geräte	26
	2.2	Met	hoden	27
	2	.2.1	Einsatz von Computerprogrammen	27
	2	.2.2	Arbeiten mit E.coli-Zellen	27
		2.2.2.1	Aufbewahrung, Anzucht und Kultivierung von E. <i>coli</i> -Zellen	. 28
		2.2.2.2	2 Herstellung kompetenter E.coli-Zellen	. 28
		2.2.2.3	3 Transformation von <i>E.coli</i>	. 29
		2.2.2.4	Transformation von Epicurian Coli XL1-Blue	. 29
	2	.2.3	Arbeiten mit DNA	30
		2.2.3.1	I Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Zellen	. 31
		2.2.3.2	2 Bestimmung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen	. 31
		2.2.3.3	8 Restriktionsanalysen	. 31
		2.2.3.4	4 Mehrfachrestriktionen	. 32
		2.2.3.5	5 Gelelektrophoresen	. 32
		2.2.3.6	6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	. 33
		2.2.3.7	7 Konstruktion des Vektors pBluescript™KSII+-AfIII	. 33
		2.2.3.8	B Einführen von Mutationen	. 33
		2.2.3.9	Überprüfung der Mutation mittels Sequenzierung	. 35
		2.2.3.1	10 Dephosphorylierung der vektoriellen DNA	. 35
		2.2.3.1	11 DNA-Ligation	. 35
	2	.2.4	Arbeiten mit Saccharomyces cerevisiae	36
		2.2.4.	Aufbewahrung, Anzucht und Kultivierung von Arbeiten mit S.	
			cerevisiae	. 37
		2.2.4.2	2 Transformation der S.cerevisiae-Hefezellen	. 37
		2.2.4.3	Messung des Palytoxin-induzierten K <sup>+</sup> -Effluxes in Abhängigkeit	
			der Palytoxin-Konzentration	. 38
		2.2.4.4	Messung der Hemmung des Palytoxin-induzierten K <sup>+</sup> -Efflux	
			durch herzaktive Steroide und deren Aglykone	. 38
		2.2.4.5	5 Gewinnung von Mikrosomen	. 39
		2.2.4.6	Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem Ouabain	.40
		2.2.4.7	7 Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Wildtyp und	
			Mutanten für Ouabain	.40
		2.2.4.8	Bestimmung der Verdrängung von Ouabain durch K <sup>+</sup> -Ionen	.41
		2.2.4.9	Bestimmung der Abhängigkeit der Ouabainbindung in	

	Anwesenheit von Na <sup>+</sup> $Ma^{2+}$ und ATP 4	1
2.2.4.	10 Bestimmung der Abhängigkeit der Ouabainbindung in Anwesenhei	t
	von Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> und ATP42	2
2.2.4.	11 Anreicherung von Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase durch SDS-Behandlung von	
	Mikrosomen	2
2.2.4.	12 Bestimmung der Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase Aktivität	2
2.2.4.	13 Phosphatase-Aktivität	3
2.2.4.	14 SDS-Gelelektrophorese44	4
2.2.4.	15 Nachweis der Proteine mittels Western-Blot44	4
2.2.5	Bestimmung der Proteinkonzentration 48	5
2 Erachai		7
3 Ergebni	sse	ſ
S.I UIII Na	$^{+}$ K <sup>+</sup> $^{+}$ $^{$	7
311	Palvtoxin-induzierter K <sup>+</sup> -Efflux aus Hefezellen in Abhängigkeit von	I
0.1.1	der Palvtoxinkonzentration 47	7
3.1.2	Hemmung des Palvtoxin- induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch Ouabain	8
3.1.3	Hemmung des Palytoxin- induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch Ouabagenin 49	9
3.1.4	Hemmung des Palytoxin- induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch Proscillaridin 50	C
3.1.5	Hemmung des Palytoxin- induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch Bufalin	)
3.1.6	Hemmung des Palytoxin- induzierten K <sup>+</sup> -Eflux durch Digoxin	1
3.1.7	Hemmung des Palytoxin- induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch Digitoxigenin52	2
3.2 Hor	nologievergleiche innerhalb der Familie der P-Typ-ATPasen	3
3.3 Ein	führung von Punktmutationen in die $lpha_1$ -Untereinheit der humanen	
Na	,K <sup>+</sup> -ATPase	7
3.3.1	Konstruktion des Vektors pBluescript™KSII+ <i>Afl</i> II	7
3.3.2	Klonierung des Af/II-Bg/II-Fragmentes aus der humanen $\alpha$ 1-Untereinhei	it
	der Na',K'-Al Pase in pBluescript™KSII+Af/II	7
3.3.3	Einfuhrung der Mutationen in die c-DNA der $\alpha$ 1-Untereinheit der	~
0.0.4	numanen Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -Al Pase	3
3.3.4	Restrictions analysen der pBluescript KSII+- $\alpha$ 1nE/79D und	~
225	pBluescript <sup>m</sup> KSII+-α1hE779Q-Mutanten	1 7
3.3.3	Restriktionsanalysen der pBluescript <sup>TM</sup> KSII+- THN770I-Wulanten	ן 1
3.3.0 3.3.6.1	Restriktionsanalysen der pBluescript KSII+ $\alpha$ InDo04N-Mutanten . 6	 >
3.3.0.1 2.4 Klo	Resultations analysed der politeschpt $\kappa \sin t - \alpha \ \text{mbool} - \text{mutanten} \dots \infty 2$	•
J.4 NIU	merung des Ann-Byn-Fragmenies mit der mutienen C-DNA der $\alpha$ -	2
341	Überprüfung der YhNa1-F779-Mutanten	ך צ
3.4.2	Konstruktion der YhNa1-N776I-Mutanten	4
3.4.3	Konstruktion der YhNa1-D804N-Mutanten	5
3.4.4	Konstruktion der YhNa1-D807-Mutanten	3
3.5 Übe	erprüfung der Expression der Hefeproteine67	7
3.6 Me	ssergebnisse für die Glu779Asp, Asn776lle, Asp804Asn und	
Asp	b807Ala und Asp807Gln- Mutante der $\alpha$ 1-Untereinheit der humanen	
Na	,K <sup>+</sup> -ATPase	Э
3.6.1	Palytoxin- induzierter K <sup>+</sup> -Efflux aus Hefezellen in Abhängigkeit von	
	Palytoxinkonzentration und in Gegenwart verschiedener Kationen 69	9
3.6.2	Hemmung des Palytoxin- induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch Ouabain	S
3.6.3	Bindung von radioaktiv markiertem Ouabain in Gegenwart von	~
	Phosphal und wig -ionen	1

	3.6.4	Verdrängung von gebundenem, radioaktiv markiertem Ouabain in Abhängigkeit von der K <sup>+</sup> -Ionen Konzentration	. 80
	3.6.5	Bindung von radioaktiv markiertem Ouabain in Abhängigkeit von der Na <sup>+</sup> -Ionen Konzentration	. 83
	3.6.6	Bindung von radioaktiv markiertem Ouabain in Abhängigkeit von der Ca <sup>2+</sup> -Ionen Konzentration	. 85
	3.6.7	Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase Aktivität von Wildtyp und Mutanten	87
4	Diskuss	ion	89
5	Zusamm	nenfassung	109
5.1	Zusamm	nenfassung1	09
5.2	Summar	у	112
6	Literatur	verzeichnis1	14
7	Anhang	1	17

# II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Der Reaktionszyklus der Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase	\$
Abbildung 2:	Die chemische Struktur von Ouabain, Proscillaridin A undDigoxin6	;
Abbildung 3:	Die Aglykone Digitoxigenin, Ouabagenin und Bufalin7	
Abbildung 4:	Chemische Struktur des marinen Korallengiftes Palytoxin8	
Abbildung 5:	Topologiemodell der Calciumpumpe12	2
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der Ca <sup>2+</sup> -Koordinationsstellen	
	in SERCA1a	13
Abbildung 7:	Der Konformationsübergang von $E_1$ nach $E_2$ in der Ca <sup>2+</sup> -ATPase	14
Abbildung 8:	Genkarte des Shuttle-Vektors YhNa1	18
Abbildung 9:	Genkarte des Shuttle-VektorsGhNb11	9
Abbildung 10:	Genkarte des PlasmidspBluescript KSII <sup>+</sup> -α1h	20
Abbildung 11:	Oligonukleotid Linker für die Konstruktion von pBluescript <sup>™</sup> KSII+ <i>Af</i> II	20
Abbildung 12:	Palytoxin-induzierter Kaliumefflux in der $\alpha$ 1, $\alpha$ 2 und $\alpha$ 3-Untereinheit der Natriumpumpe <sup>2</sup>	17
Abbildung 13:	Inhibition des Ptx-induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch Ouabain	19
Abbildung 14:	Inhibition des Ptx-induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch Ouabagenin5	50
Abbildung 15:	Inhibition des Ptx-induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch Proscillaridin A	50
Abbildung 16:	Inhibition des Ptx-induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch Bufalin	51
Abbildung 17:	Inhibition des Ptx-induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch Digoxin	52
Abbildung 18:	Inhibition des Ptx-induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch Digitoxigenin bei den humanen Isoformen $\alpha$ 1, $\alpha$ 2 und $\alpha$ 3	52
Abbildung 19:	Schematische Darstellung der Koordinationsstellen I und II in der Calciumpumpe und ihre korrespondierenden Aminosäuren in der Natriumpumpe	54
Abbildung 20:	Einführung einer Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym <i>Afl</i> II	57

Abbildung 21: Restriktionsanalsyse des Vektors pBluescript KSII+- $\alpha$ 1h58
Abbildung 22: Amplifikationskontrolle der Mutagenese für die Mutante E779D59
Abbildung 23: Restriktionskontrolle der pBluescript KSII+- $\alpha$ 1hE779-Mutanten60
Abbildung 24: Restriktionskontrolle der pBluescript KSII+- $\alpha$ 1hN776I-Mutanten61
Abbildung 25: Restriktionskontrolle der pBluescript KSII+- $\alpha$ 1hD804N-Mutanten62
Abbildung 26: Restriktionskontrolle der pBluescript <sup>TM</sup> KSII+- $\alpha$ 1hD807-Mutanten63
Abbildung 27: Restriktionskontrolle der Mutanten YhNa1E779D
und YhNa1E779Q64
Abbildung 28: Restriktionskontrolle der Mutanten YhNa1N776I65
Abbildung 29: Restriktionskontrolle der Mutanten YhNa1-D804N66
Abbildung 30: Restriktionskontrolle der Mutanten YhNa1-D807A und D807Q67
Abbildung 31: Immunologischer Nachweis (Westernblot) der α-Untereinheit des Wildtypproteins und verschiedenen Mutanten68
Abbildung 32: Immunologischer Nachweis (Westernblot) der β-Untereinheit des Wildtypproteins und der verschiedenen Mutanten
Abbildung 33: Ptx- induzierter K <sup>+</sup> -Efflux aus Hefezellen bei Glu779Asp69
Abbildung 34: Ptx- induzierter K <sup>+</sup> -Efflux aus Hefezellen bei Asn76lle70
Abbildung 35: Ptx- induzierter K <sup>+</sup> -Efflux aus Hefezellen bei Asn776lle in Gegenwart von Calcium71
Abbildung 36: Ptx- induzierter K <sup>+</sup> -Efflux aus Hefezellen in Gegenwart von Bariumionen72
Abbildung 37: Ptx- induzierter K <sup>+</sup> -Efflux aus Hefezellen in Gegenwart von Magnesiumionen72
Abbildung 38a: Ptx- induzierter K <sup>+</sup> -Efflux aus Hefezellen bei Asp804N in Gegenwart von Natriumionen73
Abbildung 38b: Ptx- induzierter K <sup>+</sup> -Efflux aus Hefezellen bei Asp804N in Gegenwart von Natriumionen73
Abbildung 39a: Ptx- induzierter K <sup>+</sup> -Efflux aus Hefezellen bei Asp807Ala74
Abbildung 39b: Ptx- induzierter K <sup>+</sup> -Efflux aus Hefezellen bei Asp807Gln74

Abbildung 40a	: Ptx- induzierter K⁺-Efflux aus Hefezellen bei Asp807Ala in Gegenwart von Calciumionen75
Abbildung 40b	: Ptx- induzierter K⁺-Efflux aus Hefezellen bei Asp807GIn in Gegenwart von Calciumionen75
Abbildung 41:	Inhibition des Ptx-induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch Ouabain an der nativen Natriumpumpe und bei Glu779Asp76
Abbildung 42:	Inhibition des Ptx- induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch Ouabain an der nativen Natriumpumpe und bei Asn776lle77
Abbildung 43:	Inhibition des Ptx-induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch Ouabain an der nativen Natriumpumpe und bei Asn804Asn78
Abbildung 44:	Inhibition des Ptx-induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch Ouabain an der nativen Natriumpumpe und bei Asp807GIn und Asp807Ala78
Abbildung 45a	: [3H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der K <sup>+</sup> -Konzentration an der nativen Natriumpumpe und bei Glu779Asp81
Abbildung 45b	: [3H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der K⁺-Konzentration an der nativen Natriumpumpe und bei Asn776IIe
Abbildung 46:	[ <sup>3</sup> H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der K <sup>+</sup> -Konzentration an der nativen Natriumpumpe und bei Asp804Asn
Abbildung 47:	[ <sup>3</sup> H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der K <sup>+</sup> -Konzentration an der nativen Natriumpumpe und bei Asp807Ala82
Abbildung 48:	[ <sup>3</sup> H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der K <sup>+</sup> -Konzentration an der nativen Natriumpumpe und bei Asp807GIn83
Abbildung 49:	[ <sup>3</sup> H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der Na <sup>+</sup> - Konzentration an der nativen Natriumpumpe und bei Asn776IIe84
Abbildung 50:	[ <sup>3</sup> H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der Na <sup>+</sup> - Konzentration an der nativen Natriumpumpe und bei Asp804Asn85
Abbildung 51:	[ <sup>3</sup> H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der Na <sup>+</sup> - Konzentration an der nativen Natriumpumpe und bei Asp807GIn85
Abbildung 52:	[ <sup>3</sup> H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der Ca <sup>2+</sup> - Konzentration an der nativen Natriumpumpe und bei Asn776IIe86
Abbildung 53:	[ <sup>3</sup> H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der Ca <sup>2+</sup> - Konzentration an der nativen Natriumpumpe und bei Asp804Asn87
Abbildung 54:	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase Aktivitäten in SDS-extrahierten Hefemikrosomen bei Wildtyp, Glu779Asp, Asn776lle, Asp804Asn, Asp807Ala und Asp807Gln

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Oligonukleotide für die Konstruktion von Mutationen in Gln77921	1
Tabelle 2:	Oligonukleotide für die Konstruktion von Asn776lle21	I
Tabelle 3:	Oligonukleotide für die Konstruktion von Asp804Asn21	1
Tabelle 4:	Oligonukleotide für die Konstruktionen von Mutationen in Asp80721	1
Tabelle 5:	Oligonukleotide für die Sequenzierung des AflI-BglII-Fragmentes2	1
Tabelle 6:	Lösungen, Medien und Puffer2	5
Tabelle 7:	EC <sub>50</sub> -Werte und maximaler Ptx-induzierter K <sup>+</sup> -Efflux53	3
Tabelle 8:	EC <sub>50</sub> -Werte und maximale Hemmung des Ptx-induzierten K <sup>+</sup> -Efflux durch ausgewählte herzaktive Steroide und Aglykone53	3
Tabelle 9:	Sequenzvergleich im Bereich von M5 und M6 verschiedener P-Typ-ATPasen55	5
Tabelle 10	): Sequenzvergleich im Bereich von M5 und M6 verschiedener $\alpha$ –Untereinheiten der Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase	3
Tabelle 1'	I: Dissoziationskonstante für Ouabain79	1
Tabelle 12	2: B <sub>max</sub> -Werte für die Natrium-stimulierte Ouabainbindung84	ŀ
Tabelle 13	B: EC <sub>50</sub> -Werte und maximaler K <sup>+</sup> -Efflux von Wildtyp und Mutanten bei 75nM Ptx117	7
Tabelle 14	1: Die Bindung von radioaktiv markiertem Ouabain in Gegenwart von Phopshat und Mg <sup>2+</sup> -Ionen11 <sup>2</sup>	7
Tabelle 18	5: Die durch Ouabain gehemmten K <sup>+</sup> -Effluxe beim Wildtyp und den Mutanten E779D, N783I, D804N, D807A und D807Q11	7
Tabelle 16	6: Verdrängung von [3H]Ouabain mit Kalium11	7
Tabelle 17	7: [3H] Ouabainbindung in Abhängigkeit von der Na⁺-Ionenkonzentration11	8
Tabelle 18	3: [3H] Ouabainbindung in Abhängigkeit von der Ca <sup>2+</sup> -Ionenkonzentration11	8
Tabelle 19	9: Ausgewählte Herzaktive Glykoside und Aglykone	8
Tabelle 20	): EC50-Werte und maximaler Ptx-induzierter K <sup>+</sup> -Efflux	8

Tabelle 21: EC50-Werte und maximale Hemmung des Ptx-induziertenK+Efflux durch ausgewählte herzaktive Steroide und Aglykone......119

# IV. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (1Å = 1⋅10 <sup>-10</sup> m)
А	Desoxvadenosin-5´-monophosphat
Abb	Abbildung
ADP	Adenosin-5´-diphosphat
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
ATPase	Adenosin-5´-diphosphatase
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
C	Desoxycytidin-5´-dinhosnhat
о С	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup> -ATPase	$Ca^{2+}$ -transportierende ATP-Phosphohydrolase (EC 3 6 3 8)
cDNA	Copy-DNA zur m-RNA komplementäre DNA
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
Da	Dalton
	Desoxvadenosintrinhosnhat
SCTD	Desoxyadenosintriphosphat
SE	Änderung der Extinktion
	Desoxyuanosiniiipnospilai
	DesoxyIID0110KieliiSaure
	Desoxythymiointhphosphat
	Mischung aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	Escherichia Coll
	Enzymkoniormation der Na ,K -ATPase, in der Na -ionen
-	gebunden werden konnen
<b>E</b> <sub>2</sub>	Enzymkoniormation der Na ,K -ATPase, in der K -ionen
50	gebunden werden konnen
	Enzymkiassifikation
EC <sub>50</sub> -went	Konzentration eines wirkstoffes, bei der der nalbmaximale
	Effekt erzielt wird
EDIA	
G	Desoxyguanosino-5 -monophosphat
	N-[2-Hydroxyetnyi]piperazin-N[2-ethansultonsaure]
H',K'-ATPase	H',K'-transportierende AIP-Phosphonydrolase
	(EU 3.6.1.36)
K <sub>0,5</sub>	Konzentration eines wirkstoffes, bei dem der nalbmaximale
KD	Kilobasenpaare (entspricht 1000bp)
KD	Dissoziationskonstante
	Kilodaiton
LB-Medium	
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis; todlich für 50% der Versuchstiere
LIDS	Lithiumdodecylsulfat
MRNA	Boten-RNA

mAMilliamperemUMilliunitNa <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPaseNa <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -aktivierte Mg <sup>2+</sup> ATP-Phosphohydrolase (EC 3.6.1.37)NADHReduzierte Form des Nicotinamid-adenin-dinucleotidngNanogrammOD $\lambda$ Optische Dichte, gemessen bei der Wellenlänge $\lambda$ PAGEPolyacrylamid-Gel-ElektrophoresePBSPhoshpat-gepuffertes SalinPCRPolymerasekettenreaktionPEGPolyethylenglycolPiAnorganisches PhosphatP-LoopPore forming loopPMSFPhenylmethylsulfonylfluoridPtxPalytoxinPVDFPolyvinyldifluoridPNABibanuklaineäure
mUMilliunitNa <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPaseNa <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -aktivierte Mg <sup>2+</sup> ATP-Phosphohydrolase (EC 3.6.1.37)NADHReduzierte Form des Nicotinamid-adenin-dinucleotidngNanogrammOD $\lambda$ Optische Dichte, gemessen bei der Wellenlänge $\lambda$ PAGEPolyacrylamid-Gel-ElektrophoresePBSPhoshpat-gepuffertes SalinPCRPolymerasekettenreaktionPEGPolyethylenglycolPiAnorganisches PhosphatP-LoopPore forming loopPMSFPhenylmethylsulfonylfluoridPtxPalytoxinPVDFPolyvinyldifluoridPNABibapukleineäure
Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPaseNa <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -aktivierte Mg <sup>2+</sup> ATP-Phosphohydrolase (EC 3.6.1.37)NADHReduzierte Form des Nicotinamid-adenin-dinucleotidngNanogrammOD $\lambda$ Optische Dichte, gemessen bei der Wellenlänge $\lambda$ PAGEPolyacrylamid-Gel-ElektrophoresePBSPhoshpat-gepuffertes SalinPCRPolymerasekettenreaktionPEGPolyethylenglycolPiAnorganisches PhosphatP-LoopPore forming loopPMSFPhenylmethylsulfonylfluoridPtxPalytoxinPVDFPolyvinyldifluoridPNABibonukleineäure
(EC 3.6.1.37)NADHReduzierte Form des Nicotinamid-adenin-dinucleotidngNanogrammOD $\lambda$ Optische Dichte, gemessen bei der Wellenlänge $\lambda$ PAGEPolyacrylamid-Gel-ElektrophoresePBSPhoshpat-gepuffertes SalinPCRPolymerasekettenreaktionPEGPolyethylenglycolPiAnorganisches PhosphatP-LoopPore forming loopPMSFPhenylmethylsulfonylfluoridPtxPalytoxinPVDFPolyvinyldifluoridPNABibapukleine äure
NADHReduzierte Form des Nicotinamid-adenin-dinucleotidngNanogrammOD $\lambda$ Optische Dichte, gemessen bei der Wellenlänge $\lambda$ PAGEPolyacrylamid-Gel-ElektrophoresePBSPhoshpat-gepuffertes SalinPCRPolymerasekettenreaktionPEGPolyethylenglycolPiAnorganisches PhosphatP-LoopPore forming loopPMSFPhenylmethylsulfonylfluoridPtxPalytoxinPVDFPolyvinyldifluoridPNABibonukleinnäuro
ngNanogrammODλOptische Dichte, gemessen bei der Wellenlänge λPAGEPolyacrylamid-Gel-ElektrophoresePBSPhoshpat-gepuffertes SalinPCRPolymerasekettenreaktionPEGPolyethylenglycolPiAnorganisches PhosphatP-LoopPore forming loopPMSFPhenylmethylsulfonylfluoridPtxPalytoxinPVDFPolyvinyldifluoridPNAPibapukleineäure
ODλOptische Dichte, gemessen bei der Wellenlänge λPAGEPolyacrylamid-Gel-ElektrophoresePBSPhoshpat-gepuffertes SalinPCRPolymerasekettenreaktionPEGPolyethylenglycolPiAnorganisches PhosphatP-LoopPore forming loopPMSFPhenylmethylsulfonylfluoridPtxPalytoxinPVDFPolyvinyldifluoridPNAPibapukleineäure
PAGEPolyacrylamid-Gel-ElektrophoresePBSPhoshpat-gepuffertes SalinPCRPolymerasekettenreaktionPEGPolyethylenglycolPiAnorganisches PhosphatP-LoopPore forming loopPMSFPhenylmethylsulfonylfluoridPtxPalytoxinPVDFPolyvinyldifluoridPNAPibapukloineäure
PBSPhoshpat-gepuffertes SalinPCRPolymerasekettenreaktionPEGPolyethylenglycolPiAnorganisches PhosphatP-LoopPore forming loopPMSFPhenylmethylsulfonylfluoridPtxPalytoxinPVDFPolyvinyldifluoridPNAPibapukloineäure
PCRPolymerasekettenreaktionPEGPolyethylenglycolPiAnorganisches PhosphatP-LoopPore forming loopPMSFPhenylmethylsulfonylfluoridPtxPalytoxinPVDFPolyvinyldifluoridPNAPibapukleineäure
PEGPolyethylenglycolPiAnorganisches PhosphatP-LoopPore forming loopPMSFPhenylmethylsulfonylfluoridPtxPalytoxinPVDFPolyvinyldifluoridPNAPibapukloineäure
PiAnorganisches PhosphatP-LoopPore forming loopPMSFPhenylmethylsulfonylfluoridPtxPalytoxinPVDFPolyvinyldifluoridPNAPibapukloineäure
P-LoopPore forming loopPMSFPhenylmethylsulfonylfluoridPtxPalytoxinPVDFPolyvinyldifluoridPNABibopukloineäure
PMSF     Phenylmethylsulfonylfluorid       Ptx     Palytoxin       PVDF     Polyvinyldifluorid       PNA     Bibopukloingöuro
Ptx Palytoxin PVDF Polyvinyldifluorid PNA Bibopukloingöuro
PVDF Polyvinyldifluorid BNA Bibopukleineäure
PNA Diponukleineäure
RINA RIDUHUKIEIIISäule
Rinase Ribonuklease
S Siene
5. cerevisiae Saccharonnyces cerevisiae
STET Sodiumchlorid/Tris-EDTA/Triton®X100
Desoxytymidin-5 -monophosphat
TAE Tris-Acetat/EDTA
TCA Trichloressigsäure
TE Tris-EDTA
TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton® Polyethylglycol-mono-[p-(1,1,3,3-tetramethylbuthyl)-phenyl]-
ether
Tween® Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U Unit; die Menge eines Enzyms, die unter idealen Bedingungen
ein µmol Substrat pro Minute umsetzen kann
Upm Umdrehungen pro Minute
WT Wildtyp
YBB Yeast Breakage Buffer
YNB Yeast Nitrogen Base
vgl Vergleiche

Zur Abkürzung der Aminosäurennamen wurde der allgemein übliche Drei- oder Einbuchstabencode verwendet.

### 1 Einleitung

Gegenstand dieser Arbeit ist die in allen Tierzellen vorkommende Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (Natriumpumpe). Seit der Beschreibung dieses integralen Membranproteins als lonenpumpe (Skou 1988) wurden zahlreiche Untersuchungen in Angriff genommen, seine Funktionsweise und seine Einbettung in verschiedene Zellfunktionen zu erforschen. Neben ihrer Aufgabe, ein Ungleichgewicht in der intra- und extrazellulären Natrium- und Kaliumionenverteilung herzustellen, kristallisierten sich weitere Funktionsfelder heraus, die nach und nach aufgeklärt werden. Eine aktuelle Publikation schildert beispielsweise die Rolle der Natriumpumpe als Signalübermittler von endogenen Hormonen, über die Zellproliferation, Herzkontraktion, arterielle Hypertonie und Natriurese gesteuert werden (Schoner und Scheiner-Bobis 2005). Wo ist dieses vielfältige Enzym einzuordnen und wie bewerkstelligt es seine Funktion als Ionentransporter?

### Die Familie der P-Typ-ATPasen

Die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (EC 3.6.3.9) gehört wie die H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (Protonenpumpe) sowie die Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Calciumpumpe) zur Familie der P-Typ-ATPasen. Es handelt sich um zelluläre Enzyme, die den Ionentransport durch die Zellmembranen bewerkstelligen und dadurch Ionengradienten aufbauen. Diese Ionengradienten sind dann treibende Kraft für eine Reihe physiologischer Vorgänge, wie Aufnahme und Sekretion von Molekülen, transmembranäre Signalprozesse, Reizleitung im Nervensystem, Erregbarkeit und Beweglichkeit von Muskelzellen und Wachstumsund Differenzierungsprozesse (Scarborough 1999).

Drei wesentliche Merkmale sind charakteristisch für die P-Typ-ATPasen: Der Reaktionszyklus mit einem phosphorylierten Zwischenprodukt, dem die Familie ihren Namen verdankt, die Hemmbarkeit durch Vanadat und ihre strukturelle Homologie untereinander (Lutsenko and Kaplan 1995). Der Ablauf des Ionentransportes kann als Zyklus beschrieben werden, innerhalb dessen das Enzym mehrere Konformationszustände annimmt. Zum einen muss das Enzym zugänglich für Ionen der cytoplasmatischen Seite sein und zum anderen auch in der Lage sein, aus der extrazellulären Seite Ionen aufzunehmen. In Funktion einer Kinase phosphorylieren sich P-Typ-ATPasen an einem Aspartatrest, der im Ablauf des Transportzyklus wieder dephoshporyliert wird. Die Hemmbarkeit der P-Typ-ATPasen durch Vanadat ist dadurch erklärbar, dass es ein Analogon des Übergangszustandes darstellt, der bei der Dephoshorylierung des Aspartatrestes auftritt.

Die Familie der P-Typ-ATPasen lässt sich in zwei Gruppen unterteilen: Nämlich die, die nur aus einer Untereinheit bestehen (monomere Pumpen) wie die Ca<sup>2+</sup>-ATPase aus dem sarkoplasmatischen Reticulum (SERCA)(EC 3.6.3.8) und Plasmalemma (PMCA). Und die, die aus zwei oder mehreren Untereinheiten bestehen (oligomere Pumpen). Dazu zählen die gastrische Protonenpumpe, die Protonenpumpe des Kolons sowie die Natriumpumpe. Sie sind aus zwei Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ , zusammengesetzt, die beide notwendig sind, um die physiologische Funktion der Pumpe ausüben zu können (Horowitz, Eakle et al. 1990; Scheiner-Bobis and Farley 1994).

Die  $\alpha$ -Untereinheit wird als katalytische Untereinheit bezeichnet und hat ein Molekulargewicht zwischen 70 und 200 kD. Sie besitzt 10 Regionen mit hohem Konservierungsgrad einschließlich einer ATP-Bindungsgregion und dem bereits erwähnten Aspartatrest, der phosphoryliert wird. Sowohl der Carboxy- als auch der Aminoterminus liegen intrazellulär. Insgesamt durchspannt die  $\alpha$ -Untereinheit die Membran mit 10 Helices (Transmembrandomänen M1-M10), wobei zwischen Transmembrandomäne M4 und M5 ein großer cytoplasmatischer Loop ausgebildet ist, in dem sich die ATP-Bindungstelle sowie das zu phosphorylierende Aspartat befindet (Fiedler and Scheiner-Bobis 1996).

Die β-Untereinheit der Natriumpumpe ist stark glykosyliert und besteht aus nur einem Transmembrandurchgang. Der kurze N-Terminus ist cytoplasmatisch lokalisiert, das Carboxy-Ende ragt in den Extracellulärraum hinein und ist zum einen notwendig bei der Reifung und Faltung des nativen Proteins (Geering 2001). Sie spielt zum anderen vermutlich aber auch eine wichtige Rolle bei der extrazellulären Erkennung der Kaliumionen.

Natrium- und Protonenpumpe sind beide Countertransporter, bei denen Natriumionen bzw. Protonen jeweils im Austausch mit Kaliumionen transportiert werden.

### Die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

Die Natriumpumpe ist, wie bereits oben erwähnt, integraler Bestandteil der Zellmembranen fast aller Zellen tierischen Ursprungs (Skou 1988). Sie koppelt die

ATP-Hydrolyse an den Transport dreier Natriumionen aus der Zelle heraus im Austausch mit 2 Kaliumionen und ist somit elektrogen. Dabei wird etwa 20 bis 30 % des von der Zelle hergestellten ATP für diesen Transportprozess aufgewendet (Jorgensen and Pedersen 2001). Albers und Post entwickelten 1967 bzw. 1969 ein Postulat, wie dieser Transportprozess in der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase abläuft (siehe Abb 1).



Abbildung 1: Der Reaktionszyklus der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (Scheiner-Bobis 2002): Die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase bindet Na<sup>+</sup> und ATP in der E<sub>1</sub>-Konformation (Schritt 1) und wird an einem Aspartatrest durch die  $\gamma$ -Phosphatgruppe des ATP phosphoryliert. Dies führt zur Okklusion von drei Na<sup>+</sup>-Ionen (Schritt 2) und anschließend zu ihrer Freisetzung in den Extrazellulärraum (Schritt 3). Dieser neue Konformationszustand (E<sub>2</sub>-P) bindet K<sup>+</sup> mit hoher Affinität (Schritt 4). Die Bindung von K<sup>+</sup>-Ionen führt zur Dephosphorylierung des Enzyms und zu einer Okklusion zweier K<sup>+</sup>-Ionen (Schritt 5). ATP bindet dann mit niedriger Affinität an das Enzym und die K<sup>+</sup>-Ionen werden in das Cytosol freigegeben (Schritt 6).

Apell und Karlish konnten mit biophysikalischen Methoden weitere Details klären (Apell and Karlish 2001). Der Transportzyklus wird streng koordiniert, um keine Energie zu verschwenden. ATP wird nur hydrolysiert, wenn 3 Na<sup>+</sup>-Ionen gebunden sind. Die Bindung des dritten Na<sup>+</sup>-Iones geschieht mit höherer Affinität als die des zweiten. Das kann dahingehend interpretiert werden, dass erst durch die Bindung zweier Na<sup>+</sup>-Ionen die dritte Bindungsstelle geschaffen wird. Die Ionenbindung erfolgt scheinbar kooperativ. Die Bindung der ersten beiden Na<sup>+</sup>-Ionen ist elektroneutral, wie auch die Bindung der beiden K<sup>+</sup>-Ionen; die Bindung des dritten Natrium-Iones ist elektrogen. Dabei macht die Bindung des dritten Na<sup>+</sup>-Iones das Enzym kompetent zur Phosphorylierung. Die Konformation wird leicht entspannt - vermutlich unter

Beteiligung von Asp369, welches durch die terminale Phosphatgruppe des ATPs phosphoryliert wird. Durch die lokale Verschiebung der Enzymstruktur bei der Bindung des dritten Natriumiones könnte das Asp369 genau in die Position gebracht werden, in der es das  $\gamma$ -Phosphoratom aus der nukleotid-bindenden Stelle aufnehmen kann.

Die Freisetzung des ersten Natriumions ist der dominante ladungsverändernde Schritt. Es findet eine weitere konformelle Entspannung statt, so dass die beiden verbliebenen Natriumionen näher an die wässrige Phase gebracht werden, was energetisch günstiger für den Transport ist (Apell and Karlish 2001).

### Isoformen der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase

Für die α-Untereinheit der Natriumpumpe sind bislang vier verschiedene Isoformen bekannt. Sie werden in den verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert. Die α1-Isoform ist ubiquitär zu finden, wohingegen α2 hauptsächlich in Muskel- und Nervenzellen auftritt. Soweit bislang bekannt, beschränkt sich die α3-Isoform auf das Nervengewebe (Jewell 1991). Die vierte Isoform wurde erst später als die drei anderen entdeckt. Ihr Vorkommen ist auf die Testes beschränkt (Shamraj 1994). Die physiologische Bedeutung der Isoformenvielfalt liegt vermutlich darin, auf allen Prozessierungsebenen eine differentielle Regulation zu ermöglichen. Bekannt ist bislang z.B. die Regulation der Isoformen-spezifischen ATPase-Aktivität durch Schilddrüsen- und Steroidhormone auf der Ebene der Transkription und die Regulation durch Peptidhormone, wie Insulin oder Katecholamine, auf der Ebene der posttranslationalen Modifikation (Gick 1988; Lingrel 1990). Darüber hinaus ist es möglich, dass jede Isoform durch unterschiedliche funktionale Differenzierung in der ATPase-Aktivität reguliert wird (Jewell 1991).

Die Affinität der verschiedenen Isoformen für ihre Liganden wie ATP, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Mg<sup>2+</sup> scheint sehr ähnlich zu sein. Die Affinität für die herzaktiven Glykoside ist jedoch unterschiedlich sowohl zwischen den verschiedenen Isoformen einer Spezies, als auch zwischen verschiedenen Spezies. So ist die  $\alpha$ 1-Isoform der Ratte ouabaininsensitiv, die Isoformen  $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 3 sind es nicht (Jewell 1991). Die IC<sub>50</sub>-Werte für die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase aus Herzen verschiedener Spezies erstrecken sich von 33 nM (Rinderherz) bis zu 60  $\mu$ M (Rattenherz). Für verschiedene Organe von Ratten

4

wurden IC<sub>50</sub>-Werte von 16 nM (Gehirn), 125 nM (Skelettmuskel) bis hin zu 10  $\mu$ M (Herzmuskel) gemessen (Wallick 1988). Neuere Publikationen berichten über unterschiedliche Verteilungsmuster der Isoformen in verschiedenen Zellorganellen, z.B. in Plasmalemma und sarkoplasmatischem Retikulum (Juhaszova 1997).

### Herzaktive Steroide: Eine Substanzklasse, die die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase hemmt

Ouabain, ein pflanzliches Glykosid, ist ein sehr potenter Hemmstoff der Natriumpumpe. Die Behandlung der als Wassersucht beschriebenen kongestiven Herzinsuffizienz mit Digitalis aus dem Fingerhutgewächs war der erste therapeutische Einsatz von pflanzlichen Glykosiden am Herzen. Aufgrund dieser Wirkung wurde ihnen dann auch der Name "Herzglykoside" verliehen. Die Natriumpumpe ist gegenwärtig als ihr einziger bekannter Rezeptor dokumentiert (Sweadner 1989). Herzglykoside binden spezifisch und reversibel an die  $\alpha$ -Untereinheit der Natriumpumpe (Lingrel and Kuntzweiler 1994). Dabei entsteht ein stabiler Enzym-Herzglykosid Komplex, im Falle des Ouabain [E<sub>2</sub>~P.Ouabain]. In Gegenwart von Na<sup>+</sup>-Ionen wird die Bindung der herzaktiven Steroide gefördert, wohingegen unter Anwesenheit von K<sup>+</sup>-Ionen diese kopetitiv das Ouabain verdrängen. Untersuchungen mit Herzglykosiden lieferten und liefern immer noch wichtige Daten zur Aufklärung der physiologischen Vorgänge, wie Signalkaskaden, Regulationsmechanismen und in die die Natriumpumpe eingebunden ist.

Ein weiteres Synonym für die Herzglykoside ist das der "herzaktiven Steroide", welches einen wichtigen Baustein ihrer chemischen Struktur verrät: Grundgerüst ist ein Steroid mit einer cis-Verknüpfung der Ringe A/B, welche wesentlich für den hemmendem Einfluss der Herzglyoside auf die Natriumpumpe ist (Steyn und Van Heerden 1998). Am C<sub>17</sub>-Atom ist ein ungesättigter Lactonring in β-Konfiguration verknüft. Dieser Lactonring kann fünfgliedrig (Cardenolide) oder sechsgliedrig (Bufadienolide) sein. Ein Zuckerbaustein kann an Position C3 glykosidisch an das Steroidgerüst gebunden sein. Fehlt dieser Zuckerbaustein, so spricht man von einem Aglykon. Bezüglich der Nomenklatur wird dies durch die Endung –genin markiert. Beim Ouabain, auch g-Strophantin genannt, findet sich ein 5er Lactonring und eine

L-Rhamnose ist über eine Hydroxygruppe mit dem Steroidgerüst verknüpft.

Sein entsprechendes Aglykon, das Ouabagenin, besitzt diese Rhamnose nicht. Proscillaridin A besitzt ebenfalls eine Rhamnose-Einheit als Zuckerbaustein und unterscheidet sich vom Ouabain durch das Vorhandensein eines 6er-Lactonrings. Das Aglykon des Proscillaridin A ist das Bufalin.



Abbildung 2: Die chemische Struktur von Ouabain (ein Cardenolid), Proscillaridin A (ein Bufadienolid) und Digoxin (ein Cardenolid). Grundgerüst ist ein Steroid mit einer cis-Verknüpfung der Ringe A/B. Ein weiterer Baustein kann ein fünfgliedriger (Cardenolide) oder ein sechsgliedriger Lactonring (Bufadienolide) sein. Und schließlich ist ein Zuckerbaustein glykosidisch an das Steroidgerüst gebunden. Ouabain ist ein Glykosid aus dem Samen von Strophantus gratus und wird bei Herzinsuffienz, Arhytmien und Angina pectoris eingesetzt. Digoxin ist das Cardenolid von Digitalis purpurea, dem einheimischen Fingerhut, und wird zur Behandlung von Herzkrankheiten eingesetzt.

Das Digoxin ist ebenfalls durch einen 5er-Lactonring gekennzeichnet, sein Zuckerbaustein ist der Dreifachzucker Digitoxose. Das Aglykon Digitoxigenin unterscheidet sich vom Bufalin nur durch den 5er Lactonring (Übersicht Tabelle 18).

Herzaktive Steroide kommen sowohl in der Tier- als auch in der Pflanzenwelt vor und entstammen dort dem Sekundärstoffwechsel. Die Untersuchung der Rolle endogenen Ouabains bei der Regulation des Bluthochdrucks und seine mögliche Funktion als Hormon zeigt die klinische Relevanz der Wirkung der Herzglykoside und ist Gegenstand vieler Forschungsarbeiten.



Abbildung 3: Die Aglykone Digitoxigenin, Ouabagenin und Bufalin. Digitoxigenin ist das Aglykon des Digitoxins. Es unterscheidet sich vom Bufalin, dem Aglykon des Proscillaridin A, nur in seinem 5er Lactonring. Ouabagenin, oder g-Strophanthidin, ist das Aglykon des Ouabains.

### Palytoxin : Ein Hemmstoff der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

Palytoxin (Ptx), C<sub>129</sub>H<sub>223</sub>N<sub>3</sub>O<sub>54</sub>, ist ein Gift mit einem Molekulargewicht von 2660 bis 2680 g/mol (siehe Abbildung 4). Es ist als das stärkste Gift tierischen Ursprungs bekannt und besitzt einen LD<sub>50</sub>-Wert von 10-250 ng/kg Körpergewicht bei Nagetieren (Habermann 1989). Synthetisiert wird es von marinen Korallen des Genus *Palythoa* (Moore 1971). An seinem Rückgrat aus Kohlenstoffatomen sind 41 Hydroxylgruppen gebunden. Erste Arbeiten mit Palytoxin an Vertebratenzellen zeigten eine Vielzahl von Effekten: es bewirkt einen Natriuminflux und einen Kaliumefflux und stimuliert den Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>-Austauscher. Die Depolarisation der Zelle steigt an; dadurch werden

spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle geöffnet und der Ca<sup>2+</sup>-Gehalt im Cytosol wird erhöht. Am Ende der Reaktionskaskade steht dann die Zelllyse (Ishida, Takagi et al. 1983; Habermann 1989). Unklar war bis dahin, mit welchem Reaktionspartner das Palytoxin tatsächlich in der Zelle interagiert und welche der oben aufgezählten Wirkungen Sekundäreffekte sind. Der Arbeitsgruppe von Scheiner-Bobis gelang es mit Hilfe der heterologen Expresssion der Natriumpumpe in der Hefe Saccaromyces cerevisiae die Natriumpumpe als Angriffsort des Palytoxins zu identifizieren (Scheiner-Bobis, Meyer zu Heringdorf et al. 1994; Redondo, Fiedler et al. 1996). Hefezellen besitzen keine endogene Natriumpumpe (Horowitz, Eakle et al. 1990) und zeigen auch keinen Kaliumefflux unter Anwesenheit von Palytoxin. An Hefezellen jedoch, die die Natriumpumpe exprimieren, zeigt sich ein deutlicher durch Palytoxin induzierter K<sup>+</sup>-Efflux. Wichtig ist dabei, dass beide Untereinheiten der Natriumpumpe vorhanden sind. Borationen potenzieren den K<sup>+</sup>-Efflux durch Ptx, weil sie möglicherweise mit einigen Hydroxylgruppen im Giftmolekül interagieren. Theoretisch ist es möglich, dass entweder die Ptx-Borat-Komplex strukturell so verändert wird, dass er besser von der Pumpe erkannt wird oder dass die Borationen das Ptx mit der β-Untereinheit verknüpfen (Scheiner-Bobis, Meyer zu Heringdorf et al. 1994).



Abbildung 4. Chemische Struktur des marinen Korallengiftes Palytoxin (Ptx) mit der Strukturformel  $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$ . Seine letale Dosis (LD<sub>50</sub>) beträgt 10-250 ng/kg Körpergewicht bei Nagetieren.

Hefezellen, die eine Natriumpumpe exprimieren, an denen Mutationen außerhalb der putativen ionophoren Struktur der Natriumpumpe durchgeführt worden sind (Glu953 und Glu954), zeigen keinen zum Wildtyp veränderten K<sup>+</sup>-Efflux. (Scheiner-Bobis 1998) postulierte daher, dass es das Ionophor der Pumpe ist, welches mit dem Korallentoxin interagiert und es in einen permanent offenen Kanal überführt.

Aber wo liegt der Unterschied zwischen Ionenpumpen und Ionenkanälen? Eine der wichtigsten Unterschiede ist der, dass bei Stimulation der Kanäle die ionenleitende Struktur an beiden Seiten der Plasmamembran gleichzeitig geöffnet wird und die Ionen entlang ihres Gradienten fließen können. Bei den Ionenpumpen jedoch ist immer nur eines der beiden Zugangstore geöffnet (Hille 1992).

### lonenpumpen und lonenkanäle

In Ionenkanälen werden einzelne Ionen über hintereinander liegende Bindungsstellen schrittweise durch eine Pore geleitet (single-fill Mechanismus). Die Poren der Ionenkanäle sind evolutionsbiologisch entstanden, um eine maximale Leitfähigkeit unter Berücksichtigung der Selektivität zu erreichen (Hilgemann 2003). Entlang ihres elektrochemischen Gradienten können etwa 10<sup>8</sup> Ionen pro Sekunde fließen (Artigas and Gadsby 2003). Das Öffnen und Schließen der Eingangstore geschieht unabhängig von einer Ionenbindung (Hilgemann 2003). Von K<sup>+</sup>-Kanälen weiß man, dass die K<sup>+</sup>-Ionen über Ion-Dipol-Interaktionen koordiniert werden. Diese Art der chemischen Wechselwirkung ist dann möglich, wenn das Ion eine Hydrathülle ausbildet. Der Kanal ist so ausgerichtet, dass das hydratasierte Ion energetisch genau in den Eingangstrichter des Kanals passt. Dem folgt strukturell ein "Flaschenhals", durch den die Ionen hindurch müssen. Dabei streifen sie ihre Hydrathülle ab. Der Verlust der Hydrathülle wird aber sogleich kompensiert, indem dem durch Carboxylgruppen in der hinter Trichter liegenden Pore die Wasserumgebung imitiert wird. So ist energetisch der Transport eines hydrophilen Moleküls durch die hydrophobe Membran möglich (Sansom, Shrivastava et al. 2000). Die Selektivität erhält der Kanal durch die Größe seiner Pore, in die das zu leitende lon passt.

Bei Ionenpumpen hingegen wird die Umsatzrate des Moleküls über eine Konformationsänderung erzielt, so dass kein single-fill Mechanismus notwendig ist.

Die zu transportierenden Ionen werden in einem festen stöchiometrischen Verhältnis aebunden. Ionendurchsatz Der wird durch Ionenbindung an definierten erlaubt somit eine hohe Selektivität und Bindungsstellen gekoppelt und Zuverlässigkeit (Hilgemann 2003). Gegenüber den Ionenkanälen ist ihre Leitfähigkeit sehr viel geringer und liegt im Bereich von 10<sup>2</sup> Ionen pro Sekunde (Artigas and Gadsby 2003). Diese Form des Transportes erfordert theoretisch mindestens zwei Konformationszustände: einen, in dem die extracellulären Ionen selektiv erkannt und transportiert werden können, und den, in dem genau die lonen erkannt werden, die von der intrazellulären Seite transportiert werden sollen.

Wie bewirkt das Palytoxin den Übergang von der Ionenpumpe zum Ionenkanal? Und welche Eigenschaften hat dieser Kanal? Ist er einfach nur eine Art Loch, das einen gradientenabhängigen Ionenfluss erlaubt?

Habermann berichtet von geringen Permeabilitätsunterschieden an durch Ptx induzierten Ionenkanälen für monovalente Kationen. In absteigender Reihenfolge lässt der durch Ptx-induzierte Kanal Na<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> und Cholin hindurch. Sehr viel weniger gut permeieren die divalenten Kationen Ba<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> (Habermann 1989). Redondo, Fiedler et al. untersuchten den K<sup>+</sup>-Efflux als Funktion des extrazellulären Kations an Hefezellen. Der durch Ptx-induzierte Kanal war selektiv für monovalente Kationen wie Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup> und Li<sup>+</sup>, ließ jedoch große monovalente Kationen, wie Guanidinium oder Cholin, nicht passieren (Redondo, Fiedler et al. 1996). Über die Messung der Membranleitfähigkeit an Ventrikelzellen mit der Methode des Patchclamp fanden (Artigas and Gadsby 2003) ebenfalls sehr geringe Unterschiede in der Leitfähigkeit kleiner Kationenmoleküle. Am besten konnte Ti<sup>+</sup> den Kanal passieren, gefolgt von Kalium, Rubidium, Caesium und Natrium. Sogar Tetramethylammonium mit einem Durchmesser von 6 Å war in der Lage, den Ptx-induzierten Kanal zu durchdringen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Weite an der engsten Stelle mindesten 6 Å beträgt.

Weiterhin ist bekannt, dass der Palytoxin-induzierte Kanal unabhängig von der ATPase-Aktivität der Natriumpumpe gebildet wird (Schneider and Scheiner-Bobis 1997). Aus einer neueren Arbeit ist bekannt, dass Palytoxin auch mit der H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- ATPase des Kolons interagiert (Scheiner-Bobis, Hubschle et al. 2002).

Der durch Palytoxin-induzierte Kaliumefflux kann durch das Ouabain gehemmt werden (Hansen 1973; Habermann 1989; Scheiner-Bobis, Meyer zu Heringdorf et al. 1994; Jorgensen, Rasmussen et al. 1997)

### Die Kristallstruktur der Ca<sup>2+</sup>-ATPase als Modell für die Struktur der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

Bisherige Untersuchungen zum Transportmechanismus und der Identifikation des Ionophores an der Natriumpumpe brachten einige Hinweise für bestimmte Regionen oder Aminosäuren, die sehr wahrscheinlich an der Ionenerkennung und dem Ionentransport beteiligt sind. Durch tryptische Verdauung wurden sogenannte 19kDa-Membranen identifiziert, die noch in der Lage sind, Na<sup>+</sup> oder das K<sup>+</sup>-Analogon Rb<sup>+</sup> einzuschliessen (Karlish 1990; Shainskaya 1994). Da diese 19kDa-Membranen aus den carboxyterminalen Membrandurchgängen M7 bis M10 bestehen, lag der Schluss nahe, dass diese Membrandurchgänge die ionophore Struktur der Natriumpumpe bilden.

Toyoshima et al. kristallisierten die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA 1a) in dem Stadium, in dem sie zwei Ca<sup>2+</sup>-Ionen transmembranär gebunden hat. Die kristalline Struktur gibt Aufschluss über die funktionelle Architektur des Enzyms mit den entsprechenden Aminosäuren (Toyoshima, Nakasako et al. 2000). In Abbildung 5 sind die dreidimensionalen Strukturen aus den Kristalldaten der SERCA1a in einem zweidimensionalen Bild zusammengefasst.

Die Ausdehnung des Enzyms umfasst 100 Å · 80 Å · 140 Å. (Zum Vergleich: Die Dicke einer einzelnen Lipidschicht einer Membran beträgt etwa 27 Å) und zeigt im groben 2 Gliederungsbereiche (siehe auch Abb. 5): Den cytoplasmatischen Teil und den in die Membran eingebetteten Teil. Dieser transmembranäre Teil umfasst 10  $\alpha$ -Helices (M1 bis M10). Der cytoplasmatische Abschnitt ist wiederum in 3 Teile gegliedert: die A-, N- und P-Domäne. Die P-Domäne liegt zentral und birgt den Aspartatrest 351 (entspricht Asp368 der Natriumpumpe des Schafes), an den das  $\gamma$ -Phosphoratom des ATP gebunden wird. Die N-Domäne erhält ihren Namen eben durch die Eigenschaft, dass hier die Region enthalten ist, die das Nukleotid, also das ATP, bindet. Die A-Domäne wird so genannt, weil sie eine Art Anker darstellt für die N-Domäne, die sich im Zuge der ATP-Bindung an die P-Domäne heranbewegt. N-

und P-Domäne befinden sich im Loop M4/M5 und sind deutlich getrennt von der A-Domäne, die im Loop M2 / M3 gebildet wird.



**Abbildung 5: Topologiemodell der Calciumpumpe.** Die Abbildung wurde aus der dreidimensionalen Darstellung der SERCA1a, welche als 1EUL-Datei im Internet verfügbar ist und mit dem Programm VMD 1.8.1 betrachtet wurde, rekonstruiert. Zu sehen sind die 10 Transmembrandomänen (M1-M10) sowie der cytoplasmatische Teil mit N-, P- und A-Domäne. Die hervorgehobenen Aminosäuren V304 und A305 in M4, N768 und E771 in M5, N796 und D800 in M6 und E908 in M9 sind an der Koordination der Calciumionen beteiligt. D351 enstpricht D369 in der Natriumpumpe des Schafes und ist der Aspartatrest, der im Reaktionszyklus phosphoryliert wird.

Die Länge und die Neigungswinkel der Helices im transmembranären Bereich der Pumpe sind stark unterschiedlich. Das zentrale Element des Proteins bildet M5. Mit einer Länge von 60 Å erstreckt er sich von der luminalen Oberfläche bis zur cytoplasmatischen Domäne. Die luminalen Loops sind bis auf den zwischen M7 und M8 kurz. Auffällig ist auch, dass die Transmembrandomänen M4 und M6 unterbrochen sind. Im ungewundenen Bereich von M4 erscheint das sogenannte PEGL-Motiv. Es handelt sich hierbei um eine Aminosäuresequenz, die bei allen tierischen ATPasen auftritt und vermutlich eine Rolle in der Energieübertragung spielt. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sich in Protonenpumpen an der Stelle des negativ geladenen Glutamats das neutrale Valin befindet (Moller, Juul et al. 1996).

### Die Ca<sup>2+</sup> Koordinationsstellen

Aus dem Röntgenkristall ist ersichtlich, dass an der Koordination der beiden Ca<sup>2+</sup>-Ionen die vier Transmembrandomänen M4, M5, M6 und M8 beteiligt sind (siehe Abbildung 5 und 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Ca<sup>2+</sup>-Koordinationsstellen in SERCA1a.** Die Transmembrandomänen M4, M5, M6 und M8 sind an der Koordinierung der Ca<sup>2+</sup>-Ionen beteiligt. Die Seitenketten von Glu309, Asn768, Glu771, Asn796, Thr799, Asp800, Glu908 und die Hauptkettencarbonyle von Val304, Ala305 und Ile307 liefern je sechs Koordinationsgruppen für jedes der zwei Calciumatome. Asp800 nimmt in M6 eine zentrale Position ein.

Die Seitenketten von Glu309, Asn768, Glu771, Asn796, Thr799, Asp800, Glu908 und die Hauptkettencarbonyle von Val304, Ala305 und Ile307 tragen je sechs Koordinationsgruppen für jedes der zwei Calciumatome bei. Beide Ionen sind weitestgehend ohne Hydrathülle und Seite an Seite koordiniert mit einem Abstand von 5,7 Å in der Mitte des Transmembranbereiches. Die  $\alpha$ -Helices M4 und M6 bieten an den unterbrochenen Bereichen eine optimale Koordinationsgeometrie für die Ca<sup>2+</sup>-Ionen.

Die Tatsache, dass die Ionen durch Liganden gebunden werden, die Sauerstoffe tragen (Carboxylgruppen, Hydroxylgruppen von Serin und Threonin, Amid-Sauerstoffe und Sauerstoffe von  $\alpha$ -Carbonylgruppen), bestätigt die Daten von Pedemenonte und Goldshleger (Pedemonte 1986; Goldshleger 1992). Sie folgerten

aufgrund der Hemmung der Natriumpumpe durch Carbodiimide, dass saure Aminosäuren an der Ausbildung des Ionophores beteiligt sein müssen.

Die Arbeitsgruppe von Toyoshima zeigte durch einen Vergleich zweier Strukturen der  $Ca^{2+}$ -ATPase, die sie während ihres Tranportzyklus einimmt, die Veränderungen, die im Laufe des Transportprozesses auftreten (siehe Abb. 7). In Gegenwart von Thapsigargin (TG), einem potenten Hemmstoff der Ca<sup>2+</sup>-ATPase, wird das Enzym in einem zu E<sub>2</sub> analogen Zustand fixiert (Toyoshima und Namura 2002).



Abbildung 7: Der Konformationsübergang von  $E_1$  nach  $E_2$  in der Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Toyoshima, Nomura et al. 2003). Die linke Abbildung zeigt die Ca<sup>2+</sup>-ATPase in der  $E_1$ -Konformation. Die pinkfarbenen Kreise zeigen gebundene Calciumionen. Die pinkfarben gepunkteten Pfeile zeigen die Richtung an, in die sich N-, P-, und A-Domäne beim Konformationsübergang zu  $E_2$  bewegen. Die rechte Abbildung repräsentiert den Konformationszustand  $E_2$  in Gegenwart von Thapsigargin. Thapsigargin ist ein Hemmstoff der Ca<sup>2+</sup>-ATPase, der das Enzym in einer Form fixiert, die analog zu  $E_2$  ist.

Beim Übergang von  $E_1Ca^{2+}$  zu  $E_2(TG)$  verlagert sich der gesamte cytoplasmatische Teil der Calciumpumpe. Die A-Domäne nähert sich der N- und P-Domäne an. Vermutlich interagiert der cytoplasmatische Loop M6/M7 mit der P-Domäne, um eine Verbindung zwischen Ionenbindung und Phosphorylierung herzustellen. Es handelt sich hierbei um Bewegungen beträchtlichen Ausmaßes. Nimmt man die Zellmembran als Fixpunkt, dann neigt sich die N-Domäne um fast 90° zur A-Domäne hin. Die A- Domäne wiederum rotiert um 110° und bewegt dadurch die N-Domäne mit. Global gesehen verschiebt sich die gesamte cytoplasmatische Domäne von M10 in Richtung M1. Die Neigungsbewegung der P-Domäne ist direkt verbunden mit der Bewegung der Transmembrandomänen, vor allem von M5. Diese Bewegung stellt vermutlich das entscheidende Ereignis beim Ionentransport dar.

Auch die Lage der Transmembrandomänen zueinander verändert sich. M1 und M2 bewegen sich nach oben in Richtung Cytoplasma. M3 und M4 hingegen gleiten bis zu 5 Å nach unten, was beinahe dem Betrag einer Helixwindung (5.4 Å) entspricht. M6 ist indirekt über den Loop M6/M7 mit der P-Domäne verknüpft. Das heißt, dass auch die Helices M3 bis M6 ihre Lage verändern, wenn die P-Domäne bewegt wird, z.B. durch eine Beugung von M5. Die P-Domäne scheint also als Koordinationselement für die Transmembranhelices zu fungieren.

### Die Interaktion der beiden Untereinheiten in der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

Natrium- und Protonen-ATPasen besitzen neben der  $\alpha$ -Untereinheit auch eine  $\beta$ -Untereinheit. Sie transportieren Natrium bzw. Protonen im Austausch mit Kalium. Der Calciumpumpe fehlt diese  $\beta$ -Untereinheit. Der Ort der Interaktion von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit kann also durch die Röntgenkristallographie der Calciumpumpe nicht näher bestimmt werden. Mittels chimärer Proteine aus Natriumpumpe und Protonenpumpe als auch Natriumpumpe und Calciumpumpe wurden intra-, extrazelluläre wie auch transmembranäre Bereiche identifiziert, an denen die beiden Untereinheiten miteinander interagieren (Lemas 1994; Ueno 1995). Dabei scheint es in der Natriumpumpe eine Interaktion der beiden Untereinheiten zwischen dem transmembranären Teil der 
ß-Untereinheit und der Transmembrandomäne der 
a-Untereinheit zu geben, die im Bereich von M8, M9, M10 stattfindet. Sehr ausgeprägt scheint dabei der Kontakt mit M8 zu sein, welcher Bestandteil der Ionenkoordinationsstelle in der Calciumpumpe ist (Goldshleger 1992; Sarvazyan 1995). Der cytoplasmatische Teil der β-Untereinheit scheint sich nahe dem Loop zwischen M6 und M7 der  $\alpha$ -Untereinheit zu befinden und bildet nach dem Urteil der Autoren vermutlich einen Teil des Eingangsportals für die Ionen (Shainskaya, Schneeberger et al. 2000).

### Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welchen Einfluss der Zuckerbaustein der herzaktiven Steroide für die Hemmung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase einnimmt. Dazu wurde an drei Isoformen der  $\alpha$ -Untereinheit untersucht, wie stark der durch Ptx- induzierte K-Efflux von verschiedenen herzaktiven Steroiden im Vergleich zu deren Aglykonen gehemmt wird.

Ein zweiter Teil beleuchtet die Frage, ob der Ptx- induzierte Kanal das Ionophor der Natriumpumpe ist, welches in permanent-offener Form arretiert wird. Um dieses zu untersuchen, wurden Mutationen im Bereich der alpha-Untereinheit der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>- ATPase eingeführt, der möglicherweise an der Ionenleitung beteiligt ist. Die letzte Annahme basiert auf Erkenntnissen aus der Strukturanalyse der Ca<sup>2+</sup>-ATPase.

### 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

### 2.1.1 Zellen

Es wurde sowohl mit Bakterien- als auch mit Hefezellen gearbeitet.

*Escherichia coli (E.coli*)-Zellen des Stammes DH5 $\alpha$ F<sup>′</sup> dienten der Amplifikation der Plasmide, die die cDNA der zu mutierenden Abschnitte trugen. Der Genotyp dieses Stammes ist folgendermaßen spezifiziert: F<sup>′</sup> $\Phi$ d *lac*Z $\Delta$ M15 *rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*-1 *hsd*R17(r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *sup*E44 *rel*A1 *deo*R  $\Delta$ (*lac*ZYA-argF)U169. Das Plasmid ist ein Produkt der Firma Gibco (Eggenstein/Deutschland). Darüber hinaus erfolgte die Replikation mutierter Plasmid-DNA in superkompetenten E.*coli*-Abkömmlingen des Stammes XL1-Blue, die im Mutagenese-Kit der Firma Stratagene (Amsterdam/Niederlande) mitgeliefert wurden.

In *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*)-Zellen des Stammes 30-4 wurden die nativen oder mutierten Natriumpumpen exprimiert. Diese Hefezellen tragen den Genotyp Mat-α trp 1 ura3 Vn2 GAL<sup>+</sup> und wurden freundlicherweise von Prof. Robert A. Farley vom Department of Physiology and Biophysics, University of Southern California, School of Medicine (Los Angeles/USA), zur Verfügung gestellt.

### 2.1.2 Vektoren

Als Hefevektoren wurde ein Abkömmling des YEp1PT eingesetzt, pCG1406 $\alpha\beta$  sowie ein Abkömmling des pGIT.

Über eine blunt-end-Ligation wurde in YEp1PT die cDNA der humanen  $\alpha$ 1-Untereinheit der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase einkloniert. Daraus resultiert eine Gesamtgröße von 11712 bp für den nun als YhNa1 bezeichneten Vektor (siehe Abb. 8). Er ist mit einem Phosphoglyceratkinase (PGK)-Promoter zur Regulation der mRNA-Synthese für die  $\alpha$ 1-Untereinheit ausgestattet und trägt das Gen für die Tryptophan-Biosynthese. Darüber hinaus besitzt dieser Shuttlevektor einen bakteriellen Replikationsursprung (ori) und trägt ein Ampicillinresistenz-Gen. Die Plasmide YhNa2 und YhNa3 wurden auf dieselbe Weise, wie oben angeführt, hergestellt und codieren für die humane  $\alpha$ 2 (YhNa2)- bzw.  $\alpha$ 3 (YhNa3) -Untereinheit. Sie wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Mueller-Ehmsen, Innere Medizin Klinik III, Universität zu Köln, Deutschland, zur Verfügung gestellt.



Abbildung 8:Genkarte des Shuttle-Vektors YhNa1, in den blunt-end die<br/>humane α– Untereinheit der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase ligiert wurde.<br/>Abgebildet sind der PGK-Promoter, der für die humane α1-Untereinheit der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-<br/>ATPase codierende DNA-Abschnitt (roter Pfeil) und die Schnittstellen für die<br/>Restriktionsenzyme Bgl II und Afl II.

Die cDNA der humanen  $\beta$ -Untereinheit wurde blunt-end in den Vektor pGIT kloniert. Das Plasmid umfasst 8872 bp und enthält einen Galaktose-Promoter zur mRNA-Synthese der humanen  $\beta$ 1-Untereinheit. Des Weiteren vermittelt dieses Konstrukt Ampicillinresistenz, besitzt einen Ursprung für die selbständige Replikation in *E.coli* (ori) und codiert das Gen für die Uracil-Biosynthese als Selektionskriterium in *S.cerevisiae*.

Die humane  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheit tragenden Vektoren YhNa1 sowie GhNb1 wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Robert A. Farley vom Department of Physiology and Biophysics, University of Southern California, School of Medicine (Los Angeles/USA), konstruiert und mir freundlicherweise zur weiteren Verwendung überlassen (siehe Abb. 9).



Abbildung 9: Genkarte des Shuttle-Vektors GhNb1. Gezeigt werden die Lage des Galaktose-Promoters und der für die humane b1-Untereinheit codierende cDNA-Abschnitt.

Der Hefevektor pCG1406 $\alpha\beta$  mit einer Größe von 13800 bp enthält die cDNA für die  $\alpha$ 1-Untereinheit der Schafsniere und die  $\beta$ 1-Untereinheit der Hundeniere. Dieses Plasmid präsentiert den 2µM Replikationsursprung der Hefe und den pBR322 Replikationsursprung (ori) von *E.coli.* Es vermittelt Penicillinresistenz für Bakterien und verleiht Hefezellen Tryptophan-Auxotrophie. Die mRNA-Synthese der beiden Untereinheiten wird durch den Kupfer-Metallthionin- und den Phosphoglycerat-Kinase-Promoter gesteuert.

In *E.coli*-Zellen wurde das high-copy-Plasmid pBluescript<sup>™</sup>KSII+ der Firma Stratagene Europe (Amsterdam/Niederlande) amplifiziert. Es diente der Mutagenese der cDNA der Natriumpumpe.

Für die diversen Mutanten wurden zwei verschiedene Klonierungsstrategien verfolgt: Zunächst wurde in das pBluescript<sup>™</sup>KSII+ Plasmid eine Schnittstelle für *Afl*II neu in die multiple cloning site eingeführt und anschließend das 1528 bp umfassende *Afl*II-*Bg*III-Fragment aus YhNa1 in den Vektor einligiert. Die Gesamtgröße des Vektors umfasste nun 4459bp. Als Selektionsmarker für E.*coli* vermittelt er Ampicillinresistenz. Dieser Vektor wurde für die Mutanten der Aminosäuren Glu779, Asn783, Asp804 und Asp807 verwendet (siehe Abb. 10).

Für die Mutanten Asp369 und Asp714 wurde in meiner Arbeitsgruppe eine *BstE*II Restriktionsstelle linkervermittelt eingebaut und als *BstE*II-*BgI*II-Fragment (1010 bp) in den Hefevektor pCG1406 $\alpha\beta$  eingebaut. Diese Arbeiten wurden von Frau Dr. Ping Su durchgeführt.



Abbildung 10: Genkarte des Plasmids pBluescript KSII<sup>+</sup>-α1h, in das das *Afl*I-*Bgl*II- Fragmente der humanen Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase einligiert wurde. Die humane α1-Untereinheit wird vom roten Pfeil repräsentiert. Dieses *Afl*II / *Bgl*II-Fragment stammt aus YhNa1.

### 2.1.3 Oligonukleotide (Primer)

Die Synthese der Oligonukleotide wurden bei der Firma Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe/Deutschland) in Auftrag gegeben.

Für die Konstruktion einer neuen Restriktionsstelle für *Afl*II (Erkennungssequenz fett markiert) in den pBluescript KSII+ Vektor, der bereits eine zusätzliche Schnittstelle für *Bgl*II besitzt, wurde nachfolgend aufgeführter Oligonukleotid-Linker in das Plasmid ligiert:

# Abbildung 11: Oligonukleotid-Linker für die Konstruktion von pBluescript<sup>TM</sup>KSII+*AfI*II.

Oligonukleotid a Oligonukleotid b

<sup>5</sup>CCTTAAGGGTGACCA<sup>3</sup> <sup>5</sup>GATCTGGTCACCCTTAAGGGGGCC<sup>3</sup>

Die nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide wurden für die Mutagenese eingesetzt. Die Oligonukleotide sind jeweils zu einem der beiden Stränge komplementär und liegen sich genau gegenüber. Die im Vergleich zur cDNA der nativen Pumpe veränderten Basen sind fett gedruckt.

Für diagnostische Zwecke wurden zusätzlich Basen verändert, durch die die Aminosäuresequenz nicht verändert wird, aber Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen hinzu kommen oder wegfallen und die deshalb als stille Mutation bezeichnet werden. Die Basen, die eine stille Mutation herbeiführten, sind durch fette, kursiv und unterstrichene Schrift markiert.

Tabelle 1: Oligonukleotide für die Konstruktion von Mutationen in Gln779.

Glu779Asp	<sup>5</sup> CAGGAACGGGGTGATATCGGGGAATGTTACTGG <sup>3</sup>
Glu779Asp	<sup>5</sup> CCAGTAACATTCCCGATATCACCCCGTTCCTG <sup>3</sup>
revers	
Glu779Gln	<sup>5</sup> GGAACGGGGTGAT <b>CTG</b> GGGAATGTTACTGG <sup>3</sup>
Glu779Gln	<sup>5</sup> CCAGTAACATTCCCCAGATCACCCCGTTCC <sup>3</sup>
revers	

Durch die neue Basenfolge fällt eine Schnittstelle für Aval weg.

### Tabelle 2: Oligonukleotide f ür die Konstruktion von Asn776Ile.

Asn783Ile	<sup>5</sup> GGAACGGGGTGATCTC <u>C</u> GGAATGATACTGGTTAAGGTATAAGC <sup>3</sup>
Asn783Ile	<sup>5</sup> GCTTATACCTTAACCAGTA <b>T</b> CATTCC <u>G</u> GAGATCACCCCGTTCC <sup>3</sup>
revers	

Durch den Austausch von G gegen C (fett, kursiv, unterstrichen markiert) wurde eine neue Schnittstelle für *Bsp*EI eingeführt.

### Tabelle 3: Oligonukleotide für die Konstruktion von Asp804Asn.

Asp804Asn	<sup>5</sup> GGCAGGTA <u>C</u> CATGTCAGTGCCCAAGTTAATGCAGAGG <sup>3</sup>
Asp804Asn	<sup>5</sup> CCTCTGCA <b>TTA</b> ACTTGGGCACTGACAT <u>G</u> GTACCTGCC <sup>3</sup>
revers	

Durch den Austausch von T gegen C (fett, kursiv, unterstrichen markiert) wurde eine neue Schnittstelle für *Kpn*l eingeführt.

### Tabelle 4: Oligonukleotide für die Konstruktionen von Mutationen in Asp807.

Asp807Ala	<sup>5</sup> GAGATGGCAGG <u>T</u> ACCATGGCAGTGCCCAAGTC <sup>3</sup>
Asp807Ala	<sup>5</sup> GACTTGGGCACTGCCATGGT <u>A</u> CCTGCCATCTC <sup>3</sup>
revers	
Asp807Gln	<sup>5</sup> GGAGATGGCAGG <u>T</u> ACCAT <b>CTG</b> AGTGCCCAAGTC <sup>3</sup>
Asp807Gln	<sup>5</sup> GACTTGGGCACT <b>CAG</b> ATGGT <u>A</u> CCTGCCATCTC <sup>3</sup>
revers	

Durch den Ersatz von A gegen T (fett, kursiv, unterstrichen markiert) wird eine neue Schnittstelle für *Kpn*l eingeführt.

### Tabelle 5: Oligonukleotide f ür die Sequenzierung des AflII-BglII-Fragmentes.

SEQ-α1h-I	<sup>5</sup> CCATAGGCCATGCTGATCAGCCG <sup>3</sup>
SEQ-α1h-II	<sup>5</sup> GGGGCCTCGGAGAACGAGTCC <sup>3</sup>

Neben diesen wurden die handelsüblichen Sequenzierprimer T3 und T7 eingesetzt.

### 2.1.4 Restriktionsendonukleasen und DNA- modifizierende Enzyme

Die für die Restriktionsanalyse notwendigen Enzyme wurden von den Firma MBI Fermentas (Vilnius/Litauen), Stratagene Europe (Amsterdam/Niederlande) und New England Biolabs (Frankfurt a. M./Deutschland) bezogen.

Für die Mutagenese auf PCR-Basis wurde die im von der Firma Stratagene bezogenen Mutagenese-Kit mitgelieferte PfuTurbo DNA-Polymerase eingesetzt. Zur Verdauung methylierter maternaler DNA diente das Restriktionsenzym *Dpn*I, welches ebenfalls Bestandteil des Kits ist. Zur Katalyse der Ligation wurde die T4-DNA-Ligase der Firma MBI Fermentas (Vilnius/Litauen) verwendet.

Alle Enzyme wurden mit zugehörigen, optimalen Puffern geliefert.

### 2.1.5 Antikörper

Für den Nachweis der humanen α-Untereinheit der Natriumpumpe wurde der bei der Firma ABR-Affinity Bioreagents Inc. (Golden/USA) käuflich erworbene Primärantikörper "Sodium/Potassium ATPase Alpha" verwendet. Die humane β-Untereinheit der Natriumpumpe wurde mit dem "Sodium/Potassium ATPase Beta"-Antikörper derselben Firma detektiert. Den Vertrieb in Deutschland übernimmt dabei die Firma Dianova (Hamburg/Deutschland).

Ein mit Meerrettich-Peroxidase markierter Anti-Maus-IgG-Antikörper der Firma Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg/Deutschland) wurde als Zweitantikörper verwendet. Dieser Zweitantikörper ist Bestandteil des ECL<sup>™</sup>Western blotting analysis System RPN 2108.

### 2.1.6 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Bezugsquelle für das bei der DNA-Fällung eingesetzte Isopropanol ist die F.E.R.O.S.A (Barcelona/Spanien). Für die Agarosegele wurde Agarose der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen/Deutschland) verwendet. Als Größenstandard bei der Agarose-Gel-Elektrophorese diente der GeneRuler<sup>™</sup>1 kb DNA Ladder von MBI Fermentas (Vilnius/Litauen), der zugleich eine Referenzbande für die DNA-Quantifizierung enthält. Der Auftragungsspuffer, der die Farbstoffe Bromphenolblau, Xylenolcyanol sowie Glycerin enthält, diente dem leichteren
Befüllen der Taschen mit DNA-Proben; außerdem wandern die Farbstoffmoleküle als Kontrolle in der Elektrophorese mit. Er wurde von der Firma MBI Fermentas (Vilnius/Litauen) bezogen.

RNase sowie das Lysozym stammen von der Boehringer Mannheim GmbH & Co (Karlsruhe/Deutschland). Die Proteasen-Inhibitoren Leupeptin-Hemisulfat, Pepstatin, Phenylmethylsulfonylfluorid sowie D-Galactose und D-Glucosemonohydrat für die Hefemedien wurden von der Firma AppliChem GmbH (Darmstadt/Deutschland) bezogen. Darüber hinaus wurden Natrium-di-hydrogenphosphat sowie Di-Natriumhydrogenphosphat von dieser Firma erworben. Lithiumdodecylsulfat (LiDS), Triton X-100 sowie Tween 20 von Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg/Deutschland) wurden als Membransolubilsatoren eingesetzt

Von Fluka Chemie AG (Buchs/Schweiz) stammen das Dithiothreitol (DTT) und das Imidazol für die Mikrosomenpräparation. Yeast nitrogen base w/o amino acids, Bacto-Agar und Bacto-Peptone für die Zellkultivierung sind Produkte von DIFCO Laboratories (Detroit/USA).

Der Protein-Marker für die SDS-PAGE ist eine vorgefärbte Mischung aus 6 Proteinen und wurde bei der PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen/Deutschland) erstanden. Als Referenzgröße für die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase diente die aus Schweinenieren isolierte Natriumpumpe. Sie wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schoner vom Institut für Biochemie und Endokrinologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen (Deutschland), zur Verfügung gestellt. Mit dem Farbstoff PhastGel<sup>™</sup> Blue R der Firma Amersham Biotech Europe GmbH (Freiburg/Deutschland) wurden die SDS-Gele angefärbt. Die Übertragung der Proteine im Semi-Dry-Verfahren erfolgte auf die Nitrocellulosemembran OPTITRAN BA-S85 Reinforced NC der Firma Schleicher & Schuell (Dassel/Deutschland). Als Filterpapier diente das Whatmann 3MM Chromatographie-Papier der Firma Biometra (Göttingen/Deutschland).

Die Belichtung bei der chemiluminiszenten Detektion der Proteinbanden erfolgte auf einem x-omat-Film der Eastman Kodak Company (New York/USA).

Der Schwarz-Weiß-Entwickler Dokumol stammt von der Firma Tetenal Photowerk GmbH & Co KG (Norderstedt/Deutschland), ebenso die Fixierlösung Variospeed Superfix<sup>®</sup>-Fixierbad.

Die Firma Perkin-Elmer life sciences, Inc. (Boston/USA) war Bezugsquelle für tritiliertes Ouabain. Die Szintillationslösung "rotiszint eco-plus" stammt von der Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe/Deutschland).

Alle übrigen Chemikalien sind Produkte der Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim/Deutschland), Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe/Deutschland) oder Merck KgaA (Darmstadt/Deutschland).

Zur K<sup>+</sup>-Effluxmessung wurde das aus den marinen Korallen der Art *Palythoa caribaeorum* isolierte Palytoxin eingesetzt. Bezogen wurde es von Dr. L. Beress vom Institut für Meereskunde an der Christian-Albrechts-Universität Kiel (Deutschland). Das bei der Flammenphotometrie eingesetzte Netzmittel sowie die K<sup>+</sup>-Standard-Lösung stammen von der Firma Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH (Hamburg/Deutschland).

### 2.1.7 Kits

Das QuickChange<sup>™</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene Europe (Amsterdam/Niederlande) enthielt die für die Mutagenese und E.coli-Transformation notwendigen ultrakompetenten Zellen und Chemikalien.

Die für die Klonierungsschritte in den Ligationen verwendeten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des Jetsorb Kits der Firma Genomed (Bad Oeynhausen/Deutschland) aus den Agarose-Gelen isoliert. Die Plasmide, die zur Überprüfung einer erfolgreichen DNA-Mutagenese sequenziert wurden, wurden nach dem QUIAprep Spin Miniprep Kit Protocol der Firma Qiagen GmbH (Hilden/Deutschland) aus den E.coli-Zellen isoliert.

Der Nachweis der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der chemiluminiszenten Komponenten aus dem ECL Western blotting analysis system 2108 der Firma Amersham Pharmacia Biotech Europe (Freiburg/Deutschland). Dieses Kit enthält auch den sekundären Anti-mouse-IgG-Antikörper.

Zur indirekten Bestimmung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Aktivität anhand des umgesetzten Phosphates wurde das EnzCheck Phosphatase Assay Kit (E-6646) der Firma Molecular Probes (Eugene, Oregon/USA) eingesetzt.

### 2.1.8 Puffer und Medien

Für die Herstellung wässriger Lösungen wurde deionisiertes Wasser verwendet. Es stammte aus der ARIUM 611 UF-Anlage der Firma Sartorius (Göttingen/Deutschland).

Lösungen und Medien für Klonierungsarbeiten oder für das Arbeiten mit Zellen wurden stets sterilisiert; entweder durch Autoklavieren bei 121°C und 1 bar Überdruck für 20 min, oder durch Filtration mittels Sterilfilter der Marke Millex<sup>®</sup> mit

einer Porengröße von 0,23 µm der Firma Millipore Corporation (Bedford/USA). Nichtsterile Glas- und Plastikgefäße sowie Pipettenspitzen wurden ebenfalls unter den oben genannten Bedingungen autoklaviert. Der verwendete Autoklav ist ein Gerät der Firma Webeco GmbH (Bad Schwartau/Deutschland).

Nachfolgend sind Lösungen, Medien und Puffer aufgeführt:

Tabelle 6:	Lösungen, Medie	n und Puffer:	Aufgeführt s	sind die Rezepte fü	ir alle Lösungen,
Medien und Put	ffer.				

Aminosaure-Supplement-Mix (100fach)	Jeweils 2g L-Adenin, L-Arginin/HCl, L-
	Histidin/HCl, L-Methion, jeweils 3g L-
	Tyrosin, L-Leucin, L—Isoleucin, L-
	Lysin/HCl, 5g L-Phenylalanin, jeweils10g L-
	Glutaminsäure, L-Aspartat, 20g L-Threonin
	auf 1 Liter dH <sub>2</sub> O
Ampicillin-Lösung	50 mg/ml dH <sub>2</sub> O
Coomassie-Blau-Lösung	1 Tablette PhastGel <sup>™</sup> BlueR in 500 ml
	10 %iger Essigsäure
Denaturierungspuffer	125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 4 M Harnstoff, 5
	% SDS, 5 % Mercaptoethanol, 12,5 % (v/v)
	Glycerin, 0,5 % $(v/v)$ in 0,1 % Ethanol
	gesättigte Bromphenolblaulösung
Ethidiumbromid-Lösung	10 µg Ethidiumbromid /100 ml dH <sub>2</sub> O
HBC-Puffer	0,5 mM Borsäure, 1mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM
	HEPES, mit Tris auf pH 7,5 eingestellt
Imidazol-Puffer	25 mM Imidazol, 1 mM Na-EDTA, auf pH
	7,5 eingestellt
LB (Luria-Bertani)- Medium	10 g NaCl, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g Pepton
	(tryptisch verdaut)
LB-Medium für Platten	LB-Medium mit 20 g Agar-Agar je Liter
Lysozym-Lösung	10 mg Lysozym / ml dH <sub>2</sub> O
Magermilchpulver- Lösung	0,5 g Magermilchpulver/ 10 ml PBS-Puffer
NZY-Broth-Medium	10 g NZ-Amin (caseinhydrolysiert), 5 g
	Hefe-Extrakt, 5 g NaCl auf 1 Liter dH <sub>2</sub> O
	eingestellt auf pH 7.5
PBS-Puffer	80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 100
	mM NaCl mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt
PBS-T-Puffer	PBS-Puffer mit 0,1% Tween <sup>®</sup> 20
Rnase-Lösung	10 mg RNase/ ml dH <sub>2</sub> O, 10 mM Tris/HCl pH
	7,5, 15 mM NaCl
Saccharose-Lösung 50% (w/v)	50 g Saccharose in 25 mM Imidazol/100ml
Saccharose-Lösung 20% (w/v)	20 g Saccharose in 25 mM Imidazol/100ml
SD-Gal-Medium	6,7 g Yeast nitrogen base w/o amino acids,
	20 g D (+) –Galaktose auf 1 Liter $dH_2O$
SDS-Laufpuffer	20 mM Tris, 100 mM Glycin, 0,1% SDS, pH
	8,3
STET-Lösung	0,5 % Triton X-100, 10 mM Tris/HCl

	pH 8,0, 50 mM EDTA, pH 8,0, 6 %
	Saccharose
Storage buffer	85 mM CaCl <sub>2</sub> , 15 % (w/v) Glycerol
TAE-Laufpuffer	40 mM Tris/Acetat pH 8,0, 1 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH
	8,0
Transferpuffer	10 mM 3-cyclohexylamino-1-
	propansulphonsäure (CAPS), pH 11,
	10 % Methanol
Tryptophan-Lösung	1 g Tryptophan /100 ml dH <sub>2</sub> O
Uracil-Lösung	0,2 g Uracil /100 ml dH <sub>2</sub> O
YBB-Medium	200 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl2,
	10 % (w/v) Glycerol, 2 mM DTT, 1mM Na <sub>2</sub> -
	EDTA, 0,5 mg/ml Leupeptin, 0,7mg/ml
	Pepstatin, 0,2 mg/ml PMSF
YNB-Medium	20 g D(+)-Glucosemonohydrat, 5 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1,7 g Yeast-nitrogen base w/o
	amino acids auf 1 Liter dH <sub>2</sub> O
YNB-Platten	YNB-Medium mit 40 g Agar-Agar pro Liter
	dH <sub>2</sub> O
YPD-Medium	20 g D(+)-Glucosemonohydrat, 10 g Hefe-
	Extrakt, 20 g Bacto-Peptone, 20 g Glukose
YPD-Platten	YPD-Medium mit 40 g Agar-Agar pro Liter
	dH <sub>2</sub> O

### 2.1.9 Geräte

Das für die Agarose-Gelelektrophorese sowie die SDS-Page und den Protein-Blot notwendige Spannungsgerät BluePower 500 ist ein Produkt der Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg/Deutschland). Verwendet wurden die Elektrophoresekammern Mini-Sub<sup>®</sup> oder Wide Mini-Sub<sup>®</sup> Cell der Firma Life-Science Bio-Rad Laboratories GmbH (München/Deutschland). Für die SDS-PAGE stand das Mini-Protean<sup>®</sup> II-Cell-System, für den Protein-Blot die Trans-Blot<sup>®</sup> SD Semi-Dry-Transfer-Zelle von derselben Firma zur Verfügung.

Ein BeadBeater der Firma Walther F.C. Ebel (Hamburg/Deutschland) wurde für das Aufbrechen der Hefezellen bei der Mikrosomenpräparation benutzt. Dabei wurden auch die von der Firma Biospec Products, Inc. (Bartlesville/USA) produzierten Silicaperlen (ø 0, 5mm) eingesetzt.

Von der Firma Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH (Hamburg/Deutschland) stammen der Thermocycler MasterCycler gradient für die Mutagenese sowie das Flammenphotometer zur Bestimmung des K<sup>+</sup>-Gehaltes wässriger Lösungen. Für die Auszählung der radioaktiven Counts bei Tritium Ouabain-Bindungsstudien wurde der Wallac 1409 Liquid Scintillationscounter der Firma Perkin-Elmer Wallac (Freiburg/Deutschland) eingesetzt.

Die Zentrifugationen, Inkubationen, Extinktionsmessungen wurden mit Geräten durchgeführt, die in biochemisch-molekularbiologischen Laboren üblicherweise vorhanden sind.

### 2.2 Methoden

### 2.2.1 Einsatz von Computerprogrammen

Die Aminosäuresequenzvergleiche zwischen den Isoformen der humanen Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase respektive zwischen der humanen α1-Untereinheit Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase und der sarkoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-ATPase des Kaninchens erfolgte mit dem Programm Protein blast (blastp) des National Center for Biotechnology Information (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</u>). Zum Vergleich der Sequenzen auf der Ebene der Nukleotide wurde das Programm Nucleotide Blast (blast n) benutzt.

Das Programm EndNote 6,0 diente der Literaturverwaltung. Mit diesem Programm war es auch möglich, Literatur über PubMed einzulesen.

Die Konzeption für Mutationskonstrukte erfolgte mittels VectorNTI 4.0 deluxe der Firma IforMax<sup>™</sup>, Inc. (Bethesda/USA). Dieses Programm verwaltet die Sequenzen der Plasmide, erlaubt theoretische Restriktionsanalysen und besitzt Werkzeuge für das Design von Oligonukleotiden für die Mutagenese. Die DNA-Sequenzdaten wurden mit dem Bioedit v5.09 Programm (North Carolina State University) gelesen und verglichen.

Die digitale Aufnahme und Archivierung von DNA-Agarosegelen wurde mit der PhoretixTotalLab<sup>®</sup> Software als Bestandteil des Gel-Dokumentationssystems der Firma Biostep Labor und Systemtechnik GmbH (Jahnsdorf/Deutschland) durchgeführt.

Die Darstellung der Mutationen als Computermodell erfolgte mit dem über das Internet (http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd) erhältlichen Programm VMD 1.8.1.

### 2.2.2 Arbeiten mit E.coli-Zellen

Die grundlegende Vorgehensweise beim Umgang mit Zellen wurde nach guter Laborpraxis durchgeführt. Arbeitsanleitungen für die Aufbewahrung, Vermehrung und Transformation der Bakterien basieren auf den Protokollen aus der Literaturstelle (Sambrook 1989).

### 2.2.2.1 Aufbewahrung, Anzucht und Kultivierung von E.coli-Zellen

Alle Bakterienklone wurden als Glycerolstock gelagert. Dazu wurden 500 µl einer Mini-Kultur (s.u.) in ein 1,5 ml Gefäß überführt und für 5 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 µl 15 % Glycerollösung (w/v) suspendiert. Dieser Stock wurde sodann bei -70°C gelagert.

Zur Anzucht der Bakterien wurden Zellen aus dem Tiefkühlstock auf einer mit Ampicillin versehenen LB-Agarplatte mittels einer Impföse verteilt und bei 37°C für 16 Stunden inkubiert. Die Kolonien dieser Platte waren im Kühlschrank (bei 4-8°C) haltbar und konnten über mehrere Wochen verwendet werden.

Zur Herstellung von Mini-Kulturen (5 ml), aus denen die Plasmide für weitere Arbeiten gewonnen wurden, wurden entsprechende Klone von einer LB-Agarplatte in LB-Medium angeimpft. Durch Zusatz von 7,5 µl Ampicillin wurde eine Selektion nach circa 16-stündiger Inkubation bei 37°C und unter Schütteln bei 150 rpm gewährleistet

### 2.2.2.2 Herstellung kompetenter E.coli-Zellen

Für die Transformation von E.coli mit dem pBluescriptKSII+ -Plasmid, in das eine neue Restriktionsstelle eingebaut wurde, wurden kompetente DH5 $\alpha$ F<sup>-</sup>-E.coli-Zellen verwendet.

### Die Herstellung erfolgte nach der sogenannten CaCl<sub>2</sub>- und MgCl<sub>2</sub>-Methode:

Mit einer Einzelkolonie wurde eine Mini-Kultur (s.2.2.2.1) angesetzt. Nach erfolgter Inkubation wurden 2-3 ml dieser Vorkultur in 200 ml LB-Medium überführt und bei 37°C und 100 Rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,6-0,7 bei 600 nm (OD<sub>600</sub> – Wert) gezüchtet. Sodann wurden die Zellen unmittelbar auf Eis gestellt, um ein weiteres Wachstum zu stoppen, und in sterile 50 ml Röhrchen überführt. Darin wurden die Zellen bei 4°C und 2800-g für 5 min abzentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen war, wurden die Zellen vorsichtig in 4 ml eiskalter, 100 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen. Dieser Waschschritt wurde 2- bis 3-mal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen diesmal in 2 ml eiskalter, 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt. Das Gesamtvolumen wurde wiederum mit eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung, auf 100 ml aufgefüllt und in sterile 50 ml Röhrchen gefüllt. Es erfolgte abermals eine Zentrifugation bei 4°C und 2800·g für 5 Minuten; der Überstand wurde verworfen und das Pellet in insgesamt 10 ml Storage buffer aufgenommen. Daraus wurden Aliquots á 100 µl abgenommen, mittels Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C aufbewahrt.

### 3.1.1.1 2.2.2.3 Transformation von E.coli

Zum Gebrauch wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurde circa 1 µg der Plasmidlösung pipettiert und vorsichtig gemischt. Dabei durfte das eingebrachte Volumen die kritische Größe von 10 µl nicht überschreiten, um eine Transformation zu gewährleisten. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz 4 Minuten bei 37°C und anschließend wieder auf Eis (5 Minuten) inkubiert. Nach dieser Prozedur wurde den Zellen 1 ml LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz für 60 Minuten bei 37°C und bei 150 Rpm geschüttelt. Danach wurden die Zellen bei 2800·g für 5 Minuten abzentrifugiert, anschließend in 100 µl TE-Puffer suspensiert und vorsichtig mit einem Drygalski-Spatel auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin verteilt. Nach 16stündiger Inkubation bei 37 °C waren bei erfolgreicher Transformation deutlich sichtbare Kolonien herangewachsen.

### 3.1.1.2 2.2.2.4 Transformation von Epicurian Coli XL1-Blue

Die Plasmide, deren cDNA mit dem QuickChange<sup>™</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit (s. 2.1.7) verändert worden sind, wurden in die dem Kit entstammenden Epicurian Coli XL1-Blue Superkompetenten Zellen eingebracht. Dies geschah nach folgendem Protokoll:

Die bei -70°C aufbewahrten Epicurian Coli XL1-Blue Superkompetente Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und anschließend in 50 µl- Aliquots je Reaktionsansatz in vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt. Je 1 µl der in die Zellen einzubringenden DNA wurde den Zellen beigemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine Hitzeschockbehandlung durch Überführung des Reaktionsgefäßes in ein 42°C warmes Wasserbad für 45 Sekunden und anschließender 2minütiger Inkubation auf Eis. Sodann wurden 500 µl des auf 42 °C vorgewärmten NZY-Broth-Medium hinzu gegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen vorsichtig auf einer mit Ampicillin vorbehandelten LB-Agarplatte verteilt und für 16 Stunden bei 37°C zum Wachstum aufbewahrt.

### 2.2.3 Arbeiten mit DNA

### 2.2.3.1 Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli-Zellen

Für die Gewinnung bakterieller Plasmide wurden 2 verschiedene Verfahren angewendet. Waren die Plasmide zur Mutagenese oder Klonierung bestimmt, wurden sie nach der auf Maniatis basierenden mini-boiling Methode gewonnen.

Dazu wurde eine Mini-Kultur (s.2.2.2.1) 5 Minuten bei 1000-g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 350 µl STET-Lösung vorsichtig suspendiert. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 25 ul Lysozym-Lösung versetzt, um die Zellwände aufzubrechen. Zur Inaktivierung dieses Enzyms wurde der Ansatz für 1 Minute in ein kochendes Wasserbad überführt und dann für 5 Minuten auf Eis gestellt. Im anschließenden 10minütigen Zentrifugationsschritt bei 12000 g wurde der Zelldebris sedimentiert und mittels einer Öse aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Danach erfolgte eine 15minütige Inkubation des Überstandes mit RNase bei 37°C. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 42 µl 10 M Ammoniumacetat und 420 µl Isopropanol hinzu gegeben, mit dem Vortex kräftig durchmischt und anschließend für mindestens 15 Minuten bei – 20°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 12000 g für mindestens 15 Minuten bei +4°C wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet durch zweimaliges Waschen mit 500 µl 70% (w/v) Ethanol von den Salzen befreit. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße mit der Plasmidlösung für circa 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Im letzten Schritt wurde das nun getrocknete Pellet in 30  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Für die Isolation von cDNA, die sequenziert werden sollte, wurde das Quiagen QUIAprep Spin Miniprep Kit verwendet (s.2.1.7 Kits).

Eine Mini-Kultur wurde für 5 Minuten bei 2800-g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die pelletierten Bakterienzellen in 250 µl Puffer P1 des QUIAprep Spin Miniprep Kit aufgenommen. Dabei wurden die Zellen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 250 µl des Puffers 2 des QUIAprep Spin Miniprep Kit hinzugefügt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße sanft 4- bis 6-mal über Kopf geschwenkt. Des Weiteren wurden 350 µl des Puffers N3 dazu gegeben und wie oben beschrieben vorsichtig gemischt, bis ein weißlicher Niederschlag zu sehen war. Dieser Niederschlag wurde durch eine 10minütige Zentrifugation bei 12000-g pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und auf die im Kit enthaltenen Säulen aufgetragen. Nach einer 1minütigen Zentrifugation bei maximaler Umdrehung wurde der Säulendurchfluss verworfen und 750 µl des

Waschpuffers PE des QUIAprep Spin Miniprep Kit auf die Säule gegeben. Es wurde wiederum für 1 Minute zentrifugiert und der Durchfluss abgesaugt. Nun erfolgte der DNA-Elutionsschritt, indem die Säule auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und nach Zugabe von 75 µl dH<sub>2</sub>O für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Bei der anschließenden Zentrifugation über 1 Minute bei 12000-g wurde die DNA von der Säule gewaschen und in dem Reaktionsgefäß aufgefangen.

#### 2.2.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen

DNA-Konzentration Die Bestimmung der in wässrigen Lösungen erfolgte spektrophotometrisch Grundlage des Absorptionsmaximums auf der von Nukleinsäuren bei 260 nm. Dazu wurde die DNA-Probe soweit mit dH<sub>2</sub>O verdünnt, bis die gemessene Absorption bei 260 nm zwischen 0,1 und 1,0 lag. Gemessen wurde in einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke gegen dH<sub>2</sub>O als Leerwert. Unter Berücksichtigung des Konversionsfaktors von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA konnte der Gehalt an DNA nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ermittelt werden.

Da Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm ein Absorptionsmaximum aufweisen, konnte die Reinheit der DNA-Lösung durch die gleichzeitige Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt werden. Bei einem Quotienten von 1.8 für OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> liegt eine reine DNA-Lösung vor. Werte über 1,8 weisen auf Verunreinigung mit RNA hin, Werte unter 1,8 auf Verunreinigungen mit Protein.

Die Detektionsgrenze dieser Methode liegt bei 0,25 µg/ml (Lottspeich 1998).

Um die Größen- und Mengenverhältnisse zwischen Insert und Vektor für die Ligationen abzuschätzen, wurden beide DNA-Fragmente und die Banden semiquantitativ auf der Grundlage eines mitgelaufenen Größen- und Mengenstandards (s. GeneRuler<sup>™</sup> 2.1.6) geschätzt. Die Nachweisgrenze für DNA-Fragmente in Ethidiumbromid gefärbtem Gel liegt dabei bei ca. 20 ng.

#### 2.2.3.3 Restriktionsanalysen

Im Nachfolgenden ist ein typischer Restriktionsansatz aufgelistet.

Zu 3  $\mu$ l der DNA-Lösung wurden 5  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O sowie 1  $\mu$ l des für das Restriktionsenzym spezifischen Puffers pipettiert. Als letztes wurde 1  $\mu$ l des Enzyms hinzugefügt und der Ansatz bei 37 °C für mindestens eine Stunde inkubiert. Enzyme, die über die vorgegebene Inkubationszeit unspezifische Schnittstellen schneiden (Star-Aktivität),

wurden nach dem Ende der Inkubationszeit bei den vom Hersteller angegebenen optimalen Bedingungen inaktiviert.

Um für die Ligationsansätze große Mengen der gewünschten Fragmente zu erhalten, wurde ein Vielfaches des obigen Ansatzes pipettiert.

### 2.2.3.4 Mehrfachrestriktionen

Waren bei einer Mehrfachrestriktion die Puffer für die verschiedenen Enzyme nicht kompatibel, wurde die DNA nach erfolgter Erstverdauung mit Natriumacetat aus dem Restriktionsansatz gefällt. Dazu wurden 17  $\mu$ l der DNA-Lösung mit 3 M NaOAc (pH 4,6) und 60  $\mu$ l 96 % (v/v) Ethanol vermischt und für mindestens 15 Minuten bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA für 15 Minuten bei +4°C abzentrifugiert und zweimal mit 500  $\mu$ l 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde dann für 2 min in der Vakuumzentrifuge oder für 15 Minuten bei 37°C getrocknet und anschließend in 8  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Hierzu wurden 1  $\mu$ l spezifischer Puffer sowie 1  $\mu$ l Enzym für die nächste Restriktion pipettiert und bei 37°C für mindestens 1 Stunde verdaut.

### 2.2.3.5 Gelelektrophoresen

Die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Molekülen eingesetzt. Aufgrund ihres negativ geladenen Phosphat-Rückgrates bei pH>7,0 wandern die DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe; dabei bewegen sich die kleinsten Fragmente am weitesten. Als Trägermaterial wurde Agarose in TAE-Puffer eingesetzt. Die Konzentration der Agarose war abhängig von den zu trennenden Fragmentgrößen und erstreckte sich über einen Bereich von 0,7% (w/v) (bei Fragmenten bis zu 12 kb) bis 1,2 % (w/v) (bei Fragmenten von 0,4 bis 6 kb). Vor dem Beladen der Geltaschen wurden je 10 µl der DNA-Probe mit je 1,6 µl Auftragspuffer (s.2.1.6) vermischt, damit die DNA-Lösung in die Taschen absinkt und sich nicht mit dem Laufpuffer vermischt. Als Größenreferenz für die DNA-Fragmente wurden in die äußeren Taschen 0,6 µl GeneRuler™1 kb DNA Ladder (s.2.1.6) aufgetragen. Bei einer Spannung von 100 Volt wurde die DNA circa 1 Stunde aufgetrennt, mindestens aber solange, bis das Bromphenolblau bis circa 2 cm vor Ende des unteren Gelrandes in Richtung der Anode gelaufen war. Der Farbstoff Bromphenolblau, der im Auftragspuffer enthalten ist, besitzt das Laufverhalten eines circa 300 bp umfassenden DNA-Fragmentes.

Die DNA wurde durch 20minütiges Schwenken in Ethidiumbromid, welches in doppelsträngiger DNA interkaliert, angefärbt und unter UV-Licht bei einer

Wellenlänge von 312 nm angeregt. Das emittierte Licht wurde mittels Kamera detektiert und im unter 2.1.9 angegeben Gel-Dokumentationssystem verwaltet.

### 2.2.3.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Aus Agarosegelen wurde die DNA, die für Klonierungsarbeiten weiter verwendet werden sollte, mit dem Jetsorb-Kit (s. 2.1.7) extrahiert. Grundlage der Methode ist das Protokoll von Vogelstein und Gillespie (Vogelstein 1979). Alle Zentrifugationen wurden bei 12000-g für 30 Sekunden durchgeführt.

Die Bande mit der zu isolierenden DNA wurde möglichst genau aus dem Gel herausgeschnitten, gewogen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Hierzu wurden zu je 100 mg Gel 300 µl Puffer A1 und 10 µl der Milchglassuspension gegeben. Dann erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten bei 50 °C. In dieser Zeit wurde das Reaktionsgefäß alle 3 Minuten kurz über Kopf geschwenkt. Dadurch wurde die Agarose geschmolzen und die DNA an die Milchglassuspension gebunden. Dieser Komplex wurde durch Zentrifugation sedimentiert, der Überstand Erneut wurden 300 µl Puffer A1 dazu gegeben und wieder verworfen. abzentrifugiert. Daran schlossen sich zwei Wasch-Schritte des Pellets mit Puffer A2 an, wobei auch hier 300 µl Puffer zu je 100 mg Gel eingesetzt wurden. Das Sediment wurde dann bei 37 °C getrocknet, mit 40 µl TE-Puffer und bei 50°C für mindestens 15 Minuten inkubiert, um die DNA von der Glasmilchmatrix zu lösen. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde der Überstand mit der DNA abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

### 2.2.3.7 Konstruktion des Vektors pBluescript™KSII+-AfIII

Um das *AfI*II-*BgI*II-Fragment der cDNA der humanen α1-Untereinheit aus dem Hefeplasmid YhNa1 in den pBluescript<sup>™</sup>KSII+ Vektor einklonieren zu können, wurde eine Restriktionsstelle für *AfI*II in die multiple cloning site eingebaut. Dazu wurden Oligonukleotide, die die Erkennungssequenz für *AfI*II tragen, mit dH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 20 pmol/mI eingestellt und in die Schnittstellen von *Apa*I und *BgI*II ligiert (siehe 2.2.3.11 Ligation).

### 2.2.3.8 Einführen von Mutationen

Zur Einführung der Mutationen und der anschließenden Amplifikation der mutierten Plasmide wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) -basierte Methode eingesetzt: Die PCR ist eine Technik, mit deren Hilfe man selektiv DNA-Sequenzen vervielfältigen kann.

Dazu wird ein DNA-Doppelstrang erhitzt, so dass sich die beiden komplemetären Stränge voneinander trennen (Denaturierungsschritt). Nach Absenken der Temperatur können sich an die nun vorliegenden Einzelstränge komplementäre Oligonukleotide anlagern (Annealing). Im nächsten Schritt werden in Gegenwart einer DNA-Polymerase und der vier Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP) die Oligonukleotide am 3'-Ende komplementär verlängert und somit die DNA vervielfältigt (Amplifikation).

Die Schätzung der Schmelztemperatur der Oligonukleotide wurde nach folgender Formel vorgenommen:

Die gewünschte Schmelztemperatur betrug mindestens 78°C. Der GC-Gehalt der Oligonukleotide sollte höher als 40% sein.

Die Reaktionen zur Einführung der Mutationen wurden in 0,5 ml Polypropylengefäßen angesetzt und umfassten ein Gesamtvolumen von 50 µl. Dabei wurden zu 5 µl eines 10fach-Reaktionspuffers 1,2,4 oder 10 µl des Templates pBlueKSP+- $\alpha$ 1h mit einer Konzentration von 5 ng/µl gegeben. Hinzu gefügt wurden jeweils 1,25 µl der Mutagenese-Oligonukleotide für Lese- und Komplementärstrang mit einer Konzentration von 100 ng/µl, 1 µl dNTP-Mix, dH<sub>2</sub>O bis zum Erreichen des Gesamtvolumens und 1 µl PfuTurbo DNA-Polymerase (2,5 U/µl).

Für die Mutagenese im Thermocycler MasterCycler gradient wurden dann in unten stehender Abfolge diese Reaktionsbedingungen gewählt: Zunächst erfolgte die Denaturierung der DNA bei 95°C für 30 Sekunden, anschließend das Annealing bei 55°C für die Dauer von 1 Minuten. Die Extension der Oligonukleotide erfolgte bei einer Temperatur von 68°C über einen Zeitraum von 9 Minuten. Insgesamt wurden 16 Zyklen gefahren.

Zur Überprüfung der Amplifikation wurden 10 µl des Reaktionsansatzes auf einem 1% igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Template-DNA im restlichen Volumen mit 1µl *Dpn*l für 1h bei 37°C verdaut. Das Restriktionsenzym *Dpn*l erkennt Methylierungen der Ausgangs-DNA und zerlegt sie so, dass nur noch die DNA mit der neu eingeführten Mutation übrig bleibt. Diese wird über die in 2.2.2.4 beschriebene Transformation in die superkompetenten Epicurian Coli XL1-Blue Zellen eingebracht. Dieser Zellstamm besitzt ein Reparatursystem, um die ringförmige DNA kovalent zu verknüpfen.

### 2.2.3.9 Überprüfung der Mutation mittels Sequenzierung

Die Sequenzierung der mutierten DNA erfolgte in den Labors von MWG-Biotech. Dazu wurden 2 µg Plasmid, in dH<sub>2</sub>O gelöst, eingeschickt. Die Sequenzdaten wurden als scf-Files per E-Mail zugesandt und mit dem Programm Bioedit ausgewertet. Als Primer wurden sowohl die Standardprimer T3 und T7 sowie die in Tabelle 2.6 aufgeführte Oligonukleotide verwendet.

### 2.2.3.10 Dephosphorylierung der vektoriellen DNA

Das 5'-terminale Nukleotid wurde dephosphoryliert, um eine Rückligation des Vektors mit sich selbst zu verhindern. Katalysiert wurde diese Reaktion von alkalischer Phosphatase. Dazu wurden 10  $\mu$ l der Vektor-DNA, 1  $\mu$ l Enzym, 2  $\mu$ l des 10fach-Puffers für das Enzym und 8  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 10 Minuten auf 65°C erhitzt, um die Phosphatase zu inaktivieren.

### 2.2.3.11 DNA-Ligation

Vor der eigentlichen Ligationsreaktion wurden mehrere Ansätze vorbereitet, bei denen dephosphorylierter Vektor und Insert-DNA in einem Verhältnis von 1:10 bis 1:100 gemischt wurden. Die Ansätze wurden für 5 Minuten bei 45°C inkubiert und anschließend für 3 Minuten auf Eis gestellt. Dies sollte gewährleisten, dass sich die DNA-Fragmente aneinander anlagerten.

Zu diesem Voransatz wurde 1 µl der T4-DNA-Ligase gegeben und 10fach Ligasepuffer. Die Menge des Ligasepuffers richtete sich dabei jeweils nach dem Volumen des Gesamtansatzes. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Ligase. Nach circa 16stündiger Inkubation bei 16°C oder 4-8°C wurde die Ligase durch 10 minütige Inkubation bei 65°C deaktiviert.

### 2.2.4 Arbeiten mit Saccharomyces cerevisiae

*S.cerevisiae* ist als eukaryotischer Organismus, im Gegensatz zu Bakterienzellen, in der Lage, die Natriumpumpe postranslational zu modifizieren und in die Plasmamembran zu integrieren. Sie besitzt keine endogene Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (Horowitz 1990), (Kingsman 1985) und ist deshalb ein gut geeignetes System für die heterologe Expression dieses Proteins.

## 2.2.4.1 Aufbewahrung, Anzucht und Kultivierung von Arbeiten mit Saccharomyces cerevisiae

Die Grundlagen der Arbeiten mit den Hefen wurden der Literatur Rose (1990) entnommen.

Zur langfristigen Lagerung (mehrere Jahre) wurden die Hefen als Glycerolstock angelegt. Dazu wurden die Zellen einer Mini-Kultur (s.u.) für 5 Minuten bei 1800·g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µl 15 % Glycerollösung (w/v) aufgenommen. Dieser Stock wurde bei -70°C gelagert.

Zur Anzucht der Hefen wurden Zellen aus dem Tiefkühlstock auf einer YPD-Agarplatte (untransformierte Zellen) bzw. YNB-Agarplatte mit 200 µl Uracil (Zellen, die das Plasmid YhNa1 tragen) respektive 100 µl Tryptophan (für GhNb1) oder YNB-Agarplatte ohne Selektionsmarker (falls beide Plasmide vorhanden waren) ausgestrichen und bei 37°C für 3 Tage inkubiert. Die Kolonien dieser Platte waren im Kühlschrank bei 4-8°C haltbar und konnten über mehrere Wochen verwendet werden.

Die Konzentration der Uracillösung betrug 0,2 g Uracil/100 ml H<sub>2</sub>O, die der Tryptophanlösung 1g Tryptophan/100 ml H<sub>2</sub>O.

Zur Herstellung von Mini-Kulturen (5 ml), die als Vorkulturen für größere Volumina oder zur Herstellung von Glycerolstocks dienten, wurden entsprechende Klone in selektivem YNB-Medium angeimpft und für ca. 16 Stunden bei 180 rpm und 30°C inkubiert. Das YNB-Medium enthielt 50 µl 100-fach Aminosäure-Supplement-Mix.

### 2.2.4.2 Transformation der Saccharomyces cerevisiae-Hefezellen

Zur funktionsfähigen Expression der Natriumpumpe in *Saccharomyces cerevisiae* werden sowohl die  $\alpha$ -Untereinheit als auch die  $\beta$ -Untereinheit benötigt (Scheiner-Bobis 1994).

Da für die Untersuchungen immer die nicht-mutierte  $\beta$ -Untereinheit verwendet wurde, wurde zunächst in untransformierte Hefezellen das die  $\beta$ -Untereinheit tragende GhNb1-Plasmid eingebracht und als  $\beta$ -Pluszellen für die Transformation verwendet. Darin erfolgte dann die Übertragung der YhNa1-Plasmide, deren cDNA für die Natriumpumpe mutiert worden war sowie das Wildtyp- YhNa1-Plasmid.

Die Plasmide wurden mittels der Lithiumacetat (LiOAc)-Methode in die Hefezellen eingebracht (Ito 1983). Dazu wurde eine Einzelkolonie der 30-4 Hefezellen in 5 ml YNB-Medium mit 200 µl Tryptophan-Lösung (1g Tryptophan/100 ml H<sub>2</sub>O) bei 30°C und 180 rpm für circa 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 3 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 2,5 ml einer Lösung von 0,1 M Lithiumacetat in TE-Puffer suspendiert, erneut zentrifugiert und unter den obigen Bedingungen gewaschen. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 100 µl der 0,1 M LiOAc TE-Lösung aufgenommen und für 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Dabei wurde der Ansatz alle 10 Minuten vorsichtig über Kopf geschwenkt. Im nächsten Schritt wurde circa 1 µg des gewünschten Plasmids dazu gegeben, mit der Pipette vorsichtig durchmischt und für weitere 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Danach wurden 700 µl einer Lösung aus 40 % PEG 3300 / 0,1 M LiOAc in TE-Puffer hinzu gegeben und für eine weitere Stunde bei 30°C inkubiert. Daran schloss sich der Hitzeschock an, modifiziert nach (Akada 2000): Für die Dauer von bis zu 2 Stunden wurde der Ansatz bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Der Ansatz wurde dann für 3 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die Zellen wurden in 200 µl TE-Puffer suspendiert, auf YNB-Agarplatten ausgestrichen und für 3 Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert.

Als Positiv-Kontrolle wurde ein Ansatz mit 1  $\mu$ g des nicht-mutierten YhNa1-Plasmid, als Negativ-Kontrolle ein Ansatz mit 10  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O parallel mitgeführt.

## 2.2.4.3 Messung des Palytoxin-induzierten K<sup>+</sup>-Effluxes in Abhängigkeit der Palytoxin-Konzentration

Eine 5 ml Vorkultur wurde in 200 ml SD-Gal mit 2 ml 100-fachem Aminosäure-Supplement-Mix überführt und für circa 24 Stunden mit 150 rpm bis zu einem OD<sub>600</sub>- Wert zwischen 2 und 3 inkubiert. Sodann wurden die Hefezellen mit 1800-g rpm für 5 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Zum Pellet wurden 15 ml HBC-Puffer gegeben und durch vortexen gewaschen. Nach wiederholter Zentrifugation unter den oben angegebenen Bedingungen wurde das Pellet nochmals gewaschen und in circa 15 ml HBC-Puffer aufgenommen. Von dieser Suspension wurde die optische Dichte bestimmt und mit 2-fach konzentriertem Puffer auf einen OD<sub>600</sub> 10 eingestellt, was etwa 1×10<sup>7</sup> Zellen/ml entspricht. Davon wurden jeweils 500 µl je Versuchsansatz pipettiert. Palytoxin wurde im nanomolaren Bereich in steigenden Konzentrationen vorgelegt. Als Gegenionen zum Kalium für den inwärts gerichteten Ionenfluss wurden Natrium-, Magnesium- oder Calcium-Chloridsalze in einer Konzentration von 200 mM dazugegeben und mit dH<sub>2</sub>O bis zu einem Gesamtvolumen von je 1000 µl je Ansatz aufgefüllt.

Als Kontrolle für den basalen K<sup>+</sup>-Verlust der Hefezellen über die Zeit wurde ein Ansatz ohne Palytoxin vorbereitet. Zur Ermittlung des maximal möglichen Kalium-Effluxes wurden Hefezellen in 0,01 % Lithiumdodecylsulfat (LiDS) für 2 Stunden bei 75°C inkubiert, um die Membran der Zellen vollständig aufzubrechen.

Die übrigen Versuchsreihen wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und die Zellen anschließend bei 13000 rpm für 2 Minuten abzentrifugiert. Jeweils 980 µl des Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und der Kaliumgehalt mit einem Flammenphotometer gemessen.

Der relative prozentuale Kalium-Efflux wurde dann nach folgender Formel berechnet:

K<sup>+</sup>-Efflux [%] = (Probenwert – Nullwert)/ (Maximaler Efflux - Nullwert) × 100

Probenwert= Kaliumgehalt im Überstand einer Probe mit Palytoxin Nullwert= Kaliumgehalt des Überstandes im Ansatz ohne Palytoxin Maximaler Efflux= Kaliumgehalt des Überstandes im Ansatz mit LiDS

Zur graphischen Auswertung wurden die relativen Effluxe gegen den Logarithmus der Palytoxinkonzentration aufgetragen und daraus die Palytoxinkonzentration ermittelt, bei der der halbmaximale Efflux erzielt wird (EC<sub>50</sub>).

## 2.2.4.4 Messung der Hemmung des Palytoxin-induzierten K<sup>+</sup>-Efflux durch herzaktive Steroide und deren Aglykone

Zur Bestimmung dieses Effektes bei Wildtyp und Mutanten wurden Hefezellen wie unter 2.2.4.3 beschrieben aufbereitet. Zu 500 µl dieser Zellen wurde NaCl und Palytoxin mit einer Endkonzentration von 200 mM beziehungsweise 75 nM pipettiert. Den verschiedenen Ansätzen wurde entweder Ouabain, Proscillaridin A, Digoxin, Digitoxigenin, Bufalin oder Ouabagenin in steigenden Konzentrationen bis zu 150  $\mu$ M hinzugefügt und mit dH<sub>2</sub>O auf 1000  $\mu$ I Gesamtvolumen ergänzt. Zur Ermittlung des maximal möglichen Kalium-Efflux wurden wie unter 2.2.4.3 Hefezellen mit 0,01% Lithiumdodecylsulfat (LiDS) inkubiert. Nach 2-stündiger Inkubation bei 28°C und nach dem Sammeln der Zellen bei 12000-g für 2 Minuten wurde der K<sup>+</sup>-Gehalt der Überstände mit dem Flammenphotometer bestimmt.

Die Auswertung erfolgte wie oben (2.2.4.3).

#### 2.2.4.5 Gewinnung von Mikrosomen

Die Präparation beruht auf der in der Literatur beschriebenen Methode (Horowitz 1990). Wenn nicht anders angegeben, fanden alle Schritte auf Eis statt, um die Degradation des Proteins so gering wie möglich zu halten.

Dazu wurden zunächst 30 ml Zellen in YNB-Medium angesetzt. Diese Vorkultur wurde in 4 I SD-Gal-Medium mit 40 ml 100 fachem Aminosäure-Supplement-Mix überführt. Die Zellen wurden solange unter ständigem Schütteln bei 30°C kultiviert, bis sie einen OD<sub>600</sub> von 2 bis 3 erreichten. Zur Gewinnung der Zellen wurde die Kultur bei 1800·g für 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen zweimal mit eiskaltem dH<sub>2</sub>0 gewaschen. Anschließend wurde ihr Feuchtgewicht erfasst und sie wurden unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70°C in der Regel bis zum nächsten Morgen gelagert.

Den Hefezellen wurde pro mg Feuchtgewicht 2 ml des Yeast breakage buffers (YBB-Puffer) hinzugefügt und sie wurden dann bei Raumtemperatur aufgetaut. Dabei schützten die im YBB-Puffer enthaltenen Proteaseinhibitoren den enzymatischen Abbau der Natriumpumpe. Die aufgetauten Zellen wurden dann zusammen mit 10 ml Silicaperlen in den eisgekühlten BeadBeater überführt und in 8 Zyklen aufgebrochen. Dabei umfasste ein Zyklus eine Periode von 15 Sekunden zum Aufbrechen und 105 Sekunden Ruhezeit. Nach dieser Prozedur wurden die Silicaperlen abgetrennt und die Zellreste bei 4°C für 20 Minuten bei 2500·g sedimentiert. Der Überstand, der die Mikrosomenfraktion enthielt, wurde für 10 Minuten bei 4°C und 2500·g zentrifugiert. Die sedimentierte Membranfraktion wurde für 1 Stunde bei 180000·g und 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert und anschließend mit einem Potter-Elvejhem-Homogenisator in circa 25 ml Imidazol-Puffer homogenisiert. Die letzten beiden Schritte wurden noch einmal wiederholt und die Membranfraktion nach der Zentrifugation in etwa 7 ml Imidazol-Puffer mit dem Potter-Elvejhem-Gerät homogenisiert. Die Suspension wurde in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### 2.2.4.6 Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem Ouabain

Ouabain reagiert spezifisch und mit hoher Affinität mit dem phosphorylierten Intermediat ( $E_2*P$ ) der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (Hansen 1996, Wallick 1998). Dieser Konformationszustand kann durch Anwesenheit von P<sub>i</sub> und Mg<sup>2+</sup> (backdoor-Phosphorylierung) oder durch Anwesenheit von ATP, Mg<sup>2+</sup> und Na<sup>+</sup> (frontdoor-Phosphorylierung) eingestellt werden (Skou 1988, Schneider und Scheiner-Bobis 1997). Die Menge dieses stabilen, als ( $E_2*-P*Ouabain$ ) bezeichneten Komplexes kann durch Tritium-Ouabain ([<sup>3</sup>H]-Ouabain) radioaktiv bestimmt werden (Tobin und Sen 1970).

## 2.2.4.7 Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Wildtyp und Mutanten für Ouabain

Die Dissoziationskonstante K<sub>D</sub> von Wildtyp und Mutanten der Natriumpumpe kann durch Verdrängung des radioaktiven Liganden [<sup>3</sup>H]-Ouabain mit nicht-radioaktiv markiertem Liganden, dem sogenannten kalten Ouabain, bestimmt werden.

Dazu wurden 250 µg mikrosomalen Proteins von Hefezellen, die entweder Wildtyp oder mutierte Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase exprimiert haben, zu verschiedenen Reaktionsansätzen gegeben. Die Ansätze enthielten 5 mM Tris/Phosphat pH 7,4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 nM [<sup>3</sup>H]-Ouabain und unmarkiertes Ouabain in Konzentrationen von 4 nM bis 498 nM. Das Gesamtvolumen jedes Ansatzes war 500 µl.

Alle Ansätze wurden für 30 Minuten bei 30°C inkubiert und anschließend für 2 Minuten bei 12000-g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Die Ansätze wurden unmittelbar danach auf Eis gestellt und der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Zu dem Pellet wurde dann sofort 1000 µl eiskaltes dH<sub>2</sub>O gegeben und erneut bei 12000-g für 1 Minuten zentrifugiert, um nicht gebundenes Ouabain zu entfernen. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt und das Pellet nach dem Absaugen der Waschlösung in 500 µl 1 N NaOH suspendiert. Nach 15minütiger Inkubation bei 75°C war das Protein solubilisiert. Der Ansatz wurde durch Zusatz von 500 µl 1 N HCl neutralisiert. Die Radioaktivität in 800 µl dieser Lösung wurde unter Zusatz von 4 ml Szintillationsflüssigkeit für 300 Sekunden im Wallac-Counter ausgezählt. Die unspezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]-Ouabain wurde in Gegenwart von 100 mM KCl bestimmt und von den anderen Messwerten subtrahiert. Aus der graphischen Darstellung nach Scatchard konnte der K<sub>D</sub>-Wert bestimmt werden (Scatchard 1949). Hierbei wird der Quotient aus den Konzentrationen von gebundenem und freiem Ouabain gegen die Konzentration an freiem Ouabain aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Die negative reziproke Steigung dieser Geraden entspricht dem K<sub>D</sub>-Wert und der Abszissenabschnitt markiert die maximale Bindung B<sub>max</sub> von Ouabain.

#### 2.2.4.8 Bestimmung der Verdrängung von Ouabain durch K<sup>+</sup>-Ionen

200 Mikrosomenpräparation Es wurden ul aus Hefezellen mit einer Anfangskonzentration von 1,25 mg/ml zu einer Lösung aus 5 mM Tris/Phosphat pH 7,4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Tris/HCl pH 7,4, 20 nM [<sup>3</sup>H]-Ouabain und steigenden K<sup>+</sup>-Konzentrationen von 0,25 mM bis 10 mM in einem Gesamtvolumen von 500 µl pipettiert. Zur Bestimmung der unspezifischen [<sup>3</sup>H]-Ouabain-Bindung wurde ein Ansatz mit 1 mM nicht-markiertem Ouabain mitgeführt. Die Reaktionsansätze wurden für 30 Minuten bei 30°C inkubiert und anschließend wie unter 2.2.4.7. angegeben behandelt.

Zur Ermittlung derjenigen K<sup>+</sup>-Konzentration, bei der die halbe maximale Abnahme des Ouabain-Komplexes zu beobachten war (EC<sub>50</sub>-Wert), wurde die [<sup>3</sup>H]-Ouabain Bindung in Abhängigkeit der K<sup>+</sup>-Konzentration graphisch aufgetragen und der EC<sub>50</sub>-Wert anhand einer Regressionsrechnung bestimmt.

## 2.2.4.9 Bestimmung der Abhängigkeit der Ouabainbindung in Anwesenheit von Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und ATP

Für diese Bestimmung wurden 250 µg Mikrosomenpräparation mit nativer oder mutierter Natriumpumpe in 5 µM ATP, 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 nM [<sup>3</sup>H]-Ouabain und unterschiedlichen Na<sup>+</sup>-Konzentrationen für 3 Minuten bei 30 °C inkubiert und anschließend für 5 Minuten auf Eis gestellt. Das Waschen, Auflösen des Pellets und Auszählen der Radioaktivität erfolgte wie unter 2.2.4.7 beschrieben. Zur Bestimmung der unspezifischen [<sup>3</sup>H]-Ouabainbindung wurde die Radioaktivität eines Ansatzes mit 5 mM KCl gemessen und das Ergebnis von allen Messwerten abgezogen.

Zur Ermittlung des EC<sub>50</sub>-Wertes für Natrium wurde die [<sup>3</sup>H]-Ouabain Bindung in Abhängigkeit der Na<sup>+</sup>-Konzentration graphisch aufgetragen und eine Regressionsrechnung durchgeführt.

# 2.2.4.10 Bestimmung der Abhängigkeit der Ouabainbindung in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und ATP

Zur Bestimmung der relativen Affinität von Wildtyp und Mutanten für Ca<sup>2+</sup> wurden dieselben Reaktionsbedingungen wie unter 2.2.4.9 angegeben gewählt. Dabei wurden steigende Konzentrationen von Ca<sup>2+</sup>-Ionen eingesetzt.

# 2.2.4.11 Anreicherung von Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase durch SDS-Behandlung von Mikrosomen

Zur partiellen Anreicherung der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase aus Hefezellmembranen wurde das von Jorgensen publizierte Verfahren modifiziert (Jorgensen 1974).

Einer Mikrosomenpräparation wurden innerhalb von 30 Minuten unter Rühren eine 0,4%ige (w/v) SDS-Lösung zugetropft. Danach stellten sich folgende Endkonzentrationen ein: 50 mM Imidazol/HCI, 2 mM EDTA, 3 mM Na<sub>2</sub>-ATP, 0,1 % SDS. Die Endkonzentration des Membranproteins erreichte dabei 3,6 mg/ml.

Zur partiellen Anreicherung der nun solubilisierten Natriumpumpe wurde sie über einen Dichtegradienten geschichtet. Der Gradient bestand aus 9 ml einer 20 %igen Saccharose-Lösung über 8 ml einer 50 %igen Saccharose-Lösung in einem Polycarbonatröhrchen. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und bei 180000-g über 2 Stunden in der Ultrazentrifuge setzte sich eine Proteinbande an der Grenzschicht des Stufen-Gradienten ab, die die Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase enthält. Diese konnte mit Hilfe einer Pasteur-Pipette isoliert werden. Hiernach wurde sie 3fach mit 25 mM Imidazol-Puffer verdünnt und erneut bei 4°C für 1 Stunde bei 180000-g zentrifugiert. Das Protein setzte sich dadurch am Boden des Zentrifugationsgefäßes ab und wurde in 25 mM Imidazol-Puffer aufgenommen. Nach Homogenisation im Potter-Elvejhem-Gefäß wurde die SDS-extrahierte Mikrosomenfraktion aliquotiert, sofort in flüssigen Stickstoff verbracht und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C tiefgefroren.

### 2.2.4.12 Bestimmung der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Aktivität

Die Gesamtaktivität der Natriumpumpe wurde als Ouabain-hemmbarer Anteil indirekt anhand des umgesetzten Phosphates nach folgender Reaktion bestimmt:

 $ATP + 3 \text{ Na}^+ (\text{in}) + 2\text{K}^+ (\text{out}) \longrightarrow ADP + Pi + 3 \text{ Na}^+ (\text{out}) + 2 \text{ K}^+ (\text{in})$ 

In Anwesenheit des hierbei freigesetzten anorganischen Phosphates Pi wird dann 2-Amino-6-Mercapto-7-Methyl-Purin Ribosid (MESG) enzymatisch in Ribose-1-Phosphat und 2-Amino-6-Mercapto-7-Methylpurin umgewandelt. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Purin-Nukleosid Phosphorylase (PNP). Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Substrates von 330 nm zu 360 nm beim Produkt (Webb 1992).

Bei Raumtemperatur wurde eine Lösung aus 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM NH<sub>4</sub>Cl, 50 mM NaCl, 10 µl PNP mit 50 U (Unit, entspricht Umsatz von 1 µmol Substrat pro Minute), 100 µl einer 1 mM Stocklösung MESG sowie dH<sub>2</sub>O für ein Gesamtvolumen von 1000 µl für 10 Minuten in einer 1 ml Küvette mit 1 cm Schichtdicke inkubiert. Anschließend wurde zwischen 150 µg und 400 µg frisch aufgetautes SDS-extrahiertes Membranprotein zugegeben und über einen Zeitraum von 10 Minuten alle 30 Sekunden die Absorption bei 360 nm gemessen. Unter Zusatz von 200 µM Ouabain wurde in einem zweiten Ansatz der Ouabain-hemmbare Anteil der ATPase-Aktivität unter den ansonsten gleichen Bedingungen wie oben gemessen.

Die Zunahme der Extinktion über die Zeit wurde graphisch aufgetragen und daraus die Änderung der Extinktion pro Zeiteinheit abgelesen. Die Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

Aktivität [U/ml] = ( $\Delta$ E/min \* V<sub>G</sub> \* 10<sup>3</sup>) /(  $\epsilon_{360}$  \* d\* V<sub>P</sub>)

Der Ouabain-hemmbare Anteil der ATPase-Aktivität wurde aus der Differenz von Gesamtaktivität und der Aktivität unter Zusatz von Ouabain berechnet.

### 2.2.4.13 Phosphatase-Aktivität

Die Natriumpumpe ist in der Lage, *p*-Nitrophenyl-Phosphat zu hydrolysieren. Diese Reaktion verläuft nur in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup>-Ionen. Das dabei entstehende *p*-Nitrophenyl-Anion wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt  $\varepsilon$ = 18.500 L/mol\*cm.

30 µg SDS-extrahiertes Protein wurde in 1 ml Lösung 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 mit 3 mM MgCl<sub>2</sub> aufgenommen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von *p*-Nitrophenyl-Phosphat in einer Endkonzentration von 3 mM gestartet. Zusätzlich wurde der Einfluss von ATP, Acetylphosphat und Vanadat untersucht mit Konzentrationen von 1mM ATP, 5 mM Acetylphosphat.

Auch 3-O-Methyl-Fluorescein-Phosphat wird von der Natriumpumpe umgesetzt. In einer Konzentration von 1µM wurde diese Substanz dem der *p*-Nitrophenyl-

Phosphat–Versuche identischen Reaktionsansatz beigemischt. 3-O-Methyl-Fluorescein-Phosphat wird dabei hydrolisiert und in das fluorogene Molekül 3-O-Methyl-Fluorescein überführt. Dieses kann in einem Spektralfluorimeter gemessen werden. Es wurden hier die Excitation von 478 nm und die Emission bei einer Wellenlänge von 516 nm detektiert. Die Bandbreite betrug für jeden Lichtstrahl 5 nm.

### 2.2.4.14 SDS-Gelelektrophorese

Proteine können auf SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt werden, wie unter Laemmli beschrieben (Laemmli1970).

Zunächst wurde ein 10 %iges Polyacrylamidgel in 0,376 M Tris/HCI, pH8, 8, 0,1% SDS, 0,75 ‰ APS und 0,75 % TEMED gegossen. Auf dieses Trenngel wurde dann ein 5 %iges Sammelgel in 0,120 M Tris/HCI, pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS und 0,75 ‰ TEMED polymerisiert. Dabei wurden mit Hilfe einer Schablone die Probentaschen gebildet. Das polymerisierte Gel wurde in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt und Laufpuffer aus 20 mM Tris, 100 mM Glycin und 0,1 % SDS mit einem pH-Wert von 8,3 eingefüllt. In die Probentaschen wurden als Positivkontrolle 50 ng Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase aus Schweinenieren in Denaturierungspuffer, als Negativ-Kontrolle 15 µg mikrosomales Protein von untransformierten Hefezellen und als Größenreferenz 5 µl peqGold Prestained Protein-Marker gegeben. Jeweils 50 µg der Probenproteine, 1:4 mit Roti<sup>®</sup>Load verdünnt, wurden in andere Probentaschen aufgetragen und bei 100 Volt elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach dem Lauf wurde das Gel kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen und dann für 30 Minuten in einer Coomassie-Blau-Lösung gefärbt. Anschließend wurde es in eine 10 %ige Essigsäurelösung überführt und für circa 1 Stunde entfärbt, bis die gefärbten Proteinbanden gut sichtbar waren. Zur Konservierung wurde das Gel 30 Minuten in einer 20 %igen Trichloracetatlösung geschwenkt und danach zwischen zwei Zellophan-Folien zum Trocknen über Nacht in einen Rahmen gespannt.

### 2.2.4.15 Nachweis der Proteine mittels Western-Blot

Die Untereinheiten der Natriumpumpe wurden immunologisch nachgewiesen.

Dazu wurden die auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine durch einen Elektroblot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Towbin, Staehelin und Gordon 1979; Gershoni und Palade 1982). Die so immobilisierten Proteine können dann über gekoppelte Antikörpersysteme detektiert werden (Turner 1983). Der Western Blot ermöglicht einen Vergleich der Expressionsniveaus von Wildtyp und Mutanten.

Vor dem Transfer der Proteine wurden die Nitrocellulosemembran, das Whatman-Filterpapier und das SDS-Polyacrylamidgel für 30 Minuten in Transferpuffer äguilibriert. In der Semi-Dry-Trans-Blot-Kammer wurde dann Whatman-Filterpapier in 3 Lagen geschichtet und darauf zunächst die Membran und dann das SDS-Gel gelegt. Es folgten 3 weitere Lagen Whatman-Filterpapier. Anschließend wurde für 60 Spannung von 10 Volt angelegt. Minuten eine Dann wurde die Nitrocellulosemembran einmal für 15 Minuten und zweimal für jeweils 5 Minuten in PBS-T-Puffer geschwenkt. Nach diesem Waschschritt wurden die noch freien Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran durch Inkubation in 5 %iger fettfreier Magermilchpulver-Lösung in PBS-T für 2 bis 16 Stunden bei Raumtemperatur abgesättigt. Hieran schloss sich ein wie oben beschriebener Waschschritt in PBS-T-Puffer an. Zur Bindung des Primär-Antikörpers gegen die humane  $\alpha$ - respektive die humane β-Untereinheit wurde die Nitrocellulosemembran für 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer verdünnten Antikörper-Lösung (1:2500 in PBS-T-Puffer) geschwenkt. In einem erneuten Waschschritt mit PBS-T-Puffer, einmal 15 Minuten und zweimal 5 Minuten, wurde der nicht-gebundene Primärantikörper entfernt. Als nächstes wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Sekundär-Antikörper (1: 2500 in PBS-T-Puffer verdünnt) inkubiert und anschließend, wie oben beschrieben, mit PBS-T-Puffer gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Zur Detektion der nun Antikörper-markierten Proteine wurden die im ECL-Kit enthaltenen Reagenzien verwendet. Es handelt sich hierbei um chemische Substrate, die unter Wirkung der Meerrettich-Peroxidase chemiluminiszent wirken und so die an die Antikörper spezifisch gebundenen Proteine durch eine Bande auf einem belichteten Film sichtbar machen. Dazu wurde ein x-omat-Film für 15 Sekunden bis 5 Minuten belichtet, in 10% iger Essiglösung abgestoppt und für 5 Minuten in Fixierlösung geschwenkt. Der Film wurde dann für mehrere Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

### 2.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry 1951). Dieses Verfahren beruht auf der Ausbildung eines blauen Farbkomplexes des Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz mit einem Protein, der bei einer Wellenlänge von 578 nm photometrisch bestimmt werden kann. Die Extinktion ist dabei proportional der Proteinkonzentration. Als Referenzprotein diente BSA mit der Konzentration von 7 mg BSA/ml dH<sub>2</sub>O.

Für die Messung wurden 10  $\mu$ l bis 40  $\mu$ l der zu bestimmenden Proteinlösung mit 500  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O, 3500  $\mu$ l 10 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 500  $\mu$ l 0,1 % CuSO<sub>4</sub> vermischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 500  $\mu$ l eines 3-fach mit Wasser verdünnten Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz zugesetzt und nochmals für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze kurz gemischt und ihre Extinktion gegen einen Leerwert bei 578 nm gemessen. Mit dem parallel angesetzten Referenzprotein BSA bekannter Konzentration wurde in gleicher Weise verfahren und anschließend eine Standardkurve erstellt, aus der die Proteinkonzentration der Probe abgelesen werden konnte.

### 3 Ergebnisse

# 3.1 Untersuchungen an Isoformen der $\alpha$ - Untereinheiten der humanen Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

An den 3 humanen Isoformen  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  wurden funktionelle Messungen mit Palytoxin, Herzglykosiden und deren Aglykonen durchgeführt.

Palytoxin (Ptx) interagiert spezifisch mit der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (Bottinger 1984) und bewirkt einen Natrium-Einstrom in die Zelle sowie einen Kaliumausstrom aus der Zelle. Untransformierte Hefezellen zeigen keinen K<sup>+</sup>-Efflux in Gegenwart von Palytoxin. Erst bei gleichzeitiger Expression von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase zeigt sich ein Kaliumverlust (Scheiner-Bobis and Farley 1994).

Herzaktive Steroide hemmen die Natriumpumpe (siehe Einleitung).

# 3.1.1 Palytoxin-induzierter K<sup>+</sup>-Efflux aus Hefezellen in Abhängigkeit von der Palytoxinkonzentration

Die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase kommt in den tierischen Organismen in bisher 4 identifizierten verschiedenen Isoformen vor. Sie wurden bislang noch nicht auf ihre Palytoxin-Sensitivität untersucht. Dabei ist diese Interaktion interessant im Hinblick auf die Aufklärung der Strukturen, die an der Interaktion des Palytoxin mit der Natriumpumpe beteiligt sind.



Abbildung 12: Palytoxin-induzierter Kaliumefflux in der α1
(■), α2(▲) und α3(○) Untereinheit der Natriumpumpe. Es sind die K<sup>+</sup>-Effluxe bei steigender Palytoxinkonzentration an 3 humanen Isoformen der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- ATPase dargestellt. Gemessen wurde der Kaliumgehalt von

 $1*10^7$  Hefezellen nach 2stündiger Inkubation. Die Hefezellen exprimierten Enzyme aus den beiden Untereinheiten in folgenden Kombinationen:  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ . Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

Sowohl die EC<sub>50</sub>-Werte als auch der maximal erzielte K<sup>+</sup>-Efflux sind bei den Isoformen verschieden. Bei  $\alpha 1\beta 1$  wird der halbe maximale K<sup>+</sup>-Efflux bei einer Palytoxinkonzentration von 9,5 ± 0,12 nM erreicht. Hefezellen, die  $\alpha 2\beta 1$  heterolog exprimierten, zeigten einen halbmaximalen Kaliumausstrom bei 41,96 ± 0,11 nM Ptx. Für die Kombination aus  $\alpha 3\beta 1$  wurde ein EC<sub>50</sub>-Wert von 23,51 ± 0,12 nM ermittelt.

#### 3.1.2 Hemmung des Palytoxin- induzierten K<sup>+</sup>-Effluxes durch Ouabain

Zur Untersuchung spezifischer Affinitäten verschiedener Herzglykoside und Aglykone wurden 3 humane Isoformen heterolog in Hefezellen exprimiert. Da nur in Anwesenheit beider Untereinheiten funktionsfähige Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase-Moleküle gebildet werden, wurden Plasmide in folgenden Kombinationen in die Hefezellen eingeführt:  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$  oder  $\alpha 3\beta 1$ . Nach Expression der Proteine wurden die Hefezellen 2 Stunden gleichzeitig mit Palytoxin und steigenden Konzentrationen Ouabain inkubiert. Anschließend wurde die Hemmung des Ptx-induzierten Kaliumeffluxes ermittelt. Der EC<sub>50</sub>-Wert (Konzentration, bei der die halbmaximale Hemmung erzielt wird) und die prozentuale Hemmung relativ zum K<sup>+</sup>-Efflux in Abwesenheit von Ouabain dienten dann als relatives Maß für die Affinität zu dem jeweiligen Herzglykosid oder Aglykon.



**Abbildung 13: Inhibition des Ptx-induzierten K<sup>+</sup>-Efflux durch Ouabain.** An Hefezellen, die die humanen Isoformen  $\alpha 1$  (**•**)  $\alpha 2$  (**•**) oder  $\alpha 3$  (•) exprimieren, wurde der K<sup>+</sup>-Efflux gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

Bei einer Palytoxinkonzentration von 75 nM wurde für die  $\alpha$ 1-Isoform ein EC<sub>50</sub>-Wert von 13,6  $\mu$ M gemessen. Die entsprechenden Konzentrationen für die  $\alpha$ 2- und  $\alpha$ 3-Isoform betragen 14,4  $\mu$ M und 5,0  $\mu$ M. Der bei 75 nM Ptx erzielte Kaliumefflux kann durch 150  $\mu$ M Ouabain zu 90,3 % ( $\alpha$ 1), 95% ( $\alpha$ 2) und 96,3% ( $\alpha$ 3) gehemmt werden.

### 3.1.3 Hemmung des Palytoxin- induzierten K<sup>+</sup>-Efflux durch Ouabagenin

Ouabagenin ist das Aglykon des Ouabain, besitzt also keine Rhamnose. Hefezellen, humane  $\alpha$ 1-lsoform der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase exprimieren, die die zeigen eine K<sup>+</sup>-Effluxes halbmaximale Hemmung des Ptx-induzierten bei einer Ouabainkonzentration von 82,0  $\mu$ M. Hefezellen, die die  $\alpha$ 2-Isoform der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase exprimieren, zeigen diesen Effekt bei einer Konzentration von 363,0 µM, und solche Hefezellen, die die a3-Isoform der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase exprimieren, benötigen eine Ouabainkonzentration von 493,0 µM. Die prozentuale Hemmung des K<sup>+</sup>-Effluxes durch 150  $\mu$ M Ouabain liegt bei  $\alpha$ 1 bei 37,0%, bei  $\alpha$ 2 bei 19,5% und bei  $\alpha$ 3 bei 33,0 %.



Abbildung 14: Inhibition des Ptx-induzierten K<sup>+</sup>-Efflux durch Ouabagenin. Gemessen wurde der Kalium-Efflux bei den humanen Isoformen  $\alpha 1$  ( $\blacksquare$ ),  $\alpha 2$  ( $\blacktriangle$ ) und  $\alpha 3$  ( $\circ$ ).Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

### 3.1.4 Hemmung des Palytoxin- induzierten K<sup>+</sup>-Effluxes durch Proscillaridin

Proscillaridin A ist ein herzaktives Steroid, dessen C17-Atom kovalent mit einem 6er Lactonring verknüpft ist. Die halbmaximale Hemmung des bei einer Palytoxinkonzentration von 75 nM hervorgerufenen Kalium-Effluxes erfolgt bei 4,4  $\mu$ M, 1,3  $\mu$ M respektive 3,6  $\mu$ M Proscillaridin A bei Hefezellen, die heterolog  $\alpha$ 1 $\beta$ 1,  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 bzw.  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 exprimieren. Dabei wird bei einer Proscillaridinkonzentration von 10 $\mu$ M eine Hemmung von 84,8 %, 81,0 % und 76,0 % erreicht.



**Abbildung 15: Inhibition des Ptx-induzierten K<sup>+</sup>-Efflux durch Proscillaridin A.** Abgetragen sind die Ergebnisse für die humanen Isoformen  $\alpha 1$  (**•**)  $\alpha 2$  (**•**) und  $\alpha 3$  (•).Dargestellt ist der Mittelwert **±** Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

### 3.1.5 Hemmung des Palytoxin- induzierten K<sup>+</sup>-Effluxes durch Bufalin

Bufalin ist das Aglykon des Proscillaridin A und trägt somit ebenfalls einen 6er Lactonring. Der EC<sub>50</sub>-Wert für die humane  $\alpha$ 1-Isoform liegt bei einer Konzentration von 0,5 µM. Auch für die humane  $\alpha$ 2- und  $\alpha$ 3-Untereinheit wird eine hochaffine Bindung zu Bufalin beobachtet. Die EC<sub>50</sub>-Werte sind 2,0 µM und 0,9 µM. Die Inhibition des Kalium-Effluxes beträgt 84,0 %, 70,0 % und 80,0 % für  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 3.



Abbildung 16: Inhibition des Ptx-induzierten K<sup>+</sup>-Effluxes durch Bufalin. Die humanen Isoformen  $\alpha 1$  ( $\blacksquare$ ),  $\alpha 2$  ( $\blacktriangle$ ) und  $\alpha 3$  ( $\circ$ )wurden mit 75 nM Ptx und steigenden Konzentrationen Bufalin für 2h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend der Kalium-Efflux ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

### 3.1.6 Hemmung des Palytoxin- induzierten K<sup>+</sup>-Effluxes durch Digoxin

Digoxin besitzt wie das Ouabain einen 5er Lactonring, jedoch ist die Zuckerkomponente verschieden. Statt der L-Rhamnose besitzt Digoxin 3 Moleküle Digitoxose, die am C3 glykosidisch verknüpft sind. Auch die OH-Gruppen sind verschieden. In Anwesenheit von 75 nM Palytoxin wird an Hefezellen, die die humane Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase exprimieren, ein K<sup>+</sup>-Efflux beobachtet. Dieser K<sup>+</sup>-Efflux ist durch Digoxin hemmbar. Die EC<sub>50</sub>-Werte für die humane  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2- bzw.  $\alpha$ 3-Untereinheit betragen 124,2  $\mu$ M, 8,4  $\mu$ M bzw. 113,1  $\mu$ M. Dabei ist dieser K<sup>+</sup>-Efflux bei einer Konzentration von 150  $\mu$ M Digoxin zu 60,0 %, 70,0 % bzw 80,0 % hemmbar für  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 3.



Abbildung 17: Inhibition des Ptx-induzierten K<sup>+</sup>-Efflux durch Digoxin. Untersucht wurden die humanen Isoformen  $\alpha 1$  (**•**),  $\alpha 2$  (**•**) und  $\alpha 3$  (•).

### 3.1.7 Hemmung des Palytoxin- induzierten K<sup>+</sup>-Effluxes durch Digitoxigenin

Digitoxigenin ist das Aglykon des Digitoxin. Es gleicht dem Bufalin mit Ausnahme des 5er Lactonrings. Die Konzentrationen, bei denen der durch Palytoxin ausgelöste Kalium-Efflux halbmaximal gehemmt wird, liegen bei 15,1  $\mu$ M, 34,5  $\mu$ M respektive 94,5  $\mu$ M für Hefezellen, die heterolog  $\alpha$ 1 $\beta$ 1,  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 oder  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 exprimieren.



Abbildung 18: Inhibition des Ptx-induzierten K<sup>+</sup>-Efflux durch Digitoxigenin bei den humanen Isoformen  $\alpha 1$  ( $\blacksquare$ )  $\alpha 2$  ( $\blacktriangle$ ) und  $\alpha 3$  ( $\circ$ ). Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

Dabei erreicht die Hemmung Werte von 81,6 %, 29,3 % bzw. 54,8 % für die Isoformen  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 bzw.  $\alpha$ 3. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

	α1β1		α2β1		α3β1	
	EC <sub>50</sub>	max Efflux	EC <sub>50</sub>	max Efflux	EC <sub>50</sub>	max Efflux
	[nM]	(%)	[nM]	(%)	[nM]	(%)
Palytoxin	9,5±0,12	89,9	41,96	59,1	23,51 ±	73,4
			±0,11		0,12	

**Tabelle 7:** EC<sub>50</sub>-Werte und maximaler Ptx-induzierter K<sup>+</sup>-Efflux. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

	α1β1		α2β1		α3β1		
Cardiac glycoside	EC50 Inh	EC50 Inhibition		EC50 Inhibition		EC50 Inhibition	
	[µM] (%	)	[µM] (%	5)	[µM] (%	5)	
Ouabain	13,6	90,3	14,4	95,0	5,0	96,3	
Ouabagenin	82,0	37,0	363,0	19,5	493,0	33	
Proscillaridin A	4,4	84,5	1,3	81	3,6	76	
Bufalin	0,5	84	2,0	70	0,9	82	
Digoxin	124,2	60	8,4	70	113,1	80	
Digitoxigenin	15,1	81,6	34,5	29,3	94,5	54,8	

Tabelle 8: EC<sub>50</sub>-Werte und maximale Hemmung des Ptx-induzierten K<sup>+</sup>-Efflux durch ausgewählte herzaktive Steroide und Aglykone. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

### 3.2 Homologievergleiche innerhalb der Familie der P-Typ-ATPasen

Ein Homologievergleich der Gesamtaminosäuresequenz (siehe 2.2.1) der  $\alpha$ -Untereinheiten verschiedener Transporter aus der Familie der P-Typ-ATPasen wurde durchgeführt. Der Vergleich der humanen Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase und der gastrischen H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase zeigt eine Homologie von 82%. Zwischen den humanen  $\alpha$ -Untereinheiten Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATpase und der  $\alpha$ -Untereinheiten der sarcoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) des Kaninchens liegt die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz bei 43%. Der Vergleich der gastrischen Protonenpumpe und der sarcoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-ATPase hingegen weist keine signifikante Homologie auf.

Relevanter als der Vergleich der Aminosäuresequenz für die gesamten  $\alpha$ -Untereinheiten ist für diese Arbeit der Blick auf den Bereich der Transporter, die vermutlich eine funktionelle Rolle in der Ionenerkennung und dem Ionentransport spielen.

Anhand der Beugungsmuster der Röntgenstrahlen an Kristallen der SERCA (Toyoshima, Nakasako et al. 2000) (siehe auch Einleitung S. 14 und Abb. 7) wurden 4 Schlüsselpositionen für die Koordination der beiden Calciumionen in der SERCA identifiziert. Es handelt sich um die Aminosäuren Asn768, Glu771, Asn796 und Asp800. Sie befinden sich auf den Transmembrandomänen M5 und M6.

Koordinat M5	ionsstelle I <u>M8</u>	<u>M6</u>	Koordinatic M4	onsstelle II M6	Sarcoplasmatisches Reticulum
Asn768 Asn776 Glu771 Glu779	Glu908	Asp807 Asp800 Thr799	Glu309 Ile307 Ala305 Val304	Asp800 Asp807 Asn796 Asp804	
					Cytoplasma

Abbildung 19: Schematische Darstellung der Koordinationsstellen I und II in der Calciumpumpe und ihre korrespondierenden Aminosäuren in der Natriumpumpe. Die Abbildung basiert auf der Publikation von Toyoshima (2000). Die Koordinationsstelle I wird gebildet aus Aminosäuren der Transmembrandomänen M5, M6 und M8. An der Ausbildung der Koordinationsstelle II sind die Transmembrandomänen M4 und M6 beteiligt. Die Positionsangaben beziehen sich auf die von den Autoren zur Durchführung der Messungen herangezogenen SERCA des Kaninchens. Die korrespondierenden Aminosäuren der Natriumpumpe sind blau hervor gehoben und beziehen sich in ihrer Nummerierung auf die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase des Schweines (aus der Leber).

Auf der Basis dieser Publikation wurde ein Sequenzvergleich des korrespondierenden Polypeptides einiger verschiedener Spezies durchgeführt und vergleichend gegenübergestellt (siehe Tabellen 9 und 10).

Zu den in der SERCA Ca-Ionen koordinierenden Aminosäuren Asn768, Glu771, Asn796 und Asp800 sind Asn776, Glu779, Asp804 und Asp807 korrespondierend in der Natriumpumpe. Abbildung 19 verdeutlicht dies und zeigt schematisch die Lage und Anordnung dieser Aminosäuren in der SERCA. In der vorliegenden Arbeit wurden nun Asn776, Glu779, Asp804 und Asp807 mutiert und auf ihre Interaktionen mit verschiedenen Ionen, Ouabain und Palytoxin untersucht.

Der Glutamatrest an Position 779 wurde durch den Austausch gegen Aspartat formell um eine Methylgruppe verkürzt und das hochkonservierte Asparagin 776 wurde in ein Isoleucin mutiert. Da die zum Asp804 korrespondierende Position in der Calcium-ATPase einen Asparaginrest trägt, wurde hier der Austausch Asparat gegen Asparagin vorgenommen. Das hochkonservierte Aspartat 807 wurde hinsichtlich der Ladung durch Einbau eines Glutamatrestes respektive Alaninrestes verändert. Das mutierte Protein wurde dann heterolog in der Hefe Saccharomyces cerevisiae exprimiert.

Quelle	Aminosäuresequenz
SERCA	<sup>762</sup> RYLISS <b>N</b> VG <b>E</b> VVCIFLTAALGLPEALIPVQLLWV <b>N</b> LVT <b>D</b> GLPA <sup>804</sup>
Kaninchen	N768 E771 N796 D800
SERCA	<sup>762</sup> RYLISS <b>N</b> VG <b>E</b> VVCIFLTAALGLPEALIPVQLLWV <b>N</b> LVT <b>D</b> GLPA <sup>804</sup>
Mensch	
PM Ca <sup>2+</sup> -ATPase	
Kaninchen	QFQHIVNVAVIVAFIGACIIQDSPHAVQMHWVNHIMDIHAS
H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase	
$\alpha$ 1 gastrisch	ATTEINNIPEEIPTETTTVSVPEPEGCITTEFTEECTDIFPS
Kaninchen	
H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase	
$\alpha 1$ gastrisch	ATTEINNIPEEIPTETTTVSVPEPEGCITTEFTEECTDIFPS
Mensch	
H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase	
$\alpha 1$ gastrisch	AITLINNIPELIPILIIIVSVPLPLGCIIILFIELCIDIFPS
Schwein	
$H^+, K^+$ -ATPase	
α1 nichtgastrisch	AILLIKNIAELCPFLIIILLGLPLPIGIIILLFIDLGIDIIPS
Kaninchen	
H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase	
$\alpha$ 1 nichtgastrisch	AISLIKNIAELCPFLIIIIVGLPLPIGIIIILFIDLGIDIIPS
Mensch	
Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase	777 AVEL HOMED REFERENCE THE FAMILY OF COMPANY AND A 819
$\alpha 1$ / Mensch	AYILISNIPETIPFLIFTIANIPLPLGIVIILCIDLGIDMVPA

**Tabelle 9: Sequenzvergleich im Bereich von M5 und M6 verschiedener P-Typ-ATPasen.** Die 4 Schlüsselpositionen für die Koordination der beiden Calciumionen, die anhand der Beugungsmuster der Röntgenstrahlen an Kristallen der SERCA (Toyoshima, Nakasako et al. 2000) identifiziert wurden, sind fett gedruckt. Die Nummerierung auf Basis der SERCA des Kaninchens ist grün hervorgehoben und dient als Referenz für die vorliegende Arbeit.

In diesem 42 Aminosäuren umfassenden Teilbereich zeigt sich zwischen der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase und der gastrischen H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase eine Homologie von 82%, jedoch keine signifikante Homologie der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATpase-Sequenz zu der Sequenz der sarcoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-ATPase. Und auch im Vergleich zwischen gastrischer H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase und der sarcoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-ATPase findet sich keine signifikante Homologie. In Tabelle 10 sind die entsprechenden Aminosäuren bei verschiedenen Spezies und bei den verschiedenen Ionenpumpen dargestellt. Der Asparaginrest an Calciumpumpe Position 768 innerhalb Natrium-, ist der Protonenund hochkonserviert wie auch das Aspartat an Position 800. Auch das negativ geladene

hochkonserviert mit Ausnahme der Ca<sup>2+</sup>-ATPase der 771 Glutamat ist Plasmamembran. Sie besitzt stattdessen einen neutralen Alaninrest. Unterschiede finden sich im Vergleich für die Aminosäure Asparagin796. Sowohl in den Ca<sup>2+</sup>-Retikulums wie ATPasen des sarco-/endoplasmatischen auch der der Plasmamembran liegt ein Asparaginrest vor. Diese Aminosäure findet sich jedoch nicht in Protonen- und Natriumpumpen.

Quelle	Aminosäuresequenz
SERCA	<sup>762</sup> RYLISS <b>N</b> VG <b>E</b> VVCIFLTAALGLPEALIPVQLLWV <b>N</b> LVT <b>D</b> GLPA <sup>804</sup>
Kaninchen	N768 E771 N796 D800
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase	<sup>769</sup> ALYTLTSNIPEITPFLIFIIANIPLPLGTVTILCIDLGTDMVPA <sup>811</sup>
$\alpha 1$ / Schwein	N776 E779 D804 D807
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase	<sup>777</sup> AYTLTS <b>N</b> IP <b>E</b> ITPFLIFIIANIPLPLGTVTILCI <b>D</b> LGT <b>D</b> MVPA <sup>819</sup>
$\alpha 1$ / Mensch	
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase	<sup>775</sup> AYTLTS <b>N</b> IP <b>E</b> ITPFLIFIIANIPLPLGTVTILCI <b>D</b> LGT <b>D</b> MVPA <sup>817</sup>
$\alpha 1$ / Schaf	
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase	<sup>775</sup> AYTLTS <b>N</b> IP <b>E</b> ITPFLIFIIANIPLPLGTVTILCI <b>D</b> LGT <b>D</b> MVPA <sup>817</sup>
$\alpha 1$ / Pferd	
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase	<sup>777</sup> AYTLTS <b>N</b> IP <b>E</b> ITPFLIFIIANIPLPLGTVTILCI <b>D</b> LGT <b>D</b> MVPA <sup>819</sup>
$\alpha 1$ / Ratte	
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase	<sup>775</sup> AYTLTS <b>N</b> IP <b>E</b> ITPFLIFIIANIPLPLGTCTILCI <b>D</b> LGT <b>D</b> MVPA <sup>817</sup>
$\alpha 1$ / Huhn	
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase	<sup>774</sup> AYTLTS <b>N</b> IP <b>E</b> ITPFLLFIIANIPLPLGTVTILCI <b>D</b> LGT <b>D</b> MVPA <sup>816</sup>
$\alpha 2$ / Mensch	
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase	<sup>767</sup> AYTLTS <b>N</b> IP <b>E</b> ITPFLLFIMANIPLPLGTITILCI <b>D</b> LGT <b>D</b> MVPA <sup>809</sup>
$\alpha$ 3 / Mensch	

Tabelle 10: Sequenzvergleich im Bereich von M5 und M6 verschiedener  $\alpha$ -Untereinheiten der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. Die 4 Schlüsselpositionen für die Koordination der beiden Calciumionen, die anhand der Beugungsmuster der Röntgenstrahlen an Kristallen der SERCA (Toyoshima, Nakasako et al. 2000) identifiziert wurden, sind fett gedruckt. Die Nummerierung auf Basis der SERCA des Kaninchens ist grün hervorgehoben und dient als Referenz für die vorliegende Arbeit. Die korresponiderenden Aminosäuren der Natriumpumpe beziehen sich auf die Natriumpumpe des Schweines, die aus der Leber gewonnen wurde. Die Nummerierung wurde als Vereinheitlichung in Anlehnung an die in der Literatur allgemeinhin verwendeten Bezeichung adaptiert.

Die gastrischen Protonenpumpen verschiedener Spezies tragen an der korrespondierenden Aminosäure einen negativ geladenen Glutamatrest. Bei den nichtgastrischen Protonenpumpen sowie den Natriumpumpen tritt durchweg ein Aspartatrest auf.

# 3.3 Einführung von Punktmutationen in die $\alpha_1$ -Untereinheit der humanen Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase

### 3.3.1 Konstruktion des Vektors pBluescript™KSII+ AflII

In den pBluescript<sup>™</sup>KSII+ Vektor der Firma Stratagene wurde in unserem Labor eine Schnittstelle für *Bgl*II eingebaut. Dieses Plasmid wurde dann herangezogen, um eine Schnittstelle für das Restriktionsenzyme *Afl*II hinzuzufügen.

Zunächst wurde der Vektor mit *Apa*l und *Bgl*II geschnitten. Dann wurde ein Oligolinker mit der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Afl*II in die klebrigen Enden der Restriktionsschnittstellen von *Bgl*II und *Apa*l ligiert.



Abbildung 20: Einführung einer Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Afl*II. Die Oligonukleotide a und b lagern an ihren komplementären Bereich an und bilden den Oligolinker, mit dessen Hilfe eine neue Schnittstelle für *Afl*II eingefügt wird. Die Überhänge passen als "klebrige (sticky) Enden in das geschnittene Plasmid. Die grün gekennzeichneten Basen bilden die Erkennungs- und Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Afl*II.

### 3.3.2 Klonierung des *Afl*II-*Bgl*II-Fragmentes aus der humanen α1-Untereinheit der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in den Vektor pBluescript<sup>™</sup>KSII+*Afl*II

Durch die Restriktionsanalyse wurde die Ligation der humanen  $\alpha$ 1-Untereinheit (Insert) in den Vektor pBluescript <sup>TM</sup> KSII+-*AfI*II überprüft. Anhand der Restriktion mit *BgI*II wird das Plasmid mit einer Größe von 4459 bp einmal geschnitten und damit linearisiert. Für *Mun*I besitzt der Vektor pBluescript<sup>TM</sup> KSII+-*AfI*II keine Erkennungssequenz, jedoch die einligierte humane  $\alpha$ 1-Untereinheit. Das hat zur Folge, dass bei einer Restriktion mit *Mun*I nur solche Klone linearisert wurden, die auch das Insert tragen und so indirekt die  $\alpha$ 1-Untereinheit nachgewiesen wurde.

(siehe Abb. 21, linkes Gel). Weitere Restriktionen dienten der Bestätigung des Plasmids. Das neu konstruierte Plasmid besitzt zweimal die Erkennungssequenz für *BamH*I und eine Restriktion lieferte die anhand der Restriktionskarte berechneten Fragmente mit den Größen 3118 bp und 1341 bp. *Pvu*II schneidet einmal innerhalb des neu insertierten Fragmentes aus der Natriumpumpe und zweimal innerhalb des Vektors. Die Banden hatten nach der Restriktion mit diesem Enzym eine Größe von 2513 bp, 1012 bp und 934 bp. Der kombinierte *AfII-BgI*II-Verdau führte zur Freisetzung des einligierten Inserts, so dass zwei Fragmente mit einer jeweiligen Länge von 2931 bp und 1528 bp gefunden wurden. (siehe Abb 21, rechtes Gel)



#### Abbildung 21: Restriktionsanalyse des Vektors pBluescript KSII+-a1h

Linkes Gel:

- Spur 1 1 kb ladder (Größenmarker)
- Spur 2 pBluescript<sup>TM</sup> KSII+- $\alpha$ 1h mit *Bgl*II verdaut(4459bp)
- Spur 3 pBluescript<sup>TM</sup> KSII+- $\alpha$ 1h mit *Mun* I verdaut (4459bp)
- Rechtes Gel:Spur 11 kb ladder (Größenmarker)Spur 2pBluescript<sup>TM</sup> KSII+- $\alpha$ 1h mit *BamHI* verdaut(3118 bp + 1341bp)Spur 3pBluescript<sup>TM</sup> KSII+- $\alpha$ 1h mit *Pvu*II verdaut(2513bp + 1012 bp + 934 bp)Spur 4pBluescript<sup>TM</sup> KSII+- $\alpha$ 1h mit *Afl*II + *Bgl*II (2931 bp + 1528 bp)
  - Spur 5 1 kb ladder (Größenmarker)

# 3.3.3 Einführung der Mutationen in die c-DNA der $\alpha$ 1-Untereinheit der humanen Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase

Die Mutationen in die c-DNA der humanen  $\alpha$ 1-Untereinheit der Natriumpumpe wurden auf PCR-Basis eingeführt. Zur Überprüfung der Amplifikation wurden jeweils
10 µl jedes Reaktionsansatzes elektrophoretisch auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Exemplarisch ist hier die Kontrolle für die Glu779Asp-Mutante abgebildet (Abb.22).



### Abbildung 22: Amplifikationskontrolle der Mutagenese für die Mutante E779D

- Spur 1  $0,5 \ \mu g$  Stratagene Gene Ruler<sup>TM</sup> (Größenmarker)
- Spur 2 Amplifikation mit 5 ng des Templates pBluescript<sup>TM</sup> KSII+- $\alpha$ 1hE779D
- Spur 3 Amplifikation mit 10 ng des Templates pBluescript<sup>TM</sup> KSII+-α1hE779D
- Spur 4 Amplifikation mit 20 ng des Templates pBluescript<sup>TM</sup> KSII+-α1hE779D
- Spur 5 Amplifikation mit 50 ng des Templates pBluescript<sup>TM</sup> KSII+-a1hE779D

## 3.3.4 Restriktionsanalysen der pBluescript KSII+-α1hE779D und pBluescript KSII+-α1hE779Q-Mutanten

Durch die Restriktion mit *Mun*I wird das 4459 bp umfassende Plasmid pBluescript <sup>™</sup> KSII+-*AfI*II-α1h einmal geschnitten und dadurch linearisiert. Die einligierte humane Untereinheit mit einer Länge von 1528 bp kann durch den Zweifachverdau mit *AfI*II und *BgI*II herausgeschnitten werden. Bei einem solchen Verdau entstanden die erwarteten Banden von 1528 bp und 2931 bp. Die erfolgreiche Mutation des Glutamats in Alanin respektive Glutamin wurde anhand der stillen Mutation nachgewiesen. Gegenüber dem unmutierten Plasmid fiel eine der zwei Schnittstellen für *Ava*I weg, so dass nach entsprechender Restriktion eine Bande von 4459 bp nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 23).



#### Abbildung 23: Restriktionskontrolle der pBluescript KSII+α1hE779-Mutanten.

Spur 1	Stratagene Gene Ruler <sup>TM</sup>
Spur 2-4	E779D geschnitten mit
MunI	
Spur 5-7	E779Q geschnitten mit
MunI	
Spur 8-10	E779D geschnitten mit
AflII/BglII	

Spur 11-13	E779Q geschnitten mit
AfIII/RalII	

AflII/BglII

Spur 14-16 E779A geschnitten mit Ava I (stille Mutation) Spur 17-19 E779Q geschnitten mit Ava I (stille Mutation)

Spur 20 1 kb ladder (Größenmarker)

#### 3.3.5 Restriktionsanalysen der pBluescript KSII+-a1hN776I-Mutanten

Auch das Plasmid pBluescript <sup>TM</sup> KSII+-*AfI*II- $\alpha$ 1hN776 wurde durch Freisetzung des Inserts und Kontrolle der stillen Mutation überprüft. Die durch Verdau mit *AfI*II und *BgI*II detektierten Banden entsprachen der berechneten Größe von 1528 bp und 2931 bp. Für *Bsp*EI wurde durch eine stille Mutation eine neue Schnittstelle eingeführt. Da der Vektor pBluescript<sup>TM</sup> KSII+-*AfI*II- $\alpha$ 1h keine Erkennungssequenz für dieses Enzym besitzt, wurde eine Linearisierung des mutierten Plasmides (Abb. 24) und somit eine Bande bei 4459 bp erwartet und auch bestätigt.



#### Abbildung 24: Restriktionskontrolle der pBluescript KSII+-a1hN776I-Mutanten

Spur 1	$pBluescript^{TM}$	KSII+-α1hN776I geschnitten mit BspEI
Spur 2+3	pBluescript <sup>TM</sup>	KSII+-α1hN776I geschnitten mit <i>Afl</i> II/ <i>Bgl</i> II
Spur 4	pBluescript <sup>TM</sup>	KSII+- $\alpha$ 1 geschnitten mit <i>Afl</i> II/ <i>Bgl</i> II
Spur 5	1 kb ladder (C	brößenmarker)

#### 3.3.6 Restriktionsanalysen der pBluescript<sup>™</sup> KSII+-α1hD804N-Mutanten

Das Mutageneseprodukt für die Konstruktion der Mutation D804N wurde zunächst mit *Bgl*II linearisert, um die Größe von 4459 bp zu überprüfen. Zur weiteren Charakterisierung des Plasmids wurde das *Afl*II/*Bgl*II-Fragment freigesetzt. Es konnten die erwarteten Banden mit einer Größe von 1528 bp sowie 2931 bp gefunden werden. Durch das Oligonukleotid, welches bei der Thermomutagenese eingesetzt wurde, entstand eine zusätzliche Erkennungssequenz für das Enzym *Kpn*I als stille Mutation, so dass insgesamt zwei Schnittstellen vorlagen. Durch die erfolgreiche Mutation entstanden im Gegensatz zum Verdau des unmutierten Vektors

pBluescript<sup>TM</sup> KSII+-*Afl*II- $\alpha$ 1h (siehe Abb. 26 Spur 19) zwei Fragmente mit einer Länge von 1133 bp und 3326 bp (siehe Abb. 25 Spur 6-9).



### Abbildung 25: Restriktionskontrolle der pBluescript KSII+- $\alpha$ 1hD804N-Mutanten.

Linkes Gel		
Spur 1 1 kb ladder		
(Größenmarker)	Rechtes Gel	Spur 11 kb ladder
Spur 2+3	Spur 2-5	pBluescript KSII+-a1hD804N
pBluescript		geschnitten mit AflII/BglII
KSII+-α1hD804N	Spur 6-9	pBluescript KSII+-a1hD804N
geschnitten mit BglII	-	geschnitten mit KpnI

#### 3.3.6.1 Restriktionsanalysen der pBluescript KSII+-α1hD807-Mutanten

Die Plasmide mit der cDNA für die Mutation an der Position wurden mit Munl linearisiert und ihre korrekte Größe von 4459 bp identifiziert. Da das Enzym Pvull einmal innerhalb des insertierten cDNA-Fragmentes neu der humanen Natriumpumpe schneidet und zweimal innerhalb des Vektors wurden korrekte Banden mit einer Größe von 2513 bp, 1012 bp und 934 bp detektiert. Als stille Mutation wurde eine neue Schnittstelle für Kpnl eingeführt und nach dem Verdau mit selbigem Enzym durch die beiden Fragmente der Länge 1133 bp und 3326 bp auch nachgewiesen. Das unmutierte Plasmid wurde nur einmal geschnitten und es resultierte eine Bande mit der Größe von 4459 bp (siehe Abb. 26).



### Abbildung 26: Restriktionskontrolle der pBluescript<sup>TM</sup> KSII+- $\alpha$ 1hD807-Mutanten.

Spur 1+201 kb ladder (Größenmarker)Spur 2pBluescriptTM KSII+- $\alpha$ 1hD807A geschnitten mit PvuIISpur 3pBluescriptTM KSII+- $\alpha$ 1hD807Q geschnitten mit PvuIISpur 7-9pBluescriptTM KSII+- $\alpha$ 1hD807A geschnitten mit MunISpur 10-12pBluescriptTM KSII+- $\alpha$ 1hD807Q geschnitten mit MunISpur 13-15pBluescriptTM KSII+- $\alpha$ 1hD807A geschnitten mit KpnISpur 16-18pBluescriptTM KSII+- $\alpha$ 1hD807Q geschnitten mit KpnISpur 19pBluescriptTM KSII+- $\alpha$ 1h geschnitten mit KpnI

# 3.4 Klonierung des *Afl*II-*Bgl*II-Fragmentes mit der mutierten c-DNA der α1-Untereinheit der humanen Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in den Hefevektor YhNa1

Die mutierte c-DNA wurde als *Afl*II-*Bgl*II-Fragment aus pBluescript<sup>TM</sup> KSII+- $\alpha$ 1h herausgeschnitten und in den Hefevektor YhNa1 ligiert, der zuvor mit *Afl*II und *Bgl*II verdaut worden war.

#### 3.4.1 Überprüfung der YhNa1-E779-Mutanten

Die erfolgreiche Insertierung der mutierten c-DNA als *AfI*II-*BgI*II-Fragment aus pBluescript<sup>TM</sup> KSII+- $\alpha$ 1h-Glu779DAsp und pBluescript KSII+- $\alpha$ 1h-E779Q in den Hefevektor YhNa1 wurde durch mehrere Restriktionsverdaus überprüft. Zur Kontrolle der Größe von 11712 bp wurde mit *BgI*II linearisiert. Die korrekte Länge des Inserts von 1528 bp wurde mit einem Doppelverdau mittels *AfI*II und *BgI*II bestimmt. Die Mutationen von Glu779 zu Aspartat bzw. Glutamat führten zu einer stillen Mutation

mit dem Wegfall einer Schnittstelle für Aval (vgl. Abb. 27). Die Restriktionsanalyse für *Ava*l ergab zwei Banden mit einer Größe von 7351 bp respektive 4361 bp.



#### Abbildung 27: Restriktionskontrolle der Mutanten YhNa1E779D und YhNa1 E779Q.

Linkes Gel Spur 1 1 kb ladder (Größenmarker) Spur 2+ 3 E779D mit *Afl*II und *Bgl*II Spur 4+5 E779Q mit *Afl*II und *Bgl*II Spur 6 1 kb ladder (Größenmarker) Spur 7+8 E779D mit *Ava* I (stille Mutation) Spur 9 E779Q mit *Ava* I (stille Mutation) Spur 10 YhNa1 verdaut mit *Afl*II Spur 11 1 kb ladder (Größenmarker)

Rechtes Gel

Spur 1 1 kb ladder (Größenmarker)

Spur 2 E779D verdaut mit *Bgl*II Spur 3 E779Q verdaut mit *Bgl*II

#### 3.4.2 Konstruktion der YhNa1-N776I-Mutanten

Das korrekte Einklonieren des pBluescript<sup>™</sup> KSII+-α1h-N776I-Fragmentes in den Hefevektor YhNa1 erfolgte durch die Überprüfung der Insertfreisetzung mittels *Afl*II */Bgl*II-Restriktion. Die erwarteten Banden von 10184 bp sowie von 1528 bp konnten, wie in Abbildung 28 (rechtes Gel) gezeigt wird, detektiert werden. *Pvu*II schnitt gemäß der Restriktionskarte insgesamt dreimal und es entstanden Banden mit Größen von 6163 bp, 3558 bp und 1826 bp.



#### Abbildung 28: Restriktionskontrolle der Mutanten YhNa1N776I.

Linkes Gel

- Spur 1 1 kb ladder (Größenmarker)
- Spur 2 YhNa1-N776I verdaut mit PvuII
- Spur 3 YhNa1 verdaut mit *Pvu*II

Rechtes Gel Spur 1 1 kb ladder (Größenmarker) Spur 2 YhNa1-N776I verdaut mit *Afl*II und *Bgl*II Spur 3 YhNa1 verdaut mit *Afl*II und *Bgl*II

#### 3.4.3 Konstruktion der YhNa1-D804N-Mutanten

Die YhNa1-D804N-Mutanten wurden zunächst einem *Afl*I /*Bgl*II-Verdau unterzogen, um die Insertfreisetzung zu kontrollieren. Da das korrekte Bandenmuster auftrat, wurden die Klone weiteren Restriktionsanalysen unterworfen. *Ava*I schneidet an drei verschiedenen Stellen und die auf dem linken Gel dargestellten Banden zeigten die erwarteten richtigen Größen von 5232 bp, 4361 bp und 2119 bp. Die Linearisierung und damit einfache Überprüfung der Plasmidgröße erfolgte mittels *Afl*II-Restriktionsanalyse. Wie auch bei der Kontrolle der anderen Mutationen im Hefevektor YhNa1 wurde das Enzym *Pvu*II gewählt, um das Plasmid mehrmals zu schneiden, wobei eine der drei Schnittstelle im einklonierten *Afl*II/*Bgl*II-Fragment liegt. Das Restriktionsmuster (siehe mittleres Gel in Abb. 29) bestätigte die erfolgreiche Klonierung. Schließlich erfolgte die Überprüfung der stillen Mutation mit *Kpn*I. Im Gegensatz zum unmutierten Hefevektor besitzt das Plasmid mit der Konstruktion Asp804Asn genau eine Schnittstelle für *Kpn*I. Dies konnte (siehe Abb. 29 rechtes Gel) gezeigt werden.



#### Abbildung 29: Restriktionskontrolle der Mutanten YhNa1-D804N

Linkes Gel

- Spur 1YhNa1-D804N geschnitten mit AvaISpur 2YhNa1 geschnitten mit Ava1Spur 31 kb ladder (Größenmarker)Mittleres GelSpur 11 kb ladder (Größenmarker)
- Spur 2-4 YhNa1D804N geschnitten mit Afl/III
- Spur 5-7 YhNa1D804N geschnitten mit PvuII

Rechtes Gel

- Spur 1 YhNa1D804N geschnitten mit AflII +BglII
- Spur 2 YhNa1 geschnitten mit *AflII* +*BglII*
- Spur 3 pBluescript KSII+- mit AflII +BglII
- Spur 4 YhNa1D804N mit *Kpn*I
- Spur 5 1 kb ladder (Größenmarker)

#### 3.4.4 Konstruktion der YhNa1-D807-Mutanten

Durch die Mutagenese der c-DNA der humanen Natriumpumpe an der Position Asp807 zu Alanin bzw. Glutamat wurde eine stille Mutation eingeführt, bei der eine Schnittstelle für das Enzym *Kpn*I entstand. Dadurch wurde das Plasmid bei einer Restriktion mit *Kpn*I linearisiert und ein Fragment mit einer Länge von 11072 bp erhalten. Die Insertfreisetzung durch kombinierten *AfI*II */BgI*II-Verdau zeigte die korrekten Banden der Länge 10184 bp und 1528 bp. Die Analyse mit *Pvu*II führte zu Fragmenten mit den Größen 6163 bp, 3558 bp sowie 1826 bp und bestätigten die mit dem Programm VectorNTI theoretisch ermittelten Fragmentgrößen (siehe Abb. 30).



#### Abbildung 30: Restriktionskontrolle der Mutanten YhNa1-D807A und D807Q.

- Spur 1 YhNa1-D807A geschnitten mit KpnI
- Spur 2 YhNa1-D807Q geschnitten mit *Kpn*I
- Spur 3 YhNa1geschnitten mit *Kpn*I
- Spur 4+5 YhNa1-D807A geschnitten mit
  - AflII/BglII
- Spur 8+9 YhNa1 geschnitten mit AflII/BglII
- Spur 6+7 YhNa1-D807Q geschnitten mit AflII/BglII

#### 3.5 Überprüfung der Expression der Hefeproteine

SDS-extrahierte Proteine des Wildtyps bzw. der Mutanten können von einem spezifischen Antikörper gegen die humane  $\alpha$ 1- bzw.  $\beta$ -Untereinheit detektiert werden. Dazu wird der Erstantikörper an einen zweiten Antikörper gebunden. Dieser Zweitantikörper ist mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Umsetzung eines chemiluminiszenten Farbstoffs. Dieser Chemiluminiszente Farbstoff belichtet einen Film und kann somit indirekt die verschiedenen Untereinheiten der Natriumpumpe sichtbar machen (vergleiche Kapitel 2.2.4.15). Zur Überprüfung des Expressionsniveaus der in der Hefe produzierten Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase wurden die Proteine der SDS-extrahierten Membranen zunächst elektrophoretisch aufgetrennt und dann auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet, auf der der immunologische Nachweis durchgeführt wurde. Bei allen Mutanten konnten sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Untereinheit nachgewiesen werden. Bei den SDS-Präparationen der nicht-transformierten Hefezellen wurden keine positiven Signale erkannt.

Spur 10+11YhNa1-D807A geschnitten mit PvuIISpur 12+13YhNa1-D807Q geschnitten mit PvuIISpur 14+15YhNa1 geschnitten mit PvuIISpur 16Stratagene Gene Ruler<sup>TM</sup><br/>(Größenmarker)

Das Expressionsniveau der verschiedenen Membranpräparationen unterschied sich jedoch deutlich. Das höchste Expressionsniveau zeigten der Wildtyp sowie die Mutante Glu779Asp. Schwächere Banden wurden für die Mutanten Asp807Gln, Asn776lle und Asp804Asn gefunden (siehe Abb. 31).

Die humane  $\beta$ -Untereinheit wird, wenn sie in Hefen exprimiert wird, unterschiedlich stark glykosyliert., d.h. es entstehen  $\beta$ -Untereinheiten mit geringfügig verschiedenen Molekülgewichten, die als Doppel- oder Mehrfachbanden beim Nachweis der  $\beta$ -Untereinheit erscheinen (siehe Abbildung 32).



Abbildung 31: Immunologischer Nachweis (Westernblot) der α-Untereinheit, Wildtypprotein und verschiedenen Mutanten.



Abbildung 32: Immunologischer Nachweis (Westernblot) der β-Untereinheit des Wildtypproteins und der verschiedenen Mutanten.

#### 3.6 Messergebnisse für die Glu779Asp, Asn776lle, Asp804Asn und Asp807Ala und Asp807GIn- Mutante der α1-Untereinheit der humanen Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

#### 3.6.1 Palytoxin- induzierter K<sup>+</sup>-Efflux aus Hefezellen in Abhängigkeit von der Palytoxinkonzentration und in Gegenwart verschiedener Kationen

Palytoxin (Ptx) interagiert spezifisch mit der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (Bottinger 1984) und bewirkt einen Natrium-Einstrom in die Zelle und einen Kaliumausstrom aus der Zelle (Scheiner-Bobis, Meyer zu Heringdorf et al. 1994; Redondo, Fiedler et al. 1996). Untransformierte Hefezellen zeigen keinen K<sup>+</sup>-Efflux in Gegenwart von Palytoxin. Erst bei gleichzeitiger Expression von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase zeigt sich ein intrazellulärer Kaliumverlust (Scheiner-Bobis, Meyer zu Heringdorf et al. 1994; Redondo, Fiedler et al. 1996). Durch eine Messung des Ptx- induzierten Kalium- Efflux an Hefezellen kann zum einen die tatsächliche Expression der Mutanten überprüft werden. Da der durch dieses Toxin hervorgerufene Kanal vermutlich mit dem Ionophor der Natriumpumpe übereinstimmt (Redondo 1996), ist die Untersuchung der Interaktion mit Palytoxin ein wichtiges Werkzeug zur Ermittlung der Rolle von Aminosäuren hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Ausbildung des Ionophors.



Abbildung 33: Ptx- induzierter K<sup>+</sup>-Efflux aus Hefezellen, die die native Natriumpumpe (■) oder die Mutante Glu779Asp (◊) exprimieren, in Gegenwart von extrazellulären Natriumionen (2.2.4.3).

Für den Wildtyp der humanen Natriumpumpe wird der halbmaximale Efflux (EC<sub>50</sub>-Wert) bei einer Ptx-Konzentration von 7,34  $\pm$  1,67 nM gemessen. Bei Hefen, die die Natriumpumpe mit der Mutation Glu779Asp exprimieren, ist der EC<sub>50</sub>-Wert etwa neunmal niedriger im Vergleich zum Wildtyp, nämlich 0,81  $\pm$  0,08 nM. Der maximale Kaliumverlust der Hefezellen ist beim Wildtyp und der Mutanten Glu779Asp vergleichbar und beträgt 92,21  $\pm$  2,4 % respektive 90,30  $\pm$  1,56 % vom Gesamtkalium.



Für die Mutante Asn776lle liegt der  $EC_{50}$ -Wert bei 0,43 ± 0,10 nM und ist damit um mehr als eine Potenz niedriger verglichen mit dem Wildtyp. Der maximale Kaliumverlust der Hefezellen bei einer Palytoxinkonzentration von 500 nM erreicht 82,32 ± 1,92 % des Gesamtkaliums. Palytoxin induziert auch in Gegenwart anderer Kationen einen Kaliumefflux (Redondo, Fiedler et al. 1996).

Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten

mit doppeltem Reaktionsansatz (siehe 2.2.4.3).

An Hefe-exprimierter humaner Natriumpumpe wurde der Kaliumverlust in Gegenwart von extrazellulären Calciumionen in Abwesenheit von Natriumionen untersucht. Calcium ist zweifach positiv geladen und besitzt als nicht-hydratisiertes Ion einen Radius von 99 pm. Damit ist es geringfügig größer als das einfach positiv geladene Natriumion mit einem Radius von 97 pm. Die beobachtbaren Kalium-Nettoverluste bei Anwesenheit von Calcium liegen bei der nativen Natriumpumpe respektive der Asn776lle-Mutanten bei 12,68  $\pm$  0,38 % beziehungsweise 23,25  $\pm$  5,95 % bei einer Palytoxinkonzentration von 1µM.



Abbildung 35: Ptx- induzierter K<sup>+</sup>-Efflux aus Hefezellen in Gegenwart von extracellulärem Calcium anstelle von Natrium. An Zellen mit nativer Natriumpumpe (■),untransformierte Zellen (□) oder der Mutanten Asn776lle (☆) wurde in Gegenwart von Calcium der K<sup>+</sup>Efflux gemessen, um die Selektivität des Ptx-induzierten Kanals zu untersuchen. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz (siehe 2.2.4.3).

Barium, ein zweiwertiges Kation, hat als unhydratisiertes Ion einen Radius von 134 pm und ist damit deutlich größer als das Natriumion. Zur Ermittlung der Selektivität des Ptx-induzierten Kanals wurden 1×10<sup>7</sup> Zellen mit 200 mM Bariumchlorid für 2h Stunden bei steigenden Ptx-Konzentrationen inkubiert und anschließend der K<sup>+</sup>- Efflux gemessen.



Abbildung 36: Ptx- induzierter K<sup>+</sup>-Efflux aus Hefezellen in von extracellulärem Barium Gegenwart anstelle von Natrium. Hefen, die die native Natriumpumpe (■),untransformierte Zellen (□) oder die Mutante Asn<sup>776</sup>lle ( $\updownarrow$ ) exprimieren, wurden mit 200 mM Bariumchlorid für 2 Stunden in HBC-Puffer pH 7,4 inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert + Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

Dabei wurde ein halbmaximaler Effekt bei 94,29  $\pm$  0,12 nM ermittelt (vgl. Abb. 36). Diese Konzentration liegt um mehr als das 10-fache höher verglichen zu den Messungen, bei denen Natriumionen eingesetzt wurden. Bei der Mutanten Asn<sup>776</sup>lle liegt dieser Wert bei 196,6  $\pm$  0,15 nM. Der maximale K<sup>+</sup>-Efflux unterscheidet sich für Wildtyp (95,0 %) und Mutante (94,0 %) nicht.



Abbildung 37: Ptx- induzierter K<sup>+</sup>-Efflux aus Hefezellen in Gegenwart von extracellulärem Magnesium anstelle von Natrium. Der K<sup>+</sup>-Efflux aus 1×10<sup>7</sup> Zellen mit nativer Natriumpumpe (■), untransformierte Zellen (□) oder der Mutanten Asn<sup>776</sup>lle (☆) wurde in Gegenwart von 200 mM Magnesiumchlorid bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

Das zweifach positiv geladene Magnesiumion hat als unhydratasiertes Ion einen Radius von 66 pm und ist damit kleiner als das Natriumion. Sowohl die native Natriumpumpe als auch die Mutante Asp776Ile zeigen mit 5,06 % und 8,33 % einen ähnlich geringen K<sup>+</sup>-Efflux in Gegenwart von Palytoxin (vgl. Abb. 37). Die Ca<sup>2+</sup>-ATPasen besitzen an der Position 804 ein Asparagin, welches beide Ca<sup>2+</sup>-Ionen koordiniert (Toyoshima, Nakasako et al. 2000). Bei den Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasen tritt an der homologen Position ein Aspartat auf. Deshalb ist es interessant, die Interaktion der Natriumpumpe mit Palytoxin, welche am ionenleitenden Kanal stattfindet, nicht in Gegenwart von Natrium sondern in Gegenwart von Calciumionen zu messen, nachdem das Asp804 zu Asn mutiert wurde Der halbmaximale Kaliumausstrom wird beim Wildtyp bei einer Konzentration von 700,4 ± 3,7 nM Ptx erreicht. Bei einer Ptx-Konzentration von 1µM wird ein maximaler Efflux von 12,68 ±

0,38 % gemessen. Bei einer etwas niedrigeren Konzentration, genauer bei 558, 6 ± 11,3 nM Ptx wird bei den Hefen, die die Natriumpumpe mit der Mutation Asp<sup>804</sup>Asn exprimieren der halbmaximale K<sup>+</sup>-Efflux erzielt. Die Mutante zeigt mit 35,45 ± 1,85 % einen deutlich höheren Kaliumefflux.



Abbildung 38 a): Ptx- induzierter K<sup>+</sup>-Efflux aus Hefezellen mit nativer Natriumpumpe ( $\blacksquare$ ) und der Mutante Asp<sup>804</sup>Asn ( $\heartsuit$ ) in Gegenwart von Natriumionen. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.



Abbildung 38 b): Ptx- induzierter K<sup>+</sup>-Efflux aus Hefezellen mit nativer Natriumpumpe (=) und der Asp<sup>804</sup>Asn Mutante (▽) Gegenwart in von Calciumionen. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

Der Aspartatrest an der Position 807 ist innerhalb der Familie der P<sub>2</sub>-Typ-ATPasen hoch-konserviert (vgl. Tabelle 10). Die negative Ladung an dieser Position spielt vermutlich eine Rolle für die Ausbildung des durch Palytoxin ausgeformten lonenkanals. Es wurde das Aspartat zu Alanin und Glutamat mutiert und der EC<sub>50</sub>-Wert ermittelt. Er liegt bei der Mutanten Asp807Ala mit 3,62 ± 2,82 nM Ptx in ähnlicher Größenordung wie der der nativen Pumpe. Wesentlich sensitiver gegenüber Ptx zeigt sich die Mutante Asp807Gln. Schon bei 0,28 ± 0,05 nM wird der halbmaximale Kaliumefflux beobachtet. Der maximale Kaliumverlust der Asp807-Mutanten ist vergleichbar (76,31 ± 0,45 %) bei Asp807Ala bzw. 80,93 ± 1,01 % bei Asp807Gln und liegt etwas unterhalb der des Wildtyps (92,21 ± 2,40 %).



Abbildung 39a:





#### Abbildung 39b:

**Ptx- induzierter K<sup>+</sup>-Efflux aus Hefezellen** mit nativer Natriumpumpe ( $\blacksquare$ ) und der Mutanten Asp<sup>807</sup>Gln ( $\circ$ ) in Gegenwart von Natriumionen (siehe 2.2.4.3).

Zur weiteren Charakterisierung des durch Ptx erwirkten Ionenkanals bei den Mutanten an Position 807 wurde die Konzentrationsabhängigkeit in Gegenwart des in seinem Radius größeren Ca<sup>2+</sup> Ions (99 pm) gemessen. Der EC<sub>50</sub>-Wert wird beim Wildtyp bei einer Konzentration von 700,4  $\pm$  3,7 nM Ptx erreicht, für die Mutanten Asp807Ala bzw. Asp807Gln liegt der Wert bei 364,7  $\pm$  12,15 nM Ptx respektive 223,9  $\pm$  0,007 nM. Dabei wurde ein maximaler Efflux der Kaliumionen von 12,68  $\pm$  0,38 %, 33,10  $\pm$  0,48 % und 62,50  $\pm$  1,30 % bei Wildtyp, Asp807Ala und Asp807Gln gemessen (vgl. Abb. 40).



Abbildung 40a: Ptx- induzierter K<sup>+</sup>-Efflux aus Hefezellen in Gegenwart von Calciumionen mit nativer Natriumpumpe (■) und der Mutanten Asp<sup>807</sup>Ala (○).Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.



Abbildung 40b Ptx- induzierter K<sup>+</sup>-Efflux aus Hefezellen in Gegenwart von Calciumionen mit nativer Natriumpumpe (■) und der Mutanten Asp<sup>807</sup>Gln (○).Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

#### **3.6.2** Hemmung des Palytoxin- induzierten K<sup>+</sup>-Efflux durch Ouabain

Der K<sup>+</sup>-Efflux der Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, die in Hefen exprimiert wird und der durch die Interaktion mit Palytoxin ausgelöst wird, kann durch Ouabain gehemmt werden (Scheiner-Bobis, Meyer zu Heringdorf et al. 1994). Das Ausmaß der Hemmung des K<sup>+</sup>-Effluxes erlaubt Rückschlüsse auf die relative Affinität der nativen Natriumpumpe und ihrer Mutanten für Ouabain.



Abbildung 41: Inhibition des Ptx-induzierten K<sup>+</sup>-Efflux durch Ouabain an der nativen Natriumpumpe (**■**)

und bei Glu779Asp (◊). Bei steigender die Palytoxinkonzentration Ouabainkonzentration ist wurde konstant und beträgt 75nM. Ermittelt die Konzentration, bei der die halbmaximale Hemmung des durch Ptx-induzierten K<sup>+</sup>-Efflux erreicht wird (EC<sub>50</sub>-Wert). Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus repräsentativen Experiment einem mit doppeltem Reaktionsansatz (siehe 2.2.4.4).

Dazu wird der maximal erzielbare K<sup>+</sup>-Efflux bei einer Ptx-Konzentration von 75nM als 100% gesetzt und bei steigender Ouabainkonzentration die Hemmung dieses Kaliumausstromes ermittelt. Die Konzentration, bei der die halbmaximale Hemmung erzielt wird, liegt beim Wildtyp bei einer Ouabainkonzentration von 5,79 ± 0,81 µM, für die Mutanten Glu779Asp in ähnlicher Größenordnung bei 7,84 ± 2,78 µM. Die maximale Rückdrängung des Kaliumverlustes liegt beim Wildtyp jedoch wesentlich höher und beträgt 82,3% im Vergleich zur Mutanten Glu779Asp mit 37,2 % (vgl. Abb. 41). Der Ersatz von Asparagin gegen Isoleucin an Position 776 führte zu einer Verschiebung des EC<sub>50</sub>-Wertes nach rechts, er beträgt hier 16,89 ± 8,80 µM Ouabain. Auffällig ist hierbei die geringe Hemmwirkung von Ouabain mit 31,4 %. Bei Hefezellen, die die Natriumpumpe mit der Mutation Asp804Asn exprimieren, wurde eine höhere Ouabainkonzentration (13,58 ± 0,21 µM) - verglichen mit dem Wildtypbenötigt, um die halbmaximale Rückdrängung des durch Palytoxin induzierten Efflux von Kaliumionen zu erzielen. Dabei konnte insgesamt bei einer Konzentration von 150 µM Ouabain eine Hemmung um 55,4 % erzielt werden (vgl. Abb. 43).



Abbildung 42: Inhibition des Ptx- induzierten K<sup>+</sup>-Efflux durch Ouabain in der nativen Natriumpumpe (■) und bei der Mutanten Asn776lle (☼).Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus einem repräsentativen Experiment mit doppeltem Reaktionsansatz.

Deutliche Unterschiede zeigten die beiden Mutationen an der Position 807. Die Alanin-Mutante verhält sich sehr ähnlich dem Wildtyp und zeigt bei einer Ouabainkonzentration von 6,94  $\pm$  2,83  $\mu$ M die halbmaximale Hemmung des Kaliumeffluxes; die maximale Hemmung beträgt insgesamt 85,7%. Im Gegensatz dazu verändert sich bei Ersatz des Aspartates durch ein Glutamin der EC<sub>50</sub>-Wert. Bei einer Konzentration von 13,48  $\pm$  6,45  $\mu$ M tritt die halbmaximale Hemmwirkung auf, es wird bei 150  $\mu$ M Ouabain eine 33,6 %ige Hemmung erreicht (vgl. Abb. 44).



Abbildung 43: Inhibition des Ptx-induzierten K<sup>+</sup>-Efflux durch Ouabain an Hefezellen, die die native Natriumpumpe(■) oder die Mutante Asp804Asn (▽) exprimieren. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus aus einem repräsentativen Experiment mit doppeltem Reaktionsansatz.



Abbildung 44: Inhibition des Ptx-induzierten K<sup>+</sup>-Efflux durch Ouabain für Membranen mit nativer Natriumpumpe (■) oder den Mutanten Asp807GIn (○) oder Asp807Ala (□)( im Inset). Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus einem repräsentativen Experiment mit doppeltem Reaktionsansatz.

## 3.6.3 Bindung von radioaktiv markiertem Ouabain in Gegenwart von Phosphat und Mg<sup>2+</sup>-Ionen

Ouabain reagiert spezifisch und mit hoher Affinität mit der Natriumpumpe und hemmt die ATP-Hydrolyse (Hansen 1984; Scheiner-Bobis, Meyer zu Heringdorf et al. 1994). Die Bindung des Ouabain erfolgt an die  $E_2$ -P Konformation des Enzyms. Die native Natriumpumpe wird unter Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  und anorganischem Phosphat in diese  $E_2$ -P Konformation dirigiert und bildet dann einen stabilen Komplex mit Ouabain. Die Menge dieses gebildeten Komplexes kann mit [<sup>3</sup>H]Ouabain nachgewiesen werden.

Die Dissoziationskonstante  $K_{0,5}$  für Ouabain an Membranen des Wildtyp-Enzyms beträgt 44,51 ± 9,69 nM bei einer maximalen Ouabainbindung ( $B_{max}$ ) von 1,09 ± 0,12 pmol/mg Protein.

Mutante	K <sub>0,5</sub> (nM)	B <sub>max</sub> (pmol/mg Protein)
Wildtyp	44,51 ± 9,69	1,09 ± 0,12
Glu779Asp	nicht bestimmbar	n.d.
Asn776lle	nicht bestimmbar	n.d.
Asp804Asn	104,1 ± 52,18	2,87 ± 0,24
Asp807Gln	297,6 ± 18,54	3,07 ± 0,14
Asp807Ala	10,70 ± 20,03	0,41 ± 0,21

Tabelle 11: Dissoziationskonstante für Ouabain

Für die Glu779Asp und Asn776lle konnten unter den gegebenen Bedingungen weder die Dissoziationskonstante noch die maximale Bindung bestimmt werden. Membranen aus Hefen mit der Asp804Asn -Mutante bindet Ouabain mit geringerer Affinität ( $K_{0,5}$ -Wert 104,1 ± 52,18 nM) als der Wildtyp. Der B<sub>max</sub>-Wert beträgt 2,87 ± 0,24 pmol/mg Protein. Membranen mit der Asp807Ala -Mutante haben eine hohe Ouabainaffinität ( $K_{0,5}$ -Wert 10,70 ± 20,03 nM). Die maximale Ouabainbindung jedoch ist sehr gering und beträgt 0,41 ± 0,21 pmol/mg Protein. Die Asp807Gln -Mutante hat eine sehr viel geringere Affinität als der Wildtyp oder die Mutante Asp807Ala, der  $K_{0,5}$ -Wert liegt bei 297,6 ± 18,54 nM Ouabain. Die maximale Ouabainbindung, gemessen in pmol Ouabain pro mg Protein, liegt bei einem Wert von 3,07 ± 0,14 (siehe Tab. 11).

## 3.6.4 Verdrängung von gebundenem, radioaktiv markiertem Ouabain in Abhängigkeit von der K<sup>+</sup>-Ionen Konzentration

Der [E<sub>2</sub>\*P• Ouabain] –Komplex ist in der nativen Natriumpumpe K<sup>+</sup> sensitiv, d.h. bei steigenden Kaliumkonzentrationen nimmt die Menge des [E2\*P• Ouabain] -Komplexes ab. Die Ursache liegt darin, dass extrazelluläre Kaliumionen in der E<sub>2</sub>-P okkludiert werden Konformation der Natriumpumpe und vermutlich die Dephosphorylierung auslösen. Die Affinität des Ouabain zu der E<sub>2</sub>-Konformation ist geringer als zu der E<sub>2</sub>-P Konformation und Ouabain wird verdrängt. Das Ausmaß der Rückdrängung gemessen als Abnahme des gebildeteten Pumpen-Ouabainkomplexes [E<sub>2</sub>\*P• Ouabain] kann als Maß für die relative Affinität von Wildtyp und Mutanten für Kalium herangezogen werden.

Beim Wildtyp wurde ein  $K_{0,5}$ - Wert für Kalium von 1,25 ± 0,11 mM bei einer maximalen [<sup>3</sup>H]Ouabainbindung von 1,50 ± 0,21 pmol/mg Protein berechnet . An den Membranen mit der Glu779Asp-Mutanten konnte keine Veränderung in der Menge des gebildeten [ $E_2$ \*P• Ouabain] –Komplexes gemessen werden bei einer ohnehin sehr niedrigen [<sup>3</sup>H]Ouabainbindung von 0,09 ± 0,08 pmol/mg Protein (vgl. Abb. 45 a). Der K<sub>0,5</sub>-Wert für K<sup>+</sup>-Ionen an Membranen mit der Mutanten Asn776IIe ist 0,34 ± 0,04 mM, die maximale Ouabainbindung liegt mit 0,23 ± 0,20 pmol/mg Protein niedriger als beim Wildtyp (vgl. Abb. 45 b). An den Membranen mit der Mutation Aspartat gegen Asparagin an der Position 804 konnte kein K<sub>0,5</sub>- Wert bestimmt werden, der B<sub>max</sub>-Wert beträgt 0,65 ± 0,20 pmol/mg Protein (vgl. Abb. 46).



Abbildung 45 a) [3H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der K<sup>+</sup>-Konzentration für die native Natriumpumpe (**I**) und die Glu<sup>779</sup>Asp-Mutante (◊). 250µg Protein wurden 30 min inkubiert. Anschließend wurde aus der Regressionsfunktion die Konzentration ermittelt, bei der die halbmaximale Hemmung (IC50-Wert) erfolgt. Dieser Wert ist Maßstab für die relative Affinität für K<sup>+</sup>- Ionen.



Abbildung 45 b) [<sup>3</sup>H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der K<sup>+</sup>-Konzentration an Membranen mit nativer Natriumpumpe (**■**)oder der Asn<sup>776</sup>Ile-Mutanten (🌣). Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

Die Hefemembranen, die die Natriumpumpe mit Mutationen an der Position Asp807 tragen, zeigen unterschiedliche Affinitäten zu Kalium. Die K<sub>0,5</sub>- Werte betragen 0,74  $\pm$  0,02 mM bzw. 17,04  $\pm$  0,90 mM für Asp807Ala ((vgl. Abb. 47) beziehungsweise Asp807Gln (vgl. Abb. 48), die B<sub>max</sub>-Werte liegen bei 1,52  $\pm$  0,026 pmol/mg Protein und 0,94  $\pm$  0,11 pmol/mg Protein bei Asp807Ala respektive Asp807Gln.



Abbildung 46: [<sup>3</sup>H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der K<sup>+</sup>-Konzentration an Hefemembranen mit nativer Natriumpumpe (■) und der Asp804Asn-Mutanten (▽).Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.



Abbildung 47: [<sup>3</sup>H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der K<sup>+</sup>- Konzentration für die native Natriumpumpe (■) und der Asp807Ala-Mutanten (□).



Abbildung 48: [<sup>3</sup>H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der K<sup>+</sup>- Konzentration an Membranen mit nativer Natriumpumpe (■) und der Asp807Gln-Mutanten (○).Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

### 3.6.5 Bindung von radioaktiv markiertem Ouabain in Abhängigkeit von der Na<sup>+</sup>-Ionen Konzentration

Die Wechselwirkung von nativer oder mutierter Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase mit Na<sup>+</sup> kann durch die Bestimmung des [E<sub>2</sub>-P\*Ouabain] Komplexes als Funktion der Na<sup>+</sup>-Konzentration bestimmt werden. Membranen aus Hefen, die die native Natriumpumpe exprimieren, binden in Anwesenheit ATP, Na<sup>+</sup> und Mg<sup>2+</sup> Ouabain mit hoher Affinität. Bei dieser Teilreaktion des Enzyms wird unter physiologischen Bedingungen Na<sup>+</sup> aus der Zelle heraus transportiert, indem die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase durch ATP phosphoryliert wird und Na<sup>+</sup>-Ionen an intrazelluläre Bindungsstellen bindet. Die Natriumionen werden anschließend okkludiert und dann in den extrazellulären Raum freigegeben. Aus der E<sub>1</sub>-P-Konformation geht das Enzym nun in die E<sub>2</sub>-P Form über und kann Ouabain mit hoher Affinität binden.



Abbildung 49: [<sup>3</sup>H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von Na⁺-Konzentration der für die native Natriumpumpe (∎) und der Asn776Ile-Mutanten (泣).Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

Die Untersuchungen beim nativen Enzym ergaben einen  $K_{0.5}$ -Wert von 0,042 ± 0,046 mM (vgl. Abb. 49). Für die Mutanten Glu779Asp konnte dieser Wert nicht bestimmt werden. An Membranen aus Hefen, die die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase mit der Mutation Asn776lle exprimiert haben, stimulierte Na<sup>+</sup> die [3H]Ouabainbindung mit einem K<sub>0.5</sub>-Wert von 1,0  $\times 10^{-7} \pm 0,0449$  mM (vgl. Abb. 49). An Membranen mit der Asp804Asn (vgl. Abb. 50) und Asp807Gln-Mutante liegen die  $K_{0.5}$ -Werte bei 0,0027 ± 0,0277 mM und 0,012 ± 0,0234 mM (vgl. Abb. 51). In der nachfolgenden Tabelle sind die Werte für die maximale Ouabainbindung aufgelistet:

max	5
	B <sub>MAX</sub> (PMOL/MG PROTEIN)
Wildtyp	$0,69 \pm 0,082$

Tabelle 12: B<sub>max</sub>-Werte für die Natrium-stimulierte Ouabainbindung

Wildtyp	$0,69 \pm 0,082$
Asn776Ile	$0,20 \pm 0,041$
Asp804Asn	$0,39 \pm 0,040$
Asp807Gln	$0,66 \pm 0,115$



Abbildung 50: [<sup>3</sup>H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der Na<sup>+</sup>- Konzentration für die native Natriumpumpe (■) und die Asp804Asn-Mutante (▽).Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.



Abbildung 51: [<sup>3</sup>H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der Na<sup>+</sup>- Konzentration an Hefemembranen, die die native Natriumpumpe (■) oder die Asp807Gln-Mutante (○) exprimierten. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

### 3.6.6 Bindung von radioaktiv markiertem Ouabain in Abhängigkeit von der Ca<sup>2+</sup>-Ionen Konzentration

Da die Hefezellen, die die Natriumpumpen mit den Mutationen Asn776lle (vgl. Abb. 52), Asp804Asn (vgl. Abb. 53) und Asp807Gln exprimieren einen sehr niedrigen  $EC_{50}$ -Wert für den durch Ptx-induzierten K<sup>+</sup>-Efflux in Gegenwart von Calciumionen aufweisen ist es interessant, die [<sup>3</sup>H]Ouabainbindung auch als Funktion der Calciumkonzentration zu untersuchen.



Abbildung 52: [<sup>3</sup>H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von Ca<sup>2+</sup>der Konzentration für die native (**■**) und Natriumpumpe die Asn776lle-Mutanten (☆).Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung 3 unabhängigen aus Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

Anders als in Gegenwart von Natriumionen, erreicht die [3H]Ouabainbindung zunächst einen maximalen Wert, fällt aber dann wieder. Bei der Membran mit der Mutation Asn776lle steigt die calciumabhängige Ouabainbindung nicht an. Bei den Mutationen Asp804Asn und Asp807Gln (nicht dargestellt) kann eine deutliche Zunahme der Ouabainbindung mit steigender Calciumkonzentration beobachtet werden. Die K<sub>D</sub>-Werte für die Hefemembranen mit dem Wildtyp betragen 0,008 ± 0,045 mM, für die Mutanten Asn776lle, Asp804Asn und Asp807Gln 1,0 \*  $10^{-7} \pm 0,038$  mM<sub>.</sub> 0,688 ± 0,419 mM und 0,426 ± 0,020 mM. Die maximale Ouabainbindung liegt beim Wildtyp bei 0,51 ± 0,09 pmol/mg Protein, für die Mutanten Asn776lle, Asp804Asn und Asp807Gln 0,446 ± 0,07 pmol/mg Protein und 0,71 ± 0,073 pmol/mg Protein (vgl. Abb. 52 und 53).



Abbildung 53: [<sup>3</sup>H]Ouabainbindung in Abhängigkeit von der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration an Membranen mit nativer Natriumpumpe (■) oder der Asp804Asn-Mutante (▽).Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten mit doppeltem Reaktionsansatz.

#### 3.6.7 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Aktivität von Wildtyp und Mutanten

An SDS-extrahierten Membranen von Hefen, die die Natriumpumpe exprimieren, kann die spezifische Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Aktivität als Ouabain-hemmbarer Anteil der gesamten ATPase-Aktivität gemessen werden. Ziel der Untersuchung war der Einfluss der Mutationen im putativ ionophoren Teil der Natriumpumpe auf die ouabain sensitive ATPase Aktivität.



Abbildung 54: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Aktivitäten in SDS-extrahierten Hefemikrosomen bei Wildtyp, Glu779Asp. Asn776lle. Asp804Asn, Asp807Ala und Asp807GIn. 150µg bis 400µg mikrosomalen Proteins wurden in einer 1ml Reaktionslösung aus phosphatsensitivem Substrat und Pufferlösung sowie MgCl<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>Cl und NaCl bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 360 nm über einen Zeitraum von 10 Minuten gemessen. In einem zweiten Ansatz wurde unter Zugabe von 200 µM Ouabain unter ansonsten gleichen Bedingungen die Absorption bestimmt. Aus den Änderungen Absorption pro Zeiteinheit wurden der dann die Enzymaktivitäten berechnet. Die spezifische Aktivität wurde aus der Differenz der Aktivitäten mit und ohne Ouabain ermittelt. Die Experimente wurden 3mal durchgeführt und die Untersuchungen Ergebnisse dieser gemittelt. Die Standardabweichung ist graphisch als Balken aufgeführt.

Die spezifische ATPase-Aktivität betrug beim Wildtyp 5,86  $\pm$  0,73 mU/mg Protein. Für die Mutanten Glu779Asp (0,78  $\pm$  2,05 mU/mg Protein), Asn776lle (1,50  $\pm$  0,30 mU/mg Protein), Asp804Asn (3,01  $\pm$  0,58 mU/mg Protein) sowie Asp807Ala (2,55  $\pm$  0,53 mU/mg Protein) lag der Wert deutlich niedriger. SDS-extrahierte Mikrosomen mit der Mutation Asp807Glu zeigten praktisch keine Aktivität (0,00  $\pm$  0,30 mU/mg Protein).

#### 4 Diskussion

Drei humane Isoformen der  $\alpha$ -Untereinheit der Natriumpumpe wurden zusammen mit der ß1-Untereinheit der Natriumpumpe in der Bäckerhefe S. cerevisiae exprimiert und mit dem Gift der Korallen Palythoa caribaeorum, dem Palytoxin, inkubiert. Palytoxin interagiert mit der Natriumpumpe und unterbindet die Kopplung von Natrium- und Kaliumtransport. Stattdessen fließen die lonen entlang ihres Konzentrationsgradienten (Scheiner-Bobis, Meyer zu Heringdorf et al. 1994; Redondo, Fiedler et al. 1996). Der beobachtete Kaliumstrom aus der Zelle heraus wurde gemessen und die Daten für die verschiedenen Isoformen untereinander verglichen. Da bei allen drei Kombinationen  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$  ein deutlicher K<sup>+</sup>-Efflux beobachtet werden konnte, zeigt dies zunächst die erfolgreiche Expression der Natriumpumpe. In untransformierten Hefezellen, die keine endogene Natriumpumpe besitzen, wird durch Ptx kein Kaliumefflux ausgelöst. Der maximale Ausstrom von Kaliumionen nach 2 Stunden liegt mit 89,8% bei der α1-Untereinheit am höchsten und nimmt über die  $\alpha$ 3-Untereinheit mit 73,4 % bis zur  $\alpha$ 2-Untereinheit mit 59,1 % ab. Dies spiegelt möglicherweise ein unterschiedliches Expressions-Niveau der Proteine wieder. Auch die EC<sub>50</sub>-Werte weisen einen deutlichen Unterschied auf. Am sensitivsten gegenüber Ptx ist die Kombination aus  $\alpha 1\beta 1$  (9,5 ± 0,12 nM). Für  $\alpha 2\beta 1$  $(41.96 \pm 0.11 \text{ nM})$  und  $\alpha 3\beta 1$  (23.51 ± 0.12 nM) liegt die Konzentration für den halbmaximalen Kaliumefflux etwa viermal bzw. zweimal so hoch verglichen mit α1β1. Neben einer tatsächlich unterschiedlichen Sensitivität gegenüber Palytoxin kann auch das unterschiedlich hohe Expressionsniveau der Natriumpumpe eine Rolle für die unterschiedlichen EC<sub>50</sub>-Werte spielen.

Ouabain in  $\mu$ M-Konzentration drängt den Kaliumefflux bei allen drei Isoformen deutlich zurück (90,5%, 95,0% und 96,3% für  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 3). Die Konzentrationen, die die halbmaximale Inhibition erlauben, betragen 13,6  $\mu$ M für  $\alpha$ 1, 14,4  $\mu$ M für  $\alpha$ 2 und 5,0  $\mu$ M für  $\alpha$ 3. Proscillaridin A, welches sich vom Ouabain durch den 6er Lactonring unterscheidet, und dessen Löslichkeit aufgrund der OH-Gruppen, die hier fehlen, geringer ist, kann ebenfalls sehr gut den durch Palytoxin hervor gerufenen Ionenfluss hemmen, wenn auch in etwas geringerem Maße.

Auffällig ist die geringere Hemmwirkung gegenüber der  $\alpha$ 3-Untereinheit (s. Abb. 15). Digoxin wurde der Hemmeffekt untersucht, weil es statt der Rhamnose die Mit Digitoxose, einen Dreifachzucker trägt. Auffällig sind bei den Ergebnissen zwei Dinge. Zum einen sinkt die maximale Hemmbarkeit durch Digoxin gegenüber Ouabain bei allen drei Isoformen ab (60 %, 70% und 80%). Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem in der Literatur berichteten geringeren inhibitorischen Effektes des Ouabains gegenüber Digoxin (Ozaki et al. 1985). Zum anderen, und sehr viel bemerkenswerter, ist der Unterschied im EC<sub>50</sub>-Wert sowohl gegenüber den Werten beim Ouabain als auch im Vergleich der Isoformen untereinander. Mit 124,2 μM liegt die erforderliche Ptx-Konzentration für α1 etwa 10mal höher als beim Ouabain. Etwa 20mal so hoch liegt sie für  $\alpha$ 3, aber in derselben Größenordnung bei  $\alpha$ 2 für Ouabain (14,4  $\mu$ M) und Digoxin (8,4  $\mu$ M). Das zeigt auch, dass  $\alpha$ 2 sehr viel sensitiver gegenüber Digoxin ist als  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 3 (s. Tabelle 8). Ist die Digitoxose also weniger gut in der Lage, sich an die Natriumpumpe anzulagern und/oder das Ptx zu verdrängen?

Zum weiteren Herantasten an die Rolle, die der Zucker bei der Hemmung spielt, wurde mit Ouabagenin experimentiert. Identisch mit Ouabain fehlt ihm nur die Rhamnose. Hier zeigt sich nun ein stark verringerter Hemmeffekt auf den durch das Korallengift hervorgerufenen Kaliumausstrom. Nur 37,0%, 19,5 % bzw 33,0 % des K<sup>+</sup>-Effluxes wird gehemmt bei  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 3. Dabei hebt sich auch der Wert von  $\alpha$ 1 gegenüber den anderen beiden Isoformen heraus. Reichen noch 82.0  $\mu$ M Ptx, um den halben maximalen K<sup>+</sup>-Efflux zu erzeugen, so steigt dieser Wert für  $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 3 auf 363,0  $\mu$ M respektive 493,0  $\mu$ M an.

Ist es also der Zuckerbaustein der herzaktiven Steroide, der einen großen Teil der Hemmwirkung erzeugt? Bufalin ist das Aglykon des Proscillaridin A. Sein 6er-Lactonring ist das stärkste Unterscheidungsmerkmal gegenüber Ouabagenin. Wichtig ist auch das Fehlen von OH-Gruppen. Wider Erwarten unterscheiden sich die Ergebnisse für Proscillaridin A und Bufalin nicht. Sowohl die maximale Hemmwirkung als auch die EC<sub>50</sub>-Werte liegen sehr nahe beieinander. In diesem Falle scheint die Zuckerkomponente nicht den Ausschlag zu geben. Digitoxigenin besitzt wie das Ouabagenin einen 5er-Lactonring. Sind bei diesem Aglykon aufgrund des fehlenden Zuckerbausteines geringere Rückdrängnungseffekte zu finden? Unter der Verwendung von Digitoxigenin zeigt sich ein sehr ungleiches Bild für die drei Isoformen.

Kaum unterschiedlich zu den Daten unter Verwendung von Ouabain oder Proscillaridin A sind die Daten für  $\alpha$ 1 mit Digitoxigenin. Die bei  $\alpha$ 3 erzielbare Inhibition von 54,8 % liegt deutlich unter der, die die herzaktiven Steroide Ouabain und Proscillaridin A hervorrufen, deutlich höher aber auch, als die durch das Aglykon Ouabagenin hervorgerufene. Der EC<sub>50</sub>-Wert liegt etwas höher und kann auch aus der geringeren Löslichkeit von Digitoxigenin resultieren. Auffällig ist jedoch der geringe Grad der Wirksamkeit gegenüber dem Palytoxin bei  $\alpha$ 2. Eine 29,3%ige Inhibition bei einem EC<sub>50</sub>-Wert von 34,5 µM zeigt eine im Vergleich zu  $\alpha$ 1 (81,6 %) und  $\alpha$ 3 (54,8 %) geringere Effektivität. Sowohl Oubagenin als auch Digitoxigenin zeigen also eine ausgeprägte isoformspezifische Affinität, nicht jedoch das Bufalin. Dies ist ein möglicher Hinweis, dass der fehlende Zuckerbaustein in Kombination mit einem 5er-Lactonring zu unterschiedlichen Affinitäten an den Isoformen führt.

Habermann (1989) arbeitete heraus, dass die Bindungsstellen für beide Substanzen nicht identisch sein können, da die Bindung von Ouabain durch ATP, Mg<sup>2+</sup>, und P<sub>i</sub> gefördert wird, nicht jedoch durch Ca<sup>2+</sup> oder Borat, so wie es beim Palytoxin der Fall ist. Er untersuchte die Hemmwirkung der Aglykone gegenüber dem Ptx-induzierten K<sup>+</sup>-Efflux im Vergleich zum jeweiligen Herzglykosid. Auch er fand, dass für Ouabagenin eine wesentlich höhere (50fache) Konzentration notwendig ist. Habermann schloss daraus, dass Aglykone eine höhere Dissoziationsrate haben als ihre Glykoside. Herzaktive Steroide, nicht jedoch ihre Aglykone, induzieren am Enzym eine Konformationsänderung und verringern somit die Affinität am Enzym.

Basierend auf dem Enzymmodell des Induced-fit werden hier weitere Überlegungen angestellt. Ein zu berücksichtigender Parameter ist die Interaktion des Palytoxin mit der Natriumpumpe. Dies führt zum bereits mehrfach geschilderten K<sup>+</sup>-Strom aus der Zelle heraus. Der zweite Parameter ist die Interaktion der Herzglykoside mit der Natriumpumpe. Herzglykoside stabilisieren die phosphorylierte Zwischenstufe der Natriumpumpe und blockieren somit den transmembranären Transport von Natrium und Kalium und die ATP-Hydrolyse (Hansen 1984). Und drittens der Einfluss, den ein herzaktives Steroid auf den Ptx-Effekt am Pumpenmolekül ausübt. Denkbar ist, dass die Angriffstellen beider Inhibitoren verschieden sind. Jedoch ändert sich durch die Hemmstoffes die Molekülkonformation Bindung des einen SO, dass die Bindungsstelle des anderen Hemmstoffes auch ihre Struktur ändert und die Interaktion mit seinem spezifischen Bindungspartner verändert wird (Allosterie-Modell).

Denkbar ist aber auch, dass die Bindungsstellen für Ptx und Herzglykoside zum Teil überlappen. Für diese Überlappungstheorie spricht, dass für Palytoxin, welches mit radioaktivem <sup>125</sup>Jod markiert ist, eine zum Ouabain fast identische Bindungsstelle gefunden wurde (Habermann 1989). Eine dieser Schnittstellen könnte das Zuckermolekül sein. Die hohe chemische Verwandtschaft der Polyole des Ptx und der Hydroxygruppen der Zucker könnten Hinweis sein für ein Bindungsmotiv, das beide Inhibitoren, die herzaktiven Steroide wie auch das Palytoxin, erfüllen. Entsprechend konkurrieren diese beiden Hemmstoffe der Natriumpumpe an diesem Motiv. Fehlt das Zuckermolekül, so gibt es keinen oder nur einen sehr kleinen Überlappungsbereich und die Hemmung ist weniger stark oder unterbleibt. Ozaki berichtet über seine Versuche mit Palytoxin an Roten Blutkörperchen (Osaki 1984). Vergleichend untersucht er den K<sup>+</sup>-Efflux in Gegenwart von Ouabain, Convallatoxin, Cymarin, Digoxin und Digitoxin und ihrer Aglykone. Da er durchweg keine Hemmung durch die Aglykone finden konnte, schloss auch er, dass der Zucker essentiell für die Hemmung ist.

Der Zucker könnte aber auch allosterisch die Bindungsstelle für Palytoxin verändern und ohne einen direkten Überlappungsbereich inhibitorisch wirksam sein. In einer weiteren Arbeit argumentiert Ozaki hinsichtlich der Struktur-Aktivitätsbeziehung der herzaktiven Steroide über die Assoziations- und Dissoziationskonstanten (Ozaki 1985). Die Assoziationskonstanten von Ouabain und Ouabagenin sind ähnlich, die Dissoziationskonstante für Ouabagenin ist jedoch um ca. 150fach höher. Dies spricht für zwei spezifische Bindungsstellen für die Anlagerung herzaktiver Steroide. Die erste Region bindet den Lactonring und das Steroidgerüst und bestimmt die Assoziationskonstante. Die zweite Region bindet das Zuckergerüst und bestimmt die Dissoziationskonstante. Für die zweite Region als zuckerbindender Bereich spricht auch, dass die Dissziationskonstante für Bis- und Triglykoside höher als die für Monoglykoside ist.

Eine weitere Gemeinsamkeit der beiden Inhibitoren der Natriumpumpe ist die Hemmung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität des Enzyms. Bei gleichzeitiger Gegenwart von Natrium- und Kaliumionen ist die Konzentration, bei der die maximale durch Natrium und Kalium stimulierbare Enzymaktivität gehemmt werden kann, für Palytoxin und Ouabain fast gleich. Wird die Kaliumkonzentration konstant gehalten, so zeigen beide Inhibitoren eine nicht-kompetitive Wirkungsweise auf die Natriumaktivierte ATPase-Aktivität. Wird jedoch die Natriumionenkonzentration konstant gehalten und der Gehalt der Kaliumionen schrittweise erhöht, dann zeigen sich Unterschiede zwischen Ptx und Ouabain. Palytoxin bewirkt einen kompetitiven Reaktionsmechanismus bei allen Kaliumkonzentrationen. Bei Kalium-Konzentrationen unterhalb von 10 mM wirkt Ouabain kompetitiv, bei Konzentrationen darüber tritt aber eine nicht-kompetitive Hemmung auf (Akera 1969, 1971; Ishida 1983).

Welche Schlüsse ergeben sich, wenn nicht über Bindungsstellen des Enzyms, sondern über Konformationszustände diskutiert wird?

Die herzaktiven Steroide wirken von der extrazellulären Seite und binden an die  $E_2$ -P-Konformation des Enzyms an (Wallick 1988). Es entsteht ein stabiler [ $E_2$ -P-Herzglykosid] Komplex, so dass die Dephosphorylierung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase gehemmt wird (Skou 1988).

Hinsichtlich des Konformationszustandes, an den das Ptx bindet, gibt es zwei verschiedene Auffassungen. Die Untersuchungen von Anner et al. 1994 stützen die These, dass das Ptx an die E<sub>1</sub>-Konformation bindet. Unter Anwesenheit von Rb<sup>+</sup> und ATP, welches die Pumpe in die E<sub>1</sub>-Konformation überführt, wird Ptx gebunden. In dieselbe Richtung weisen auch die Experimente mit radioaktiv markiertem Ptx. An Erythrocyten-Membranen wurde [<sup>125</sup>J]-Palytoxin unter Einfluß von Na<sup>+</sup> und ATP gebunden, unter Einfluss von Mg<sup>2+</sup> und P<sub>i</sub>, die die Pumpe in die E<sub>2</sub>-Konformation bringen, nicht (Bottinger, Beress et al. 1986). Scheiner-Bobis und Schneider fanden heraus, dass die Ausbildung des Ionenkanals durch Palytoxin unabhängig von einer Enzymphosphorylierung geschieht (Scheiner-Bobis and Schneider 1997).

Vanadat ist in der Lage, die Natriumpumpe zu hemmen, wenn es intrazellulär und das Enzym als E<sub>2</sub>-Intermediat vorliegt (Skou 1988). Aufgrund der Tatsache, dass Vanadat auch den Ptx-Effekt hemmen kann, genau so, wie es das Ouabain tut, und weil das Ouabain an der E<sub>2</sub>-Konformation anbindet, schließen Tosteson et al, dass die Interaktion von Ptx ebenfalls in der E<sub>2</sub>-Konformation vonstatten geht. (Artigas and Gadsby 2003) zeigten, dass MgATP, MgADP und das nicht hydrolysierbare MgAMPPNP die Öffnungswahrscheinlichkeit des Ptx-induzierten Kanals erhöht (Artigas und Gadsby 2003). Sie nehmen an, dass dies über die niedrig-affine ATP-Bindungsstelle geschieht. Und die niedrig-affine ATP-Bindungsstelle ist die, bei der die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in der E<sub>2</sub>-Konformation vorliegt. Auch Wang and Horisberger (1997) vertreten die These einer Bindung des Ptx an die E<sub>2</sub> oder eine E<sub>2</sub> ähnliche Struktur des Enzyms (Wang and Horisberger 1997).

Die Ergebnisse der Untersuchungen an den Mutanten aus dem ersten Teil dieser Arbeit könnten als weitere Unterstützung der These, dass Palytoxin an die  $E_1$ -Konformation bindet, angesehen werden. Der Verlust der Kaliuminteraktion und einer verringerten Ouabainaffinität sowie einer erhöhten Natriumaffinität legen nahe, dass das Konformationsgleichgewicht zu  $E_1$  hin verschoben wurde. Dabei zeigten die Mutanten durchweg eine hohe Interaktion mit Palytoxin.

Interessant ist die zeitliche Komponente im Zusammenwirken von Ptx und Herzglykosid. Einerseits bindet Ouabain langsamer an die Natriumpumpe der Erythrocyten als Palytoxin (Habermann und Chatwal 1982), (Böttinger 1986). Andererseits ist der K<sup>+</sup>-Efflux weniger stark, wenn zuerst das herzaktive Steroid und erst dann das Palytoxin verabreicht werden (Sauviat et al. 1987). Würde Ptx an E<sub>1</sub> binden, so könnte die zeitlich frühere Bindung von Ouabain das Enzym in die E<sub>2</sub>-Form dirigieren. Die präferierte Konformation für das Ptx läge nicht vor und somit würde der Effekt von Ptx unterbunden. Es könnte aber auch sein, dass beide Inhibitoren an E<sub>2</sub> binden und aufgrund der teilweise überlappenden Bindungsstellen die zeitlich frühere Bindung von Ouabain die Bindungsstelle für Ptx besetzt hält.

Weitere Untersuchungen zu diesem Sachverhalt sind nötig, um eine endgültige Aussage treffen zu können.

Zusammenfassend gesprochen drängen Herzglykoside den durch Palytoxin ausgelösten Ausstrom der Kaliumionen zurück und zwar mit unterschiedlich großem Erfolg. Die Unterschiede zwischen Herzglykosiden mit einem 5er- oder 6er-Lactonring sind nur geringfügig und können z.T. auch durch unterschiedlich gute Wasserlöslichkeiten hervorgerufen sein.

Diese Arbeit unterstützt die These, dass die Zuckereinheit der Herzglykoside eine wesentliche Rolle für ihre Hemmung gegenüber Palytoxin spielt. Ouabagenin hebt sich von allen anderen untersuchten Inhibitoren ab, da es bei allen drei Isoformen eine geringe Hemmwirkung zeigt, sehr ausgeprägt v.a. bei  $\alpha$ 2. Die Untereinheit  $\alpha$ 2 ist auch diejenige Isoform, die gegenüber den anderen Glykosiden, die in dieser Arbeit verwendet wurden, ein anderes Verhalten zeigt. Einen gewissen Einfluss mag das geringere Expressionsniveau dieser Mutante haben. Müller-Ehmsen et al. beschreiben eine geringere Stabilität von Membranen mit der  $\alpha$ 2 $\beta$ 1-Kombination, die zu einem geringeren Level an funktionsfähigem Protein geführt hat (Müller-Ehmsen et al. 2001). Der K<sub>D</sub>-Wert für Ouabain und auch für Methyldigoxin ist für  $\alpha$ 2 etwa 3mal
so hoch wie für  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 3. Weitere Literaturstellen zeugen von einer möglichen Sonderrolle von  $\alpha$ 2. So haben Messungen an *Xenopus* Oocyten eine höhere Sensitivität der extracellulären Na<sup>+</sup>-Bindungsstelle bei der  $\alpha$ 2-Isoform der Ratte gezeigt als bei  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 3 (Horisberger 2002).

Mit der Röntgenkristallographie der sarkoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) gelang Toyoshima ein wichtiger Schritt in der Aufklärung der Struktur der P-Typ-ATPasen (Toyoshima 2000). Die Erkenntnisse aus der Strukturanalyse der Calciumpumpe sollen auf die Natriumpumpe übertragen werden, um die Frage zu untersuchen, ob der Palytoxin-induzierte Kanal in der Na+,K+-ATPase das Ionophor der Pumpe darstellt, welches in permanent-offener Form arretiert wird.

Daher wurde ein Teilbereich von 42 Aminosäuren vergleichend zwischen Mitgliedern der P-Typ-ATPasen betrachtet, in dem 4 Aminosäuren zu finden sind, die in der SERCA an der Ionenkoordination beteiligt sind. Dieser Aminosäureabschnitt umfasst die Transmembranhelices M5 und M6. Auch hier ergibt der Vergleich von Natriumpumpe und gastrischer Protonenpumpe eine Homologie von 82 %. Jedoch weist weder der Vergleich der Natriumpumpe zur Calciumpumpe, noch der Vergleich der Protonenpumpe zur Calciumpumpe, eine signifikante Homologie auf. Dass diese vier hier aufgeführten Aminosäuren für die Natriumpumpe wichtig sind, wird dadurch ersichtlich, dass sie durchweg bei allen Spezies und allen Isoformen hochkonserviert sind (siehe Tab. 10).

Welches sind die korrespondierenden Aminosäuren in der Natriumpumpe? Es handelt sich um Glu779, Asn776, Asp804 und Asp807.

Der Glutamatrest an Position 771 ist mit Ausnahme der Calciumpumpe der Plasmamembran hochkonserviert. Dort befindet sich ein neutraler Alaninrest. Die Bedeutung dieser Ausnahme ist bisher noch nicht bekannt. Einzelmutationen an Glu771 führten zum Verlust der kooperativen Bindung der Calciumionen (Inesi, Ma et al. 2003). Die der zur Natriumpumpe korrespondierenden Aminosäure Glu779 beobachteten Reaktionsweisen weisen dahin, dass diese Aminosäure den Zugangsbereich für extracelluläre Ionen bildet und weniger direkt in den Transport, sondern wahrscheinlich in die Verknüpfung der extracellulären Kaliumbindung mit der anschließenden Dephosphorylierung eingebunden ist (Arguello, Peluffo et al. 1996; Koster, Blanco et al. 1996).

95

Der Asparaginrest 768 ist innerhalb der Calcium, Natrium- und Protonenpumpen hochkonserviert (siehe Tabelle 10). Diese Aminosäureposition war noch nicht Gegenstand vieler Untersuchungen. Die Datenlage spricht dafür, dass Asn768 an der Kopplung der Ionenbindung beteiligt sein könnte.

Eindeutige Abweichungen treten an der Position 796 auf. In den Calciumpumpen von Sarkoplasma und Plasmalemma ist ein Asparaginrest hochkonserviert., nicht jedoch in den Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATpasen und H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasen. Hier weisen die Protonen- wie die Natriumpumpen jeweils eine saure Carboxylgruppe auf; sei es ein Glutamat bei den gastrischen H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasen oder ein im Vergleich dazu um einen Methylrest kürzeres Aspartat bei nichtgastrischer H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase und Natriumpumpe. Die nicht-konservative Mutation des Asn796 zu Alanin in der Calciumpumpe führte zum Verlust der kooperierenden Bindung des Calciums (Inesi, Ma et al. 2003).

Ca<sup>2+</sup>-ATPasen besitzen an der Position 796 einen neutralen Rest. Bei der Natriumpumpe ebenso wie bei den Protonenpumpen finden sich Carboxylgruppen. Die negative Ladung an Position 796 hat vermutlich eine koordinierende Funktion für das Kalium. Denn im Gegensatz zur Calciumpumpe, bei der vermutlich ein Gegentransport von H<sup>+</sup>-Ionen stattfindet, sind die Natrium- und die Protonenpumpen Countertransporter, bei denen Kalium ausgetauscht wird (Geering 2001). Unterstützt wird diese These dadurch, dass die H<sup>+</sup>-ATPasen von Hefen und Pilzen an dieser Stelle einen neutralen Alaninrest tragen.

Ein einheitliches Bild ergibt sich für die Aminosäure Asp800. Alle korrespondierenden Positionen in Natrium- und Protonenpumpen sind mit einem Aspartatrest besetzt.

Das Asp804 bzw. das Asp807 der Natriumpumpe, welches dem Asn796 bzw. Asp800 in der Calciumpumpe entspricht, scheint wichtig zu sein für die Interaktion der Natriumpumpe mit den Kaliumionen (Kuntzweiler, Arguello et al. 1996; Pedersen, Rasmussen et al. 1997; Koenderink, Swarts et al. 2000; Jorgensen P.L. 2002).

Zu weiteren Erkenntnissen hinsichtlich ihrer Bedeutung wurden diese Aminosäuren punktuell mit Hilfe der oligonukleotidbasierten Mutagenese, einem der PCR entlehnten Verfahren, ausgetauscht.

Der Glutamatrest an Position 779 wurde durch den Austausch gegen Aspartat formell um eine Methylgruppe verkürzt und das hochkonservierte Asparagin 776 wurde in ein Isoleucin mutiert. Da die zum Asp804 korrespondierende Position in der Calcium-ATPase einen Asparaginrest trägt, wurde hier der Austausch Asparat gegen Asparagin vorgenommen. Das hochkonservierte Aspartat 807 wurde hinsichtlich der Ladung durch Einbau eines Glutamatrestes respektive Alaninrestes verändert. Das mutierten Protein wurde dann heterolog in der Hefe Saccharomyces cerevisiae exprimiert.

Die Arbeiten von McDonough et al. (1990) und Scheiner-Bobis et al. (1994) stellen deutlich heraus, dass als Voraussetzung für die Interaktion der Natriumpumpe mit Ptx die gleichzeitige Expression von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit notwendig ist. Die Detektion mit spezifisch gegen die humane  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheit der Natriumpumpe gerichteten Antikörpern zeigt die erfolgreiche Expression beider Untereinheiten für die in dieser Arbeit verwendeten Mutanten.

Weitere Aussagen zu den Eigenschaften der Mutanten erlaubt der maximal durch Palytoxin erzielbare Kaliumefflux relativ zum Gesamtkaliumgehalt der Zelle. Er gibt Aufschluss über das Expressionsniveau der Natriumpumpe in der Hefe. Der Kaliumefflux kann nie 100% betragen, da er einen steady-state Zustand widerspiegelt. Ein Plasmamembranprotein der Hefen schleust die K<sup>+</sup>-Ionen wieder in die Zelle ein und wirkt so dem Palytoxineffekt entgegen (Scheiner-Bobis and Schneider 1997). Bei der Mutanten Glu779Asp (90,30 ± 1,56 %) respektive Asp804Asn (92,55 ± 2,21 %) wurden dem Wildtyp (92,21 ± 2,4 %) vergleichbare maximale K<sup>+</sup>-Effluxe gemessen. Folglich sind die Expressionsniveaus nicht unterschiedlich. Eine niedrigere Expressionsrate zeigen jedoch die Hefezellen, die die Mutationen Asn776lle (82,32 ± 1,92 %), Asp807Gln (80,93 ± 1,01 %) und Asp807Ala (76,31 ± 0,45 %) tragen.

Die Konzentration, bei der der halbmaximale Efflux von Kaliumionen beim Wildtyp beobachtet werden konnte (EC<sub>50</sub>-Wert) betrug 7,34  $\pm$  1,67 nM. Für die Mutante Asp807Ala können zwei Aussagen zutreffen. Zum einen lässt der im Vergleich mit dem Wildtyp (7,34  $\pm$  1,67 nM) fast unveränderte EC<sub>50</sub>-Wert von 3,62  $\pm$  2,82 nM den Schluss zu, dass die Mutation kaum einen Einfluss auf die Interaktion mit Ptx hat. Es muss allerdings auch berücksichtigt werden, dass der EC<sub>50</sub>-Wert durch das niedrigere Expressionsniveau der Mutante zustande kommen kann. Bei niedrigem Expressionsniveau, also einer geringeren Zahl von Pumpenmolekülen pro Oberflächeneinheit der Hefezelle, können die kaliumtransportierenden Systeme der

Hefe pro Zeiteinheit dem Kaliumverlust effektiver entgegenarbeiten und die Verlustrate einschränken. Oder umgekehrt gesprochen: Die Konzentration an Ptx, mit der der halbmaximale Efflux erzielt wird, wird vermutlich höher bei niedrigerem Expressionsniveau.

Auffällig für die Mutationen an den Positionen 776, 804 und die Mutante Asp807Gln ist eine ausgeprägte Linksverschiebung der K<sup>+</sup>-Efflux-Kurve. Etwa um eine Zehnerpotenz niedriger im Vergleich zum Wildtyp (7,34 ± 1,67 nM) liegen die EC<sub>50</sub>-Werte der Hefezellen, die die Mutationen Glu779Asp (0,81 ± 0,08nM), Asn776lle (0,43 ± 0,10nM), Asp804Asn (0,68 ± 0,30nM), Asp807Gln (0,28 ± 0,05nM) tragen. Das heißt, dass das Palytoxin in der Lage ist, bei geringerer Konzentration als beim Wildtyp zu wirken. Der EC<sub>50</sub>-Wert für Palytoxin hängt nämlich nicht nur davon ab, welches Expressionsniveau das Proteinmolekül hat, sondern auch, wie gut das Toxin mit dem Enzymmolekül interagieren kann.

Scheiner-Bobis und Meyer zu Heringdorf fanden heraus, dass es das Ionophor der Pumpe ist, mit dem das Palytoxin interagiert (Scheiner-Bobis, Meyer zu Heringdorf et al. 1994). Mutationen von Glutamat 953 und Glutamat 954, von denen bekannt ist, dass sie nicht wichtig sind für die Ionenerkennung, zeigten keinen veränderten K<sup>+</sup>-Efflux im Vergleich zum Wildtyp unter Einwirkung von Palytoxin.

Die um eine Zehnerpotenz niedrigeren  $EC_{50}$ -Werte für die Mutationen an Position 779, 776, 800 und 807 lassen den Schluss zu, dass die Aminosäuren Glu779, Asn776, Asp804, Asp807 an der Ausbildung der ionophoren Struktur der Natriumpumpe beteiligt sind und/oder, dass die oben genannten Aminosäuren jeweils von der Palytoxinbindung beeinflußt sind.

Zwei Elemente scheinen einen etwa gleich starken Effekt zu haben: Kettenlänge und die Ladung der Aminosäure. Durch eine Verkürzung der Seitenkette der Aminosäure 779 um eine Methylgruppe sinkt die Konzentration, mit der der halbmaximale Kaliumefflux beobachtet werden kann, um eine Nachkommastelle im Vergleich zum Wildtyp. Auch der nicht-homologe Austausch des neutralen Restes von Asparagin an Position 776 gegen das sehr hydrophobe Isoleucin bewirkt eine Linksverschiebung der Effluxkurve. Der Wegfall der negativen Ladung der Aminosäure 804 beim Austausch von Aspartat gegen Asparagin erhöht die Sensitivität der Natriumpumpe gegenüber Palytoxin.

Interessant ist die Position 807. Wichtiger als die Ladung des Moleküls scheint hier die Länge der Seitenkette zu sein. Denn beim Ersatz der negativen Ladung, die das

98

Aspartat physiologischerweise trägt, gegen einen neutralen Alaninrest zeigt sich kaum eine Veränderung des halbmaximalen Kaliumeffluxes. Wird jedoch das Aspartat verändert, indem es um eine Methylgruppe verlängert wird und gleichzeitig die Ladung wegfällt, so kann schon eine 10fach geringere Palytoxinkonzentration wirksam sein. Entweder wird durch die Mutationen die ionenleitende Struktur so verändert, dass die Ionen "ungehinderter" durch den Kanal fließen können oder die Mutationen modifizieren die Bindungsstelle beziehungsweise begünstigen die Konformation, an die das Palytoxin andockt.

Die in dieser Arbeit angefertigten Mutationen resultieren aus dem Vergleich von Natrium- und Calciumpumpe. Die zu den in der Calciumpumpe homologen Aminosäuren in der Natriumpumpe, die für die Ionenkoordination relevant sind, wurden selektiv mutiert. Interessant war daher, die Fähigkeit dieser Mutanten im Hinblick auf ihre Selektivität gegenüber Calcium zu untersuchen. Da es das Ionophor der Natriumpumpe ist, mit dem das Palytoxin interagiert (Scheiner-Bobis, Meyer zu Heringdorf et al. 1994), können durch die Untersuchung der Interaktion mit Palytoxin Aussagen zur Ionenselektivität getroffen werden.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass der durch Palytoxin ausgebildete Ionenkanal eine gewisse Selektivität beibehält (Habermann, Hudel et al. 1989; Redondo, Fiedler et al. 1996; Artigas and Gadsby 2003). Wenn Hefezellen, die den Wildtyp der humanen Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase exprimieren, in Gegenwart von Kalium und Calcium statt Natrium inkubiert werden, welches ja physiologisch von der Natriumpumpe als Substrat erkannt wird, dann fließt Kalium im Austausch gegen Calcium. Der beobachtete relative Kaliumefflux erlaubt dann eine Aussage über die Selektivität des Ionophores gegenüber Calcium.

Daher wurden Hefezellen mit den Mutanten Asn776lle, Asp804Asn und Asp807Gln in Gegenwart von extracellulärem Calcium anstelle von Natrium mit Palytoxin inkubiert und der maximal erzielbare K<sup>+</sup>-Efflux sowie der EC<sub>50</sub>-Wert bestimmt. Für den Wildtyp waren 12,68 ± 0,38% Kalium relativ zum Gesamtkalium aus den Zellen herausgeströmt. Der halbmaximalen Efflux bei einer zeigte sich Palytoxinkonzentration von 700,4 ± 3,7 nM. Dem steht ein maximaler Efflux von 23,35  $\pm$  5,95% und ein EC<sub>50</sub>-Wert von 333,7  $\pm$  17,9 nM bei der Mutation Asn776lle gegenüber. Das heißt zum einen, dass das Expressionsniveau der Mutanten höher im Vergleich zum Wildtyp gewesen war, zum anderen aber auch, dass die Interaktion

mit dem Palyotxin effizienter ist, da schon bei einer halb so hohen Ptx-Konzentration der halbmaximale Ionenflux stattfindet. Bei der Mutation an Position 804, bei der das ursprüngliche Aspartat gegen das in der Calciumpumpe vorhandene Asparagin ausgetauscht wurde, lag der maximale Kaliumefflux ( $35,45 \pm 1,85$  %) etwa 3mal so hoch verglichen zum Wildtyp ( $12,68 \pm 0,38$ %) und der EC<sub>50</sub>-Wert etwas niedriger ( $558, 6 \pm 11,3$  nM gegenüber 700,4  $\pm 3,7$  nM). Und auch beim Ersatz Aspartats an Position 807 durch das um eine Methylgruppe längere Glutamin, führt zu einer - hier sehr deutlichen- Erhöhung des relativen Kalium-Ausstroms und einer Halbierung der Ptx-Konzentration, bei der der halbmaximale Kaliumausstrom beobachtbar ist. Dies kann bedeuten, dass sowohl das Expressionsniveau als auch die Affinität zum Palytoxin höher ist. Dies steht in Übereinstimmung zu den Untersuchungen in Gegenwart von Natrium. Die Veränderung der Seitenkette macht offensichtlich den durch Ptx induzierten Kanal etwas durchlässiger für Calcium.

Zur näheren Charakterisierung des an der Mutanten Asn776lle ausgeprägten Kanals durch Ptx wurde der Kaliumefflux in Gegenwart von weiteren zweifach positiv geladenen Ionen untersucht. Bei der Analyse mit Bariumionen konnte sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutante ein hoher Kaliumefflux (95% respektive 94%) gemessen werden. Im Vergleich zu den Experimenten, bei denen Natrium als Austauscher-Ion zugegen war, ist die Kurve des Kaliumausstromes deutlich nach rechts verschoben. Die EC<sub>50</sub>-Werte liegen bei 94,28  $\pm$  0,12 nM beim Wildtyp und  $196,60 \pm 0,15$  nM bei der Mutanten Asn776lle. Das ist beim Wildtyp eine mehr als 10mal höhere Konzentration, die für Natriumionen notwendig und sogar eine mehr als 400-fache Konzentration bei der Mutanten. Dies lässt schlussfolgern, dass der durch Palytoxin ausgeformte Ionenkanal für die Bariumionen, die im unhydratasierten Zustand größer sind als die Natriumionen (134 pm versus 97pm), nur sehr wenig durchlässig ist, noch weniger durchlässig in der Mutanten verglichen mit dem Wildtyp. In Anwesenheit von Magnesiumionen konnte kein relevanter K<sup>+</sup>-Efflux gemessen werden. Magnesiumionen sind im unhydratasierten Zustand kleiner (66pm) als Barium (134 pm), Natrium (97 pm) und Calcium (99 pm). Auch in den in dieser Arbeit eingesetzten Mutanten scheint der Ptx-induzierte Kanal eine Selektivität beibehalten zu haben.

Wäre die Ionenpermeabilität des Ptx-induzierten Kanals alleine eine Funktion der Ionengröße, so wäre zu erwarten gewesen, dass das kleinste der hier aufgeführten Ionen am besten hindurchfließen könnte. Schon Habermann und Tosteson zeigten, dass der an der Natriumpumpe durch Ptx induzierte Kanal einen geringen Permeabilitätsunterschied für verschiedene Ionen hat (Habermann 1989; Tosteson et al 1991). Die Leitfähigkeit nimmt dabei von Kalium über Rubidium zu anderen Erdalkali-Ionen ab und ist sehr schlecht für divalente Kationen wie Mg<sup>2+</sup> und Ba<sup>2+</sup>. Redondo et al. (1995) argumentierten, dass nicht alleine die Größe und Ladung signifikante Parameter für die Ionenflüsse sein können. Berücksichtigt werden muss indes auch der Grad der Hydratasierung der Ionen, durch die sich der effiziente Durchmesser der Ionen relativ zueinander verschiebt (Redondo et al. 1995). Bislang noch ungeklärt ist, in welchem Zustand, d.h. in welchem Maße hydratasiert, die Ionen die Membran permeieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die These eines selektiven Ionenkanals, wie ihn das Palytoxin bei der Natriumpumpe und ihren Mutanten auslöst. Dabei spielen nicht nur Größe, Ladung und Hydratationsgrad der permeierenden Ionen eine Rolle. Es kristallisiert sich zunehmend heraus, dass nicht einzelne Aminosäuren alleine eine Funktion ausüben, sondern übergeordnete Strukturen Motive bilden, die die Funktionsfähigkeit der P-Typ-ATPasen erlauben. Daher muss berücksichtigt werden, dass durch die Veränderung einer einzelnen Seitenkette innerhalb der ionenleitenden Struktur auch die relative Lage der Pumpenabschnitte zueinander verändert und das hochregulierte Zusammenspiel aller Abschnitte der Natriumpumpe gestört wird.

Der durch Palytoxin induzierte Kaliumefflux kann durch das Ouabain gehemmt werden. Dieses beobachteten Ishida et al. und Habermann et al. erstmals an glatten Muskelzellen bzw. Erythrocyten. Das Ausmaß der Hemmung ist dabei abhängig von der relativen Affinität der Natriumpumpe und ihrer Mutanten für Ouabain (Ishida et al. 1981, 1982 und Habermann et al. 1982). Die Messungen an der nativen Natriumpumpe zeigten, dass der in Gegenwart von 75 nM Palytoxin erzielte Kaliumausstrom um 82,3% durch Ouabain gehemmt werden konnte. Die Konzentration, bei der die halbmaximale Hemmung erzielt wird (EC<sub>50</sub>-Wert), beträgt 5,79 ± 0,81  $\mu$ M Ouabain. Eine deutlich geringere Hemmwirkung des Ouabains zeigt die Membranpräparation an der homologen Mutation Glu779Asp. Die Kurve verläuft hier sehr flach und der Kaliumefflux kann nur um 37,2 % gehemmt werden. Der EC<sub>50</sub>-Wert hingegen ist zum Wildtyp vergleichbar.

Beim Austausch des Asparagins gegen Isoleucin an Position 776 verdreifacht sich der Wert für die Palytoxinkonzentration, bei der der halbmaximale K<sup>+</sup>-Efflux erzielt wird, und die Hemmwirkung des Ouabains ist auf ca. 32 % reduziert.

Nicht ganz so deutlich, aber dennoch auffällig, ist auch die Reduktion des Ouabaineffektes an Membranen der Mutation Asp804Asn. Hier beträgt die maximale Hemmung noch 55,4 %.

Kaum Einflüsse auf die Palytoxin-Ouabain-Interaktion scheint der Austausch von Aspartat gegen Alanin an der Position 807 zu haben, wurden doch sehr ähnliche Werte zum Wildtyp gefunden. Der Ersatz des Aspartats gegen Glutamin an Stelle 807 führt aber zu einer verminderten Fähigkeit des Ouabains, den Ptx-induzierten Kaliumefflux zu hemmen. Die EC<sub>50</sub>-Werte sind etwa 2- bis 3-fach gegenüber dem des Wildtyps erhöht und der Kaliumefflux kann nur etwa zu einem Drittel durch Ouabain verringert werden.

Erniedrigte EC<sub>50</sub>-Werte und verringerte Hemmwirkungen des Ouabains können bedingt sein durch erhöhte Affinität der Mutanten gegenüber Ptx oder eine verringerte Affinität gegenüber Ouabain. Für die höhere Affinität des Ptx sprechen die sehr niedrigen Ptx-Konzentrationen, die ausreichend sind, um den halbmaximalen K<sup>+</sup>-Efflux an den Mutanten zu erzielen. Die Affinität kann leider nicht direkt bestimmt werden, weil kein radioaktives Palytoxin für Verdrängungsversuche zur Verfügung steht.

Wohl aber lässt sich die Dissoziationskonstante ( $K_{0,5}$ ) für Ouabain durch Verdrängung von Tritium-markiertem Ouabain mit kaltem Ouabain bestimmen. Für den Wildtyp beträgt der  $K_D$ -Wert 44,51 ± 9,69 nM. Für die Mutationen Glu779Asp konnte keine Dissoziationskonstante bestimmt werden. Da die Ermittlung der Dissoziationskonstanten für Ouabain in Gegenwart von Magnesiumionen und anorganischem Phosphat durchgeführt wird, könnte eine verringerte Fähigkeit der Mutante zum Übergang vom unphosphorylierten in den phosphorylierten Zustand vorliegen. Arguello et al. fanden bei Substitution des Glutamats 779 durch Alanin eine verringerte Phosphorylierung in Anwesenheit von ATP,  $Mg^{2+}$  und Na<sup>+</sup> (Arguello et al. 1996). Gleichzeitig war eine von Kalium unabhängige Na<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität messbar. Natrium kann hier offenbar das Kalium ersetzen. Verschiedene Arbeitsgruppen ersetzten das Glutamat 779 durch Aspartat, Alanin und Lysin (Koster, Blanco et al. 1996). Auch diese Mutationen verringerten die Affinität des Enzyms zum

Kalium. Sowohl Arguello als auch Koster sehen die Aufgabe des Glutamats 779 in der Verbindung der extrazellulären lonenbindung mit der anschließenden intrazellulären Dephosphorylierung des Enzyms.

Unter den experimentiellen Bedingungen für die Verdrängung des radioaktiven Ouabains durch unmarkiertes konnte für Asn776lle keine Konstante bestimmt werden.

Bei den Mutanten Asp804Asn und Asp807Gln liegt die Dissoziationskonstante doppelt beziehungsweise 4fach so hoch wie beim Wildtyp, d.h. ihre Ouabainaffinität ist geringer als beim Wildtyp. Eine etwas höhere Affinität als der Wildtyp zeigt die Mutante Asp807Ala mit einem K<sub>D</sub>-Wert 10,70  $\pm$  20,3 nM. Die Ergebnisse aus den Bindungsstudien lassen also auch wie die Daten aus der Hemmung des Ptx-induzierten K<sup>+</sup>-Efflux durch Ouabain den Schluss zu, dass die hier betrachtenden Mutanten mit Ausnahme von Asp807Ala eine geringere Ouabainbindung aufweisen als der Wildtyp. Die Bindung des Ouabains erfolgt an die E<sub>2</sub>-P-Konformation des Enzyms. Möglicherweise heißt dies, dass die eingeführten Veränderungen an den Seitenketten dazu führen, dass die mutierten Enzymmoleküle weniger gut in die E<sub>2</sub>-P-Konformation überführt werden können. Oder anders gesprochen, dass sich das Equillibrium zugunsten von E<sub>1</sub> verschoben hat.

Wenn dies der Fall wäre, müsste theoretisch die Interaktion der Mutanten mit Kalium verringert sein, da es an die E<sub>2</sub>-Konformation bindet. Kalium-Ionen dephosphorylieren die Natriumpumpe und verdrängen somit das Ouabain. Bei einer maximalen Ouabainbindung von 1,50  $\pm$  0,21 pmol/mg Protein beträgt der EC<sub>50</sub>-Wert für die Verdrängung des Ouabains durch Kalium 1,25  $\pm$  0,11 mM. Aufgrund der niedrigen Affinität der Glu779Asp zu Ouabain konnte diese Untersuchung hier nicht durchgeführt werden.

Für die Mutante Asn776lle wurde ein etwa 4fach niedriger  $EC_{50}$ -Wert als in der nativen Natriumpumpe bestimmt. Asn776lle scheint ihre Kaliumsensitivität erhöht zu haben. Diese Daten sind jedoch wegen der geringen Ouabainbindungsfähigkeit von 0,23 ± 0,20 pmol/mg Protein mit Vorsicht zu interpretieren.

Bei der Mutanten Asp804Asn konnte eine Ouabainbindung von 0,65  $\pm$  0,20 pmol/mg ermittelt werden. Das Kalium zeigte hier keinen Verdrängungseffekt, d.h dass die

103

Mutante praktisch keine Affinität zu Kalium hat. Dies bestätigt die Daten von (Kuntzweiler, Arguello et al. 1996), bei denen Kalium nicht in der Lage war an Mutanten der  $\alpha$ 1-Untereinheit des Schafes Ouabain zu verdrängen.

In ähnlicher Größenordnung wie beim Wildtyp bewegen sich die Daten zur Mutanten Asp807Ala hinsichtlich der Ouabainbindung (1,52  $\pm$  0,026 pmol/mg Protein), die Affinität für Kalium scheint hingegen leicht höher zu sein (EC<sub>50</sub> = 0,74  $\pm$  0,02 mM). Das steht im Gegensatz zu den Daten von Kuntzweiler und Arguelloet al., die beim Ersatz des Aspartates durch Alanin keinen Kalium- Antagonismus messen konnten (Kuntzweiler, Arguello et al. 1996).

Der homologe Ersatz des Aspartates durch Glutamin an Position 807 verringert die maximale Ouabainbindung auf 0,94  $\pm$  0,11 pmol/mg Protein, und erhöht den EC<sub>50</sub>-Wert auf 17,04  $\pm$  0,890 mM. Neben einer verminderten Affinität für Ouabain zeigt die Mutante somit auch eine herabgesetzte Kaliumaffinität. Dies ist umso stärker zu bewerten, als es theoretisch für die Kaliumionen einfacher sein sollte, Ouabain aus einer schwachen Bindung zu verdrängen.

Der Verlust der negativen Ladung an Position 807 hat offensichtlich für die Kaliumkoordination einen geringeren Effekt als die Geometrie, deren Verlust sehr stark die Kaliumaffinität reduziert.

Unter physiologischen Bedingungen wird das Natrium aus der Zelle heraus transportiert, indem das Enzym durch ATP phosphoryliert wird. Die Bindung von Ouabain kann in Anwesenheit von ATP als Funktion der Na<sup>+</sup>-Konzentration gemessen werden und spiegelt somit die Affinität des Natriums zum Enzym wider. Bei der nativen Natriumpumpe wird ein K<sub>0,5</sub>-Wert von 0,042 ± 0,046 mM ermittelt.

Asp807Glu hat einen  $K_{0,5}$ -Wert von 0,012 ± 0,0234 mM. Eine Änderung der Seitenkette an Position 807 bewirkt eine leichte Erhöhung der Natriumaffinität.

Bei der Asp804Asn-Mutante beträgt diese Konstante  $0,0027 \pm 0,027$  mM. Offensichtlich fördert der Wegfall der positiven Ladung und/oder die Verlängerung der Seitenkette die Affinität für Natrium deutlich.

Auffallend niedrig ist der K<sub>0,5</sub>-Wert für Natrium bei der Mutanten Asn776lle mit 1,0 \*  $10^{-7} \pm 0,0449$  mM. Die Variation der Seitenkette scheint einen deutlichen Einfluss auf die Interaktion mit Natrium zu haben und die Natriumaffinität zu erhöhen. Allerdings muss hier die ohnehin sehr niedrige Ouabainbindung berücksichtigt werden.

Beim Austausch von Aspartat gegen Glutamat an der Stelle 807 liegt der  $K_{0,5}$ -Wert für Calcium (0,426 ± 0,0202 mM) wesentlich höher als beim Natrium (0,012 ± 0,0234 mM). Auch die Asp804Asn-Mutante hat im Vergleich zum Natrium bei Calcium eine mehr als 16-fach höhere Bindungs-Konstante. Der  $K_{0,5}$ -Wert für den Wildtyp konnte nicht bestimmt werden. Die Ouabainbindungskurve verläuft zunächst ansteigend, fällt dann aber wieder ab. Möglicherweise kann bei einer niedrigen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration vorübergehend ein instabiler Enzym-Ionenkomplex ausgebildet werden, bei höheren Calciumkonzentrationen jedoch nicht mehr. Der Austausch des Aspartats der nativen Natriumpumpe gegen ein Asparagin, welches in der nativen Calciumpumpe an der korrespondierenden Stelle auftritt, hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Calciumerkennung.

Neben der Phosphorylierung und Dephosphorylierung ist der Ionentransport eine der enzymatischen Aktivitäten der Natriumpumpe. 2 Kaliumionen werden in das Innere der Zelle im Austausch gegen 3 Natriumionen transportiert. Hefezellen, aus denen mittels SDS Membranen extrahiert werden, die die native oder mutierte Natriumpumpe tragen, dienen als Werkzeug zur Bestimmung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Aktivität. Sie ist durch den Anteil der Gesamt-ATPase-Aktivität, der durch Ouabain hemmbar ist, repräsentiert (Horowitz, Eakle et al. 1990).

Beim Wildtyp beträgt der Ouabain-hemmbare Anteil 5,86  $\pm$  0,73 mU/mg Protein. Für alle Mutanten liegt der Wert viel niedriger (Glu779Asp (0,78  $\pm$  2,05 mU/mg Protein), Asn776lle (1,50  $\pm$  0,30 mU/mg Protein), Asp804Asn (3,01  $\pm$  0,58 mU/mg Protein) und Asp807Ala (2,55  $\pm$  0,53 mU/mg Protein). SDS-extrahierte Mikrosomen mit der Mutation Asp807Glu zeigten praktisch keine messbare Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität (0,00  $\pm$  0,30 mU/mg Protein). Diese Ergebnisse werden durch Daten aus der Literatur bestätigt. Vilsen berichtet eine partielle Reduktion bei der Mutanten Glu779Ala (Vilsen 1995). Substitutionen bei Asp804 und Asp807 führten zu Mutanten, die nur eine geringe oder gar keine Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität aufwiesen (Kuntzweiler, Arguello et al. 1996; Pedersen, Rasmussen et al. 1997).

Erklärbar ist dies zum Teil durch die niedrige Ouabainaffinität der Mutanten, da die gemessene ATPase-Aktivität aus der Differenz von zwei Messwerten resultiert. Zum einen aus der Gesamt-ATPase-Aktivität der Membranpräparation, zu der auch die endogenen Hefeproteasen beitragen und zum anderen der ATPase-Aktivität, die durch Ouabain hemmbar ist. Bei niedriger Ouabainaffinität bleibt der letztere Wert groß gegenüber der Gesamt-ATPase und die Differenz wird sehr klein.

Die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Aktivität der untersuchten Enzyme kann aber auch tatsächlich im Vergleich zum Wildtyp geringer sein. Der gekoppelte Transport von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> setzt die Fähigkeit des Enzyms zur Konformationsänderung voraussetzt. Die Mutanten der Positionen 779, 776, 804 und 807 können jedoch scheinbar weniger gut in die E<sub>2</sub>-Konformation wechseln. Hinsichtlich der Aspartate 804 und 807 sprechen die Daten von Kuntzweiler und Arguello gegen diese Annahme. Mutationen zu Alanin, Asparagin und Glutamat zeigten keine veränderten Ouabainaffinitäten und auch keine verringerten Fähigkeiten zur E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub>-Transition (Kuntzweiler, Arguello et al. 1996).

Die Daten aus den Untersuchungen der Mutanten Asn776lle weisen darauf hin, dass die Selektivität des durch Palytoxin induzierten Ionenkanals erniedrigt worden ist. Im Umkehrschluss bedeutet dies für das Asparagin an Position 776, dass es beteiligt ist lonenerkennung bzw. Ionenkoordination. an der Aufgrund der geringen Ouabainbindung dieser Mutanten unter den experimentiellen Bedingungen ist die Aussagefähigkeit zur Natrium- bzw. Kaliumaffinität sehr begrenzt. Andererseits bedeutet die schlechte Ouabainbindungsfähigkeit möglicherweise eine Verschiebung des Konformationsgleichgewichtes nach E1, in der Natrium gebunden wird. Die Mutation bedeutet den Verlust der Koordinationsfähigkeit für das Kalium, an der das Asparagin im Wildtyp beteiligt ist.

Zusammenfassend ist für das Aspartat804 zu beobachten, dass durch den Wegfall der negativen Ladung die Affinität für Kalium sinkt und die für Natrium steigt. Aspartat 804 spielt offensichtlich eine wichtige Rolle in der Kaliumkoordination.

Da die Natriumionen an den E<sub>1</sub>-Status der Natriumpumpe binden, scheint das Gleichgewicht durch die Mutation in Richtung E<sub>1</sub> verschoben zu sein. Dies steht in gutem Einklang mit den von Koenderink, Swarts et al. (2000) publizierten Ergebnissen. Sie untersuchten die Na<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität bei Mutanten, bei denen das Aspartats durch die neutralen Aminosäuren Alanin, Glycin, Serin und Asparagin sowie durch das negativ geladene Glutamat substituiert wurde. Alle Enzyme hatten eine sehr hohe Na<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp bei gleichzeitig herabgesetzter Affinität für Kaliumionen. Nach Nielsen und Pedersen zeigte die

Mutante Asp804Asn keinenBindung von TI, einem Kongener des K<sup>+</sup> (Nielsen, Pedersen et al. 1998). Die Rolle der Koordination des K<sup>+</sup> durch die Aspartatgruppe an Position 804 in der Natriumpumpe wird desweiteren deutlich daran, dass bei einer Mutation zu Gln weder Natrium noch Kalium die Dephosphorylierung auslösen konnte. Bei anderen Mutanten schien das Natrium das Kalium in der Dephosphorylierungsreaktion imitieren zu können und auch konnte Kalium Ouabain nicht verdrängen (Kuntzweiler, Arguello et al. 1996; Pedersen, Rasmussen et al. 1997). Die Protonenpumpe ist an der korrespondierenden Aminosäure mit einem Glutamat 820 besetzt. Für Mutationen an dieser Stelle wurde eine hohe ATPase-Aktivität in Abwesenheit von Kalium gemessen. Auch hier scheint das Kalium ersetzbar zu werden. Die korrespondierenden Aminosäuren der Natrium- und Protonenpumpe scheinen direkt an der Kationenselektivität beteiligt zu sein (Koenderink, Swarts et al. 2000).

Die Eigenschaften der Alaninmutante an Position 807 sind gegenüber denen des Wildtyps nur mäßig verändert. Die Ladung an dieser Position scheint für die Interaktion mit Palytoxin und/oder Ouabain nicht wesentlich zu sein und auch nicht die Verkürzung der Seitenkette. Die Glutaminmutante verhält sich ähnlich wie die Asparaginmutante an Position 804. Die Kaliumaffinität und die Affinität für Ouabain sinken im Vergleich zum Wildtyp, dafür ist die Natriumaffinität erhöht.

Pedersen et al. (1997) fassen die Anforderungen an die Positionen Asp804 und Asp807 so zusammen, dass für die Natriumbindung in  $E_1$  an Asp804 die Geometrie über eine erfolgreiche Koordination entscheidet, an Position 807 jedoch die Ladung. Für die Kaliumbindung in  $E_2$  hingegen müssen sowohl die Ladung als auch die Geometrie an beiden Positionen beibehalten werden. Die Kalium-Bindung in  $E_2$ scheint sensibler auf Veränderungen der Geometrie zu regieren, als die Bindung von Natrium in  $E_1$ . Möglicherweise ist eine längere Seitenkette eher störend für die Koordination des größeren Kaliumatoms (2.6 Å) als für die Koordination des Natriumatoms (1.9 Å).

Ein großer Nachteil bei der vergleichenden Betrachtung von Calcium- und Natriumpumpe liegt sicherlich darin, dass in der Calciumpumpe "nur" zwei Calciumionen koordiniert werden. In der Natriumpumpe jedoch muss die ionenleitende Struktur in der E<sub>1</sub>-Konformation Platz und koordinierende Gruppen für 3 Natriumionen finden. Wo könnte dieses dritte Natriumion koordiniert sein? Die Koordination in der Mitte der Doppellipidschicht erscheint aufgrund der ungünstigen Dielektrizitätskonstanten eher unwahrscheinlich. Theoretisch möglich wäre eine neutrale cytoplasmatische Seite, an der ein partiell dehydriertes Natriumion über Haupt- und Seitenkettensauerstoff von Serin768 unter Mitwirkung von drei Wassermolekülen erfolgen. Das Threonin772 könnte dabei stabilisierend wirken (Jorgensen P.L. 2002).

Die aus dieser Arbeit erzielten Ergebnisse unterstützen die These, dass der durch Palytoxin induzierte Ionenkanal dem Ionophor der Pumpe entspricht, der in permanent-offener Form arretiert wird. Genauere Aussagen zum Ionophor der Natriumpumpe und der Lage der Ionen im Okklusionststadium bzw. beim Transport könnte eine Röntgenkristalluntersuchung der Natriumpumpe in verschiedenen Konformationszuständen liefern. Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, einen ausreichenden Auflösungsgrad zu erzielen.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1. Zusammenfassung

Herzglykoside binden spezifisch und reversibel an die  $\alpha$ -Untereinheit der Natriumpumpe (Lingrel and Kuntzweiler 1994) und hemmen sie. An drei verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten mit wurde die Interaktion verschiedenen Herzglykosiden und deren Aglykonen untersucht. Am sensitivsten gegenüber Ptx ist die Kombination aus  $\alpha 1\beta 1$  (9,5 ± 0,12 nM). Für  $\alpha 2\beta 1$  (41,96 ± 0,11 nM) und  $\alpha 3\beta 1$  $(23,51 \pm 0,12 \text{ nM})$  liegt die Konzentration für den halbmaximalen Kaliumefflux etwa viermal bzw. zweimal so hoch verglichen mit  $\alpha 1\beta 1$ . Ouabain in  $\mu$ M-Konzentration drängt den Kaliumefflux bei allen drei Isoformen deutlich zurück (90,5%, 95,0% und 96,3% für  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 3). Sowohl Oubagenin als auch Digitoxigenin zeigen eine ausgeprägte isoformspezifische Affinität, nicht jedoch das Bufalin. Die Unterschiede zwischen Herzglykosiden mit einem 5er- oder 6er- Lactonring sind nur geringfügig und können z.T. auch durch unterschiedlich gute Wasserlöslichkeiten hervorgerufen sein.

Diese Arbeit unterstützt die These, dass die Zuckereinheit der Herzglykoside eine wesentliche Rolle für ihre Hemmung gegenüber Palytoxin spielt. Ouabagenin hebt sich von allen anderen untersuchten Inhibitoren ab, da es bei allen drei Isoformen eine geringe Hemmwirkung zeigt, sehr ausgeprägt vor allem bei  $\alpha 2$ . Die Untereinheit  $\alpha 2$  ist auch diejenige Isoform, die gegenüber den anderen Glykosiden, die in dieser Arbeit verwendet wurden, ein anderes Verhalten zeigt. Einen gewissen Einfluss mag das geringere Expressionsniveau dieser Mutante haben.

Die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (EC 3.6.3.9) gehört zur Familie der P-Typ-ATPasen. Es handelt sich um ein zelluläres Enzym, welches den Ionentransport durch die Zellmembranen bewerkstelligt. In der vorliegenden Arbeit wurden gezielt Aminosäuren der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase homolog bzw. nicht-homolog ausgetauscht, um ihre Rolle bei der Koordination von Natrium- bzw. Kaliumionen zu untersuchen.

Der Glutamatrest an Position 779 wurde durch den Austausch gegen Aspartat formell um eine Methylgruppe verkürzt und das hochkonservierte Asparagin 776 wurde in ein Isoleucin mutiert. Da die zum Asp804 korrespondierende Position in der CalciumATPase einen Asparaginrest trägt, wurde hier der Austausch Asparat gegen Asparagin vorgenommen. Das hochkonservierte Aspartat 807 wurde sowohl hinsichtlich der Ladung durch Einbau eines Glutamatrestes respektive Alaninrestes verändert. Das mutierte Protein wurde dann heterolog in der Hefe Saccharomyces cerevisiae exprimiert.

Bei Hefen, die die Natriumpumpe mit der Mutation Glu779Asp exprimieren, ist der EC<sub>50</sub>-Wert etwa neunmal niedriger (0,81 ± 0,08 nM) im Vergleich zum Wildtyp (7,34 ± 1,67 nM). Für die weiteren Mutanten beträgt er 0,43 ± 0,10 nM (Asn776lle), 3,62 ± 2,82 nM (Asp807Ala) bei 0,28 ± 0,05 nM (Asp807Gln).

Die Dissoziationskonstante  $K_{0,5}$  für Ouabain an Membranen des Wildtyp-Enzyms beträgt 44,51 ± 9,69 nM bei einer maximalen Ouabainbindung ( $B_{max}$ ) von 1,09 ± 0,12 pmol/mg Protein. Für die Glu779Asp und Asn776lle konnten unter den gegebenen Bedingungen weder die Dissoziationskonstante noch die maximale Bindung bestimmt werden. Asp804Asn bindet Ouabain mit geringerer Affinität ( $K_{0,5}$ -Wert 104,1 ± 52,18 nM) als der Wildtyp. Membranen mit der Asp807Ala -Mutante haben eine hohe Ouabainaffinität ( $K_{0,5}$ -Wert von 10,70 ± 20,03 nM). Die maximale Ouabainbindung jedoch ist sehr gering (0,41 ± 0,21 pmol/mg Protein). Die Asp807Gln -Mutante hat eine sehr viel geringere Affinität als der Wildtyp oder die Mutante Asp807Ala, der  $K_{0,5}$ -Wert liegt bei 297,6 ± 18,54 nM Ouabain.

Beim Wildtyp wurde ein K<sub>0,5</sub>- Wert für Kalium von 1,25  $\pm$  0,11 mM bei einer maximalen [<sup>3</sup>H]Ouabainbindung von 1,50  $\pm$  0,21 pmol/mg Protein berechnet . An den Membranen mit der Glu779Asp-Mutanten konnte keine Veränderung in der Menge des gebildeten [E<sub>2</sub>\*P• Ouabain]–Komplexes gemessen werden bei einer ohnehin sehr niedrigen [<sup>3</sup>H]Ouabainbindung von 0,09  $\pm$  0,08 pmol/mg Protein (vgl. Abb. 45 a). Der K<sub>0,5</sub>-Wert für K<sup>+</sup>-Ionen an Membranen mit der Mutanten Asn776Ile ist 0,34  $\pm$  0,04 mM, konnte für die Asp804Asn-Mutante jedoch nicht bestimmt werden.

Die spezifische ATPase-Aktivität betrug beim Wildtyp 5,86  $\pm$  0,73 mU/mg Protein. Für die Mutanten Glu779Asp (0,78  $\pm$  2,05 mU/mg Protein), Asn776lle (1,50  $\pm$  0,30 mU/mg Protein), Asp804Asn (3,01  $\pm$  0,58 mU/mg Protein) sowie Asp807Ala (2,55  $\pm$  0,53 mU/mg Protein) lag der Wert deutlich niedriger. SDS-extrahierte Mikrosomen mit der Mutation Asp807Glu zeigten praktisch keine Aktivität (0,00  $\pm$  0,30 mU/mg Protein).

Die Messergebnisse für Glu779Asp deuten darauf hin, dass Glutamat 779 eine wichtige Rolle spielt in der Verbindung der extrazellulären Ionenbindung und der anschließenden intrazellulären Dephosphorylierung des Enzyms.

Die Daten aus den Untersuchungen der Mutanten Asn776lle weisen darauf hin, dass die Selektivität des durch Palytoxin induzierten Ionenkanals erniedrigt worden ist. Im Umkehrschluss bedeutet dies für das Asparagin an Position 776, dass es beteiligt ist an der Ionenerkennung bzw. Ionenkoordination.

Zusammenfassend ist für das Aspartat804 zu beobachten, dass durch den Wegfall der negativen Ladung die Affinität für Kalium sinkt und die für Natrium steigt. Aspartat 804 spielt offensichtlich eine wichtige Rolle in der Kaliumkoordination. Dieselbe Aussage scheint auch für die Position 807 zuzutreffen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die These, dass der durch Palytoxin induzierte Kanal das Ionophor der Natriumpumpe ist, welches in permanent-offener Form arretiert wird.

### 5.2 Summary

Cardiac glycosides are bound specifically and reversibly to the  $\alpha$ - subunit of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (Lingrel and Kuntzweiler 1994) and inhibit the activity of the sodium pump. Several cardiac glycosides and aglycones were used to investigate their interaction on three different isoforms of the  $\alpha$ -subunit. Sensitivity for Palytoxin was highest for  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 (9,5 ± 0,12 nM) and different from that for  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 (41,96 ± 0,11 nM) and  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 (23,51 ± 0,12 nM). Ouabain-inhibition of the palytoxin-induced K<sup>+</sup>-efflux was comparable for all isoforms (90,5%, 95,0% and 96,3% for  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 3). Ouabagenin and digitoxigenin have shown isoform-specific affinities for the three isoforms, however bufalin had not shown. The impact of structural differences regarding the lactone ring are small and may be due to differences in water solubility. In conclusion: The sugar moiety of the cardiac glycosides is important for their inhibitional function on the sodium pump.

The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (EC 3.6.3.9) belongs to the family of membrane-embedded P-Type-ATPases. Such transport ATPases carry ions through and maintain concentration gradients along the cell. To investigate the role of glutamate 779, asparagin 776, aspartate 804 and aspartate 807 in ion coordination they were changed into homologous and non-homologous amino acids.

Glutamate on position 779 was replaced by aspartat. The highly conserved asparagin 776 was mutated to isoleucin. Corresponding to its counterpart in the Calcium-ATPase the negatively charged aspartate 804 was changed into asparagin. On position 807 an aspartatic acid is highly conserved. It was homologous replaced by an glutamic acid and non-homologously replaced by an alanin. The sodium pump mutants were expressed in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and analysed for their properties.

Yeast cells expressing mutants Glu779Asp were sensitive to palytoxin. Their EC<sub>50</sub>-value of 0,81 ± 0,08 nM was nine-times lower compared to native sodium pump (7,34 ± 1,67 nM). The respective values for the other mutants were 0,43 ± 0,10 nM (Asn776IIe), 3,62 ± 2,82 nM (Asp807Ala) and 0,28 ± 0,05 nM (Asp807Gln).

Dissociations constants (K<sub>D</sub>) of ouabain for wild type was 44,51  $\pm$  9,69 nM with maximum ouabain binding (B<sub>max</sub>) of 1,09  $\pm$  0,12 pmol/mg protein. The corresponding values obtained from cells expressing Glu779Asp and Asn776lle were no able to be determined under these conditions. Dissociations constant (K<sub>D</sub>) for the mutant

Asp804Asn was lower compared to native sodium pump (104,1  $\pm$  52,18 nM). The values obtained with mutants Asp807Ala were high (10,70  $\pm$  20,03 nM), however maximum ouabain binding was very low (0,41  $\pm$  0,21 pmol/mg protein). Oubain affinity for mutants Asp807Gln (297,6  $\pm$  18,54 nM) were lower compared to wild type and mutants Asp807Ala.

The relative affinity (K<sub>0,5</sub>- value) of K<sup>+</sup> for binding to ouabain was 1,25 ± 0,11 mM for native sodium pump with maximum [<sup>3</sup>H]Ouabain binding of 1,50 ± 0,21 pmol/mg protein. For mutant sodium pumps Glu779Asp the respective values were no able to be determined while [<sup>3</sup>H]ouabain binding was very low (0,09 ± 0,08 pmol/mg protein). The K<sub>0,5</sub>-value of K<sup>+</sup> for mutants Asn776Ile was 0,34 ± 0,04 mM, however, for Asp804Asn not be able to be detected under the given conditions. The specific ATPase-activity of wild type was 5,86 ± 0,73 mU/mg protein. The respective values for for mutants were lower: Glu779Asp (0,78 ± 2,05 mU/mg protein), Asn776Ile (1,50 ± 0,30 mU/mg protein), Asp804Asn (3,01 ± 0,58 mU/mg protein) and Asp807Ala (2,55 ± 0,53 mU/mg protein) The specific ATPase-activity of Asp807Glu was undetectable (0,00 ± 0,30 mU/mg protein).

Glutamat 779 may play a role as a connecting element between extracellular ion binding and the following intracellular dephosphorylation of the sodium pump.

The results of the measurements on Asn776lle indicate involvement of asparagin 776 in recognition and coordination of the ions.

Mutations on position 804 and 807 had shown lower affinities for potassium ions and higher affinities for sodium ions. In conclusion, the aspartic acid residues 804 and 807 respectively may be important for coordination of potassium ions.

The results of this thesis support the assumption that the Palytoxin induced ion channel is the ionophor of the sodiumpump which is arrested in a permant open form.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akada, R., Kawahata, M. und Nishizawa, Y. (2000). "Elevated Temperature greatly improves transformation of fresh and frozen competent cells in yeast." <u>BioTechniques</u> **28**(5): 854-856.
- Apell, H. J. and S. J. Karlish (2001). "Functional properties of Na,K-ATPase, and their structural implications, as detected with biophysical techniques." <u>J Membr Biol</u> 180(1): 1-9.
- Arguello, J. M., R. D. Peluffo, et al. (1996). "Substitution of glutamic 779 with alanine in the Na,K-ATPase alpha subunit removes voltage dependence of ion transport." J Biol <u>Chem</u> 271(40): 24610-6.
- Artigas, P. and D. C. Gadsby (2003). "Ion occlusion/deocclusion partial reactions in individual palytoxin-modified na/k pumps." <u>Ann N Y Acad Sci</u> **986**: 116-26.
- Artigas, P. and D. C. Gadsby (2003). "Na+/K+-pump ligands modulate gating of palytoxininduced ion channels." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **100**(2): 501-5.
- Bottinger, H., L. Beress, et al. (1986). "Involvement of (Na+ + K+)-ATPase in binding and actions of palytoxin on human erythrocytes." <u>Biochim Biophys Acta</u> **861**(1): 165-76.
- Bottinger, H. u. H., E. (1984). "Palytoxin binds to and inhibits kidney and erythrocyte Na+, K+-ATPase." <u>Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol</u> **325**: 85-87.
- Fiedler, B. and G. Scheiner-Bobis (1996). "Transmembrane topology of alpha- and betasubunits of Na+,K+-ATPase derived from beta-galactosidase fusion proteins expressed in yeast." J Biol Chem **271**(46): 29312-20.
- Geering, K. (2001). "The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases." J Bioenerg Biomembr **33**(5): 425-38.
- Gick, G. G., Ismail-Beigi, F., and Edelman, I.S. (1988). Biol. Res. 268B: 277-295.
- Goldshleger, R. D. M., Tal, T., Moorman, J, Stein, W.D., Karlish S.J.D. (1992). "chemical modification of Glu-953 of the a chain of Na+,K+-ATPase associated with inactivation of cation occlussion." Proc. natl. Acad. Sci. U:S:A **89**: 6911-6915.
- Habermann, E. (1989). "Palytoxin acts through Na+,K+-ATPase." Toxicon 27(11): 1171-87.
- Habermann, E., M. Hudel, et al. (1989). "Palytoxin promotes potassium outflow from erythrocytes, HeLa and bovine adrenomedullary cells through its interaction with Na+, K+ -ATPase." <u>Toxicon</u> 27(4): 419-30.
- Hansen, O. (1984). "Interaction of cardiac glycosides with (Na+, K+)-activated ATPase. A biochemical link to digitalis-induced ionotropy." <u>Pharmacol. Rev.</u> **36**: 143-163.
- Hansen, O. u. S., J.C. (1973). "A study on the influence of the concentration of  $Mg^{2+}$ ,  $P_i$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ , and Tris of  $(Mg^{2+}+P_i)$  supported g-Strophantin binding to  $(Na^+,K^+)$ -activated ATPase from ox brain." <u>Biochim Biophys Acta</u> **311**: 51-66.
- Hilgemann, D. W. (2003). "From a pump to a pore: how palytoxin opens the gates." <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A</u> **100**(2): 386-8.
- Hille, B. (1992). "Ionic Channels of Excitable Membranes." <u>Sinauer Associates</u> **2nd ed Sundeland**: 341-346.
- Horowitz, B., K. A. Eakle, et al. (1990). "Synthesis and assembly of functional mammalian Na,K-ATPase in yeast." J Biol Chem **265**(8): 4189-92.
- Inesi, G., H. Ma, et al. (2003). "Characterization of Ca2+ ATPase residues involved in substrate and cation binding." <u>Ann N Y Acad Sci</u> **986**: 63-71.
- Ishida, Y., K. Takagi, et al. (1983). "Palytoxin isolated from marine coelenterates. The inhibitory action on (Na,K)-ATPase." J Biol Chem **258**(13): 7900-2.
- Jorgensen P.L., H., K.O., Karlish, St., J.D. (2002). "Structure and Mechanism of Na,K-ATPase: Functional sites and their interactions." <u>Annu.Rev.Physiol.</u> **65**: 0,1-0,133.

- Jorgensen, P. L. and P. A. Pedersen (2001). "Structure-function relationships of Na(+), K(+), ATP, or Mg(2+) binding and energy transduction in Na,K-ATPase." <u>Biochim Biophys</u> <u>Acta</u> **1505**(1): 57-74.
- Jorgensen, P. L., J. H. Rasmussen, et al. (1997). "Transport-linked conformational changes in Na,K-ATPase. Structure-function relationships of ligand binding and E1-E2 conformational transitions." <u>Ann N Y Acad Sci</u> **834**: 161-74.
- Karlish, S. J. D., Golgshleger, R., and Stein, W.D. (1990). "A 19-kDa C-terminal fragment of the a chain of Na/K-ATPase is essential for occlusion and transport of cations." <u>1990Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A</u> 87: 4566-4570.
- Koenderink, J. B., H. G. Swarts, et al. (2000). "Mutation of aspartate 804 of Na(+),K(+)-ATPase modifies the cation binding pocket and thereby generates a high Na(+)-ATPase activity." <u>Biochemistry</u> **39**(32): 9959-66.
- Koster, J. C., G. Blanco, et al. (1996). "Substitutions of glutamate 781 in the Na,K-ATPase alpha subunit demonstrate reduced cation selectivity and an increased affinity for ATP." J Biol Chem **271**(5): 2413-21.
- Kuntzweiler, T. A., J. M. Arguello, et al. (1996). "Asp804 and Asp808 in the transmembrane domain of the Na,K-ATPase alpha subunit are cation coordinating residues." J Biol <u>Chem</u> **271**(47): 29682-7.
- Lemas, M. V., Yu, H. Y., Takeyasu, K., Kone, B., Fambrough, D.M. and lemas, M (1994). "Assembly of Na,K-ATPase alpha-subunit isoforms with Na,K+ATPase beta subunit isoforms and H,K,ATPase beta-subunit." J. Biol. Chem **269**: 12366-12372.
- Lingrel, J. B. and T. Kuntzweiler (1994). "Na+,K(+)-ATPase." J Biol Chem **269**(31): 19659-62.
- Lingrel, J. B., Orlowski, J., Shull, M.M., and Price, E.M. (1990). Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. **36**: 37-89.
- Lutsenko, S. and J. H. Kaplan (1995). "Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity." <u>Biochemistry</u> **34**(48): 15607-13.
- Moller, J. V., B. Juul, et al. (1996). "Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1286**(1): 1-51.
- Moore, R. E. a. S., P.J. (1971). Science 172: 495-498.
- Nielsen, J. M., P. A. Pedersen, et al. (1998). "Importance of intramembrane carboxylic acids for occlusion of K+ ions at equilibrium in renal Na,K-ATPase." <u>Biochemistry</u> **37**(7): 1961-8.
- Pedemonte, C. H. a. K., J.H. (1986). "Carbodiimide activation of Na,K-ATPase. A consequence of internal cross-linking and not carboxyl group modification." <u>J.Biol.Chem.</u> 261: 3632-3639.
- Pedersen, P. A., J. H. Rasmussen, et al. (1997). "Identification of Asp804 and Asp808 as Na+ and K+ coordinating residues in alpha-subunit of renal Na,K-ATPase." <u>FEBS Lett</u> **400**(2): 206-10.
- Redondo, J., B. Fiedler, et al. (1996). "Palytoxin-induced Na+ influx into yeast cells expressing the mammalian sodium pump is due to the formation of a channel within the enzyme." <u>Mol Pharmacol</u> **49**(1): 49-57.
- Rose, M. D., Winston, F. und Hieter, P. (1990). <u>Methods in Yeast Genetics: A Laboratory</u> <u>Manual.</u> New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., Fritsch, E.S. und Maniatis, T. (1989). <u>Molecular Cloning: A Laboratory</u> <u>Manual</u>, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sansom, M. S., I. H. Shrivastava, et al. (2000). "Simulations of ion channels--watching ions and water move." <u>Trends Biochem Sci</u> **25**(8): 368-74.
- Sarvazyan, N. A., Modyanov, N.N. and Askari, A. (1995). "Intersubunit and intrasubunit contact regions of Na+/K+-ATPase revealed by controlled proteolysis and chemical cross-linking." J Biol Chem **270**: 26528-26532.

- Scarborough, G. A. (1999). "Structure and function of the P-type ATPases." <u>Curr Opin Cell</u> <u>Biol</u> **11**(4): 517-22.
- Scheiner-Bobis, G. (1998). "Ion-transporting ATPases as ion channels." <u>Naunyn</u> <u>Schmiedebergs Arch Pharmacol</u> **357**(5): 477-82.
- Scheiner-Bobis, G. (2002). "The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport." <u>Eur J Biochem</u> **269**(10): 2424-33.
- Scheiner-Bobis, G. and R. A. Farley (1994). "Subunit requirements for expression of functional sodium pumps in yeast cells." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1193**(2): 226-34.
- Scheiner-Bobis, G., T. Hubschle, et al. (2002). "Action of palytoxin on apical H+/K+-ATPase in rat colon." <u>Eur J Biochem</u> **269**(16): 3905-11.
- Scheiner-Bobis, G., D. Meyer zu Heringdorf, et al. (1994). "Palytoxin induces K+ efflux from yeast cells expressing the mammalian sodium pump." <u>Mol Pharmacol</u> **45**(6): 1132-6.
- Scheiner-Bobis, G. and H. Schneider (1997). "Palytoxin-induced channel formation within the Na+/K+-ATPase does not require a catalytically active enzyme." <u>Eur J Biochem</u> 248(3): 717-23.
- Schneider, H. and G. Scheiner-Bobis (1997). "Involvement of the M7/M8 extracellular loop of the sodium pump alpha subunit in ion transport. Structural and functional homology to P-loops of ion channels." J Biol Chem **272**(26): 16158-65.
- Shainskaya, A., A. Schneeberger, et al. (2000). "Entrance port for Na(+) and K(+) ions on Na(+),K(+)-ATPase in the cytoplasmic loop between trans-membrane segments M6 and M7 of the alpha subunit. Proximity Of the cytoplasmic segment of the beta subunit." J Biol Chem 275(3): 2019-28.
- Shainskaya, A. a. K., S. J. (1994). "Evidence that the cation occlusion domain of Na/K-ATPase consists of a complex of membrane-spanning segments. Analyss of limit membrane-embedded tryptic fragments." J.Biol. Chem 269: 10780-10789.
- Skou, J. C. (1988). "Overview: The na,K-Pump." Methods Enzymol 156: 1-25.
- Toyoshima, C., M. Nakasako, et al. (2000). "Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 A resolution." <u>Nature</u> **405**(6787): 647-55.
- Ueno, S., Kusaba, M., Takeda, K., Maeda, M., Futai, M., Izumi, F. and Kawamura, M. (1995). "Functional Consequences of Substitution of the Disulfide-Bonded Segment, Cys<sup>127</sup>-Cys<sup>150</sup>, Located in the Extracellular Domain of the Na,K-ATPase β-subunit:Arg<sup>148</sup> is Essential for the Functional Expression of Na,K-ATPase." J Biochem **117**: 591-596.
- Vilsen, B. (1995). "Mutant Glu781-> Ala of the rat kidney Na+,K+-ATPase displays low cation affinity and catalyzes ATPhydrolysis ata high rate in the absence of potassium ions." <u>Biochemistry</u> 34: 1455-1463.
- Wallick, E. T. a. S., A. (1988). "Interaction of cardiac glycosides with Na+,K+-ATPase." <u>Methods Enzymol.</u> **156**: 201-213.
- Wang, X. and J. D. Horisberger (1997). "Palytoxin effects through interaction with the Na,K-ATPase in Xenopus oocyte." <u>FEBS Lett</u> **409**(3): 391-5.

# 7 Anhang

# Tabelle 13: EC<sub>50</sub>-Werte und maximaler K<sup>+</sup>-Efflux von Wildtyp und Mutanten bei 75nM Ptx

Mutante	EC <sub>50 Na</sub> (nM)	max Efflux <sub>Na</sub>	$EC_{50 Ca}(nM)$	max Efflux <sub>Ca</sub>
		(%)		(%)
Wildtyp	$7,34 \pm 1,67$	$92,21 \pm 2,4$	$700,4 \pm 3,7$	$12,68 \pm 0,38$
Glu779Asp	$0,\!81\pm0,\!08$	$90,30 \pm 1,56$	n.d.	n.d.
Asn776Ile	$0,\!43 \pm 0,\!10$	$82,23 \pm 1,92$	333,7 ± 17,9	$23,25 \pm 5,95$
Asp804Asn	$0,\!68 \pm 0,\!30$	$92,55 \pm 2,21$	558,6±11,3	$35,45 \pm 1,85$
Asp807Gln	$0,28 \pm 0,05$	80,93 ± 1,01	$364,1 \pm 12,15$	$62,50 \pm 1,30$

# Tabelle 14: Die Bindung von radioaktiv markiertem Ouabain in Gegenwart von Phosphat und Mg<sup>2+</sup>-Ionen

Mutante	$K_{D}(nM)$	B <sub>max</sub> (pmol/mg Protein)
Wildtyp	$44,51 \pm 9,69$	$1,09 \pm 0,12$
Glu779Asp	n.d.	n.d.
Asn776Ile	n.d.	n.d
Asp804Asn	$104,1 \pm 52,18$	$2,87 \pm 0,24$
Asp807Gln	$297,6 \pm 18,04$	$3,07 \pm 0,14$
Asp807Ala	$10,70 \pm 20,03$	$0,\!41 \pm 0,\!21$

# Tabelle 15: Die durch Ouabain gehemmten K<sup>+</sup>-Effluxe beim Wildtyp und den Mutanten E779D, N783I, D804N, D807A und D807Q

Mutante	EC <sub>50</sub> (µM)	Hemmung (%)
Wildtyp	$5,79 \pm 0,81$	82,3
Glu779Asp	$7,84 \pm 2,78$	37,2
Asn776Ile	$16,89 \pm 8,80$	31,4
Asp804Asn	$13,58 \pm 0,21$	55,4
Asp807Gln	$13,48 \pm 6,45$	33,6
Asp807Ala	$6,94 \pm 2,83$	85,7

#### Tabelle 16: Verdrängung von [3H] Ouabain mit Kalium

Mutante	EC <sub>50</sub> (mM)	B max (pmol/mg)
Wildtyp	$1,25 \pm 0,11$	$1,50 \pm 0,21$
Glu779Asp	$\infty$	$0,097 \pm 0,084$
Asn776Ile	$0,34 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,20$
Asp804Asn	n.d.	$0,65 \pm 0,20$
Asp807Gln	$17,04 \pm 0,90$	$0,94 \pm 0,11$
Asp807Ala	$0,74 \pm 0,02$	$1,52 \pm 0,026$

Mutante	K <sub>D</sub> (mM)	B <sub>max</sub> (pmol/mg Protein)
Wildtyp	0,042 ± 0,046	0,69 ± 0,082
Asn776Ile	1,0 * 10 <sup>-7</sup> ± 0,0449	0,20 ± 0,041
Asp804Asn	0,0027 ± 0,0277	0,39 ± 0,040
Asp807Gln	0,012 ± 0,0234	0,66 ± 0,115

# Tabelle 17: [<sup>3</sup>H] Ouabainbindung in Abhängigkeit von der Na<sup>+</sup> - Ionenkonzentration

### Tabelle 18: [3H] Ouabainbindung in Abhängigkeit von der Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration

Mutante	K <sub>D</sub> (mM)	B <sub>max</sub> (pmol/mg Protein)
Wildtyp	n.d.	n.d.
Asn776Ile	1,0 * 10 <sup>-7</sup>	0,20 ± 0,041
Asp804Asn	0,688 ± 0,419	0,446 ± 0,07
Asp807Gln	0,426 ± 0,2019	0,71 ± 0,073

#### Tabelle 19: Ausgewählte Herzaktive Glykoside und Aglykone

	Lactonring	Zuckerkomponente
Ouabain	5er Ring	Rhamnose
Ouabagenin	5er Ring	
Proscillaridin	6er Ring	Rhamnose
Bufalin	6er Ring	
Digoxin	5er Ring	Digitoxose
Digitoxigenin	5er Ring	

#### Tabelle 20: EC<sub>50</sub>-Werte und maximaler Ptx-induzierter K<sup>+</sup>-Efflux

	α1β1		α2β1		α3β1	
	EC50	max efflux	EC <b>50</b>	max efflux	EC <b>50</b>	max efflux
	[nM]	(%)	[nM]	(%)	[nM]	(%)
Palytoxin	9,5±0,12	89,9	41,96	59,1	23,51 ±	73,4
			±0,11		0,12	

	α1β1		α2β1		α3β1	
Cardiac glycoside	EC <b>50</b>	Inhibition	EC50	Inhibition	EC <b>50</b>	Inhibition
	[µM]	(%)	[µM]	(%)	[µM]	(%)
Ouabain	13,6	90,3	14,4	95,0	5,0	96,3
Ouabagenin	82,0	37,0	363,0	19,5	493,0	33
Proscillaridin A	4,4	84,5	1,3	81	3,6	76
Bufalin	0,5	84	2,0	70	0,9	82
Digoxin	124,2	60	8,4	70	113,1	80
Digitoxigenin	15,1	81,6	34,5	29,3	94,5	54,8

### Tabelle 21: EC<sub>50</sub>-Werte und maximale Hemmung des Ptx-induzierten K<sup>+</sup>-Effluxes durch ausgewählte herzaktive Steroide und Aglykone

#### Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Biochemie und Endokrinologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Anleitung von Prof. Dr. Georgios Scheiner-Bobis angefertigt.

Die Dissertation wurde als Projekt im Graduiertenkolleg "Molekulare Veterinärmedizin" durch die DFG gefördert.

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Menschen bedanken, ohne deren Mitwirkung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Herrn Prof. Dr. rer.nat Georgios Scheiner-Bobis für die Überlassung des abwechslungsreichen Themas, seinen Ideenreichtum und seine Diskussionsbereitschaft.

Frau Prof. Dr. med. Katja Becker für die tatkräftige Unterstützung im Prüfungsverfahren und die ausführliche Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger, Sprecher des Graduiertenkollegs "Molekulare Veterinärmedizin" für die engagierte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schoner für viele intensive Diskussionen sowohl fachlichen als auch gesellschaftspolitischen Inhalts.

Den weiteren Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Endokrinologie, allen voran Alexander Eva, Bianca Kulik und Dr. Hartmut Pauls, für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Den ehemaligen Kolleginnen und Kollegen des Graduiertenkollegs, vor allem Dr. Sarah Kocks.

Meinen Freunden und ehemaligen Kollegen und Kolleginnen Dr. Markus Ott, Anja Meyer, Juliane Niebuhr, Rita Krumscheid und Dr. Ping Su danke ich herzlich für viele arbeitsreiche gemeinsame Stunden mit Freud und mit Leid. Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Susanne Becker und Dr. Christine Weitkamp, ohne deren tatkräftigen fachlichen und moralischen Beistand über viele Jahre hinweg ich dieses Werk nicht zum Abschluß gebracht hätte.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung, die ich von dieser Seite erfahren habe.



#### édition scientifique - VVB LAUFERSWEILER VERLAG -

VVB LAUFERSWEILER VERLAG STAUFENBERGRING 15 D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890 redaktion@doktorverlag.de www.doktorverlag.de

