

Funktionelle Charakterisierung eines spermienspezifischen Na^+/H^+ -Austauschers

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Florian Windler

aus

Goslar

Bonn 2018

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. U. B. Kaupp

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Kolanus

Tag der Promotion: 24.10.2018

Erscheinungsjahr: 2018

Zusammenfassung

Sekundär-aktive Austauscher sind membranständige Proteine, die den elektrochemischen Gradienten eines Ions nutzen, um den Transport anderer Ionen oder Substrate über die Zellmembran zu ermöglichen. Natrium/Protonen (Na^+/H^+)-Austauscher der *Solute Carrier 9* (SLC9)-Familie spielen dabei eine Rolle in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen. Ein bis heute rätselhaftes Mitglied der SLC9-Familie ist der spermien-spezifische Austauscher SLC9C1. Es ist bis heute nicht bekannt, ob SLC9C1 ein funktionstüchtiger Na^+/H^+ -Austauscher ist. SLC9C1 besitzt eine einzigartige dreiteilige Struktur; eine Austauscher (NHE)-Domäne, eine Spannungssensordomäne (VSD) sowie eine Bindestelle für zyklische Nukleotide (CNBD). VSDs und CNBDs sind funktionelle Proteindomänen, die man bereits in anderen Proteinen gefunden hat, VSDs überwiegend in Ionenkanälen, aber auch in einer spannungsabhängigen Phosphatase, CNBDs in Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren, und auch in Ionenkanälen. SLC9C1 ist das erste Mitglied der SLC-Familie, in dem solche Proteindomänen gefunden wurden.

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich diesen phylogenetischen Hybrid untersucht. Als Modellprotein diente dazu SLC9C1 des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* (*SpSLC9C1*). Durch den Einsatz pH-sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe in der Elektrophysiologie konnte ich zeigen, dass *SpSLC9C1* ein funktionstüchtiger Na^+/H^+ -Austauscher ist. Hyperpolarisierende Spannungssprünge aktivieren sowohl *Gating*-Ströme der VSD als auch den sekundär-aktiven Na^+/H^+ -Austausch. Ich konnte die Spannungsabhängigkeit der Austauschaktivität bestimmen, sowie zeigen, dass cAMP, aber nicht cGMP, die Spannungsabhängigkeit der *Gating*-Ströme und der Austauschaktivität moduliert. Mutationen in der NHE-Domäne, der CNBD und der VSD verhinderten jeweils den Na^+/H^+ -Austausch bzw. die Modulation durch cAMP oder beeinflussten die *Gating*-Ströme.

Ein Antikörper bestätigte die Expression von SLC9C1 in *S. purpuratus* Spermien. Mithilfe von spannungs-, pH- und Na^+ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen in *S. purpuratus* Spermien konnte ich zeigen, dass *SpSLC9C1* auch in Spermien durch Hyperpolarisation aktiviert wird. Der Na^+/H^+ -Austausch alkalisiert das Flagellum nach der Lockstoffstimulation und ermöglicht dem Spermium die chemotaktische Navigation.

Abstract

Secondary-active exchangers are membrane-bound proteins that use the electrochemical gradient of ions to transport other ions or substrates across cell membranes. Within these proteins, sodium/proton (Na^+/H^+)-exchangers of the Solute Carrier 9 (SLC9) family play a crucial role in a number of physiological processes. A so far enigmatic member of this family is the sperm-specific exchanger SLC9C1. No evidence exists up to today that SLC9C1 is a functional Na^+/H^+ -exchanger. SLC9C1 features a unique tripartite structure; an exchanger (NHE)-domain, a voltage-sensing domain (VSD) as well as a cyclic nucleotide-binding domain (CNBD). VSDs and CNBDs are protein domains that are found in a variety of proteins, VSDs mainly in ion channels but also in a voltage sensitive phosphatase, CNBDs in protein kinases, transcription factors and also ion channels. SLC9C1 is the first member of the SLC9-family in which these protein domains was found.

During my thesis, I investigated this phylogenetic hybrid. As a model protein, I chose SLC9C1 from the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (*SpSLC9C1*). By using a pH-sensitive fluorescence dye within an electrophysiological setup, I could show that *SpSLC9C1* is indeed a functional Na^+/H^+ -exchanger. Hyperpolarizing voltage steps evoked both gating-currents and secondary-active Na^+/H^+ -exchange. I could determine the voltage dependence of exchanger activation. Furthermore, I looked into the action of cyclic nucleotides such as cGMP and cAMP on *SpSLC9C1*. Cyclic AMP, but not cGMP affected the voltage dependence of both gating-currents and exchange activity. Mutations in the NHE-domain, CNBD and VSD abolished Na^+/H^+ -exchange, cAMP-modulation or affected voltage gating, respectively.

An antibody was raised to confirm SLC9C1 expression in *S. purpuratus* sperm. By using voltage-, pH- and Na^+ -sensitive fluorescent dyes together with a rapid mixing device, I could show that *SpSLC9C1* in sperm activates during hyperpolarization. The Na^+/H^+ -exchange alkalizes the flagellum upon stimulation with the chemoattractant and allows chemotactic navigation.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Sekundär-aktiver Ionen-transport: Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher	1
1.2 Spermienphysiologie	6
1.3 Zielsetzung der Arbeit	12
2. Material & Methoden	13
2.1 Lösungen und Medien	13
2.1.1 Lösungen für Spermienproben.....	13
2.1.2 Lösungen für die Zellkultur	13
2.1.3 Lösungen für die Elektrophysiologie.....	15
2.2 Fluoreszenzfarbstoffe	17
2.2.1 pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe	17
2.2.2 Spannungssensitive Fluoreszenzfarbstoffe	18
2.2.3 Natriumsensitive Fluoreszenzfarbstoffe	19
2.3 Spermienproben	19
2.4 Die <i>Stopped-Flow</i> -Apparatur	20
2.4.1 <i>Stopped-Flow</i> -Fluorimetrie.....	21
2.4.2 Beladung der Spermienproben mit Fluoreszenzfarbstoffen	22
2.4.3 Immunhistochemie.....	22
2.5 Zellkultur und heterologe Genexpression	24
2.5.1 Herstellung einer stabilen <i>SpSLC9C1</i> -Zelllinie.....	24
2.5.2 Transiente Genexpression	25
2.5.3 SDS-Gelelektrophorese und <i>Western-Blot</i> -Analyse	26
2.5.4 Immunzytochemie und Membransheets	28
2.6 Kalibrierung durch die pH _{null} -Methode.....	30
2.7 Elektrophysiologie	32
2.7.1 Die <i>Patch-Clamp</i> -Technik	32
2.7.2 pH-Fluorimetrie	36
2.7.3 <i>Acid-load</i> von CHO-Zellen.....	37
2.7.4 Blitzlicht-Photolyse.....	37
2.7.5 Messung von <i>Gating</i> -Strömen	38
2.7.6 Die <i>Patch-Clamp</i> -Apparatur	39

3.	Ergebnisse.....	40
3.1	Sequenzanalyse von SLC9C1	40
3.1.1	Die Austauschdomäne	40
3.1.2	Die S4-Spannungssensordomäne.....	44
3.1.3	Die Bindestelle für zyklische Nukleotide	45
3.2	<i>Sp</i> SLC9C1 erreicht die Plasmamembran von CHO-Zellen	46
3.3	<i>Sp</i> SLC9C1 besitzt einen funktionstüchtigen Spannungssensor	47
3.4	Die <i>Gating</i> -Ströme werden durch cAMP moduliert	50
3.5	<i>Sp</i> SLC9C1 ist ein spannungsgesteuerter Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher	52
3.6	Die Spannungsabhängigkeit von <i>Sp</i> SLC9C1	58
3.7	Die Spannungsabhängigkeit wird durch cAMP moduliert	63
3.8	SLC9-spezifische Blocker sind ineffektiv gegen <i>Sp</i> SLC9C1	66
3.9	<i>Sp</i> SLC9C1 ist für den Na ⁺ /H ⁺ -Austausch in Spermien verantwortlich	72
4.	Diskussion	76
4.1	Frankensteins Molekül	76
4.1.1	Die Austauschdomäne	77
4.1.2	Der Spannungssensor	79
4.1.3	Die Bindestelle für zyklische Nukleotide	82
4.1.4	Wie interagieren Austauschdomäne, VSD und CNBD?	86
4.2	Physiologie	90
4.2.1	Die lösliche Adenylatzyklase.....	91
4.2.2	SLC9C1 in Säugetieren.....	93
5.	Literaturverzeichnis	96

Abkürzungsverzeichnis

ASW	Artifizielles Seewasser
ATP	Adenosintriphosphat
$[x]_{e/i}$	Extra-/Intrazelluläre Konzentration der Substanz x
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar ($\mu\text{mol/L}$)
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchonic acid</i>)
CaCl_2	Kalziumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosin-3'5'-Monophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat
CHO	Chinesische Hamsterovarien (Zelllinie)
CNBD	Bindestelle für zyklische Nukleotide (<i>cyclic nucleotide-binding domain</i>)
CNG	Zyklisch Nukleotid-Gesteuerter Ionenkanal
CNGK	K^+ -Selektiver zyklisch Nukleotid-Gesteuerter Ionenkanal
cNMP	Zyklisches Nukleotid-3'5'-Monophosphat
CPA	Kation/Proton-Antiporter (<i>cation/proton antiporter</i>)
DAPI	4'6-Diamidin-2-phenylindol
DTT	Dithiothreitol
EAG	<i>Ether-a-gogo</i> -Ionenkanal
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIPA	N-substituierte Amilorid-Derivate
e_0	Konstante der Elementarladung (q_g): $1,602 \times 10^{-19}$ Coulomb
Epac	Austauschprotein aktiviert durch cAMP
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES	Extrazelluläre Lösung (<i>extracellular solution</i>)
GC	Guanylatzyklase (<i>guanylyl-cyclase</i>)
HCl	Hydrogenchlorid
HCN	Hyperpolarisationsaktivierter zyklisch Nukleotid-modulierter Ionenkanal
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hERG	Humanes EAG-verwandenes Gen (<i>human EAG-related gene</i>)
I	Strom
IS	Intrazelluläre Lösung (<i>intracellular solution</i>)
$K_{1/2}$	Konzentration der halbmaximalen Bindung

Abkürzungsverzeichnis

KCl	Kaliumchlorid
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LiCl	Lithiumchlorid
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
mM	Millimolar (mmol/L)
mPIC	Molekularer Protease Inhibitor Cocktail
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
M_w	Molekülmasse
n	Anzahl der Experimente
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NaT-DC	<i>Na⁺-Transporting Carboxylic Acid-Decarboxylase</i>
NCKX	Na ⁺ /Ca ²⁺ /K ⁺ -Austauscher
NHE/NHA/NHX	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
nm	Nanometer
nM	Nanomolar (nmol/L)
NMDG	N-Methyl-D-Glucamin
pA	Picoampere
PBC	Phosphatbindekassette (<i>phosphate-binding cassette</i>)
pH _{e/i}	Extra-/Intrazellulärer pH
pH _{rest}	Ruhe-pH-Wert (<i>resting pH</i>)
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PLL	Poly-L-Lysin
pM	Picomolar
P _o	Offenwahrscheinlichkeit
Q	Ladung
q _g	Elementarladung
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden

s	Steigung der Boltzmann-Kurve
sAC	Lösliche Adenylatzyclase (<i>soluble adenylyl cyclase</i>)
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SLC	<i>solute carrier</i>
TMD	Transmembrandomäne
V	Spannung
$V_{1/2}$	Spannungswert der halbmaximalen Aktivierung
V_K	Kommandospannung
V_m	Membranspannung
V_{rest}	Ruhemembranpotential (<i>resting membrane potential</i>)
VSD	Spannungssensordomäne (<i>voltage-sensing domain</i>)
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Kontrollierte Ionenbewegung über Zell- und Organellmembranen sind ein essentieller Bestandteil des Lebens. Sie dienen der Etablierung von Gradienten, der Regulation des Zellvolumens, der pH-Homöostase und der Signalverarbeitung. In höher entwickelten Organismen unterliegen ihr Immunreaktionen (Stock *et al.*, 2013), Sekretionsmechanismen (Lee *et al.*, 2012) sowie elektrische Signale in Nerven, Muskeln und Spermien (Kaupp & Seifert, 2001, 2002; Craven & Zagotta, 2006). Im Spermium dient der Ionenfluss dem gerichteten Schwimmverhalten zur Befruchtung der Eizelle (Kirichok & Lishko, 2011). Seeigel stellen ein Modellsystem für das chemotaktische Schwimmverhalten der Spermien zum Ei dar. Membranständige Kanäle und Transporter im Flagellum ermöglichen hier einen Ein- oder Ausstrom von bestimmten Ionen wie Natrium (Na^+), Calcium (Ca^{2+}) oder Kalium (K^+ , Strünker *et al.*, 2006; Bönigk *et al.*, 2009; Gauss *et al.*, 1998; Seifert *et al.*, 2014). Ein bisher unbekannter Mechanismus liegt der intrazellulären Alkalisierung zugrunde, die während der chemotaktischen Stimulation beobachtet wird. Erste Hinweise von 1984 deuten einen Na^+/H^+ -Austauschmechanismus an, der durch negative Spannung aktiviert wird (Lee, 1984b). Im Rahmen meiner Arbeit soll der zugrundeliegende Austauscher identifiziert und charakterisiert werden.

1.1 Sekundär-aktiver Ionentransport: Na^+/H^+ -Austauscher

Im Gegensatz zu primär-aktiven Ionentransportern werden sekundär-aktive Transporter nicht durch Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) sondern durch den elektrochemischen Gradienten eines der beiden zu transportierenden Ionen angetrieben. Dieser Gradient treibt den gerichteten Transport (Sym- oder Antiport) des anderen Ions an. Na^+/H^+ -Austauscher transportieren Na^+ -Ionen im Austausch gegen Protonen (H^+ -Ionen) über biologische Membranen. Na^+/H^+ -Austausch wurde zuerst 1974 im Prokaryoten *Escherichia coli* und 1976 in Mukosazellen des Dünndarms und der Niere von Ratten (*Rattus norvegicus*) beschrieben (West & Mitchell 1974; Murer, Hopfer & Kinne, 1976). Goldberg identifizierte 1987 den *E. coli*-Austauscher NhaA (N a^+/H^+ -Antiporter A, *EcNhaA*, Goldberg *et al.*, 1987). Wenig später wurde der erste SLC9-Austauscher (Solute Carrier Familie 9, HUGO Nomenklatur, <http://www.genenames.org>) aus menschlichem Gewebe kloniert (SLC9A1, auch bekannt als

1. Einleitung

NHE1, *Homo sapiens*, Sardet *et al.*, 1989). Seit ihrer Entdeckung sind Na^+/H^+ -Austauscher in fast allen Organismen, einschließlich Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen beschrieben worden (Orlowski & Grinstein, 2007).

Als sekundär-aktive Austauscher gehören sie zur Kation/Proton-Antiporter- (*cation/proton antiporter*, CPA) Familie (Saier *et al.*, 2014). Diese Familie enthält Homologe von Bakterien bis zum Menschen und wurde auf der Basis des evolutionären Ursprungs in die Untergruppen CPA1, CPA2 und NaT-DC (*Na⁺-transporting carboxylic acid decarboxylase*) aufgeteilt (Abbildung 1-1, Brett *et al.*, 2005; Donowitz *et al.*, 2013).

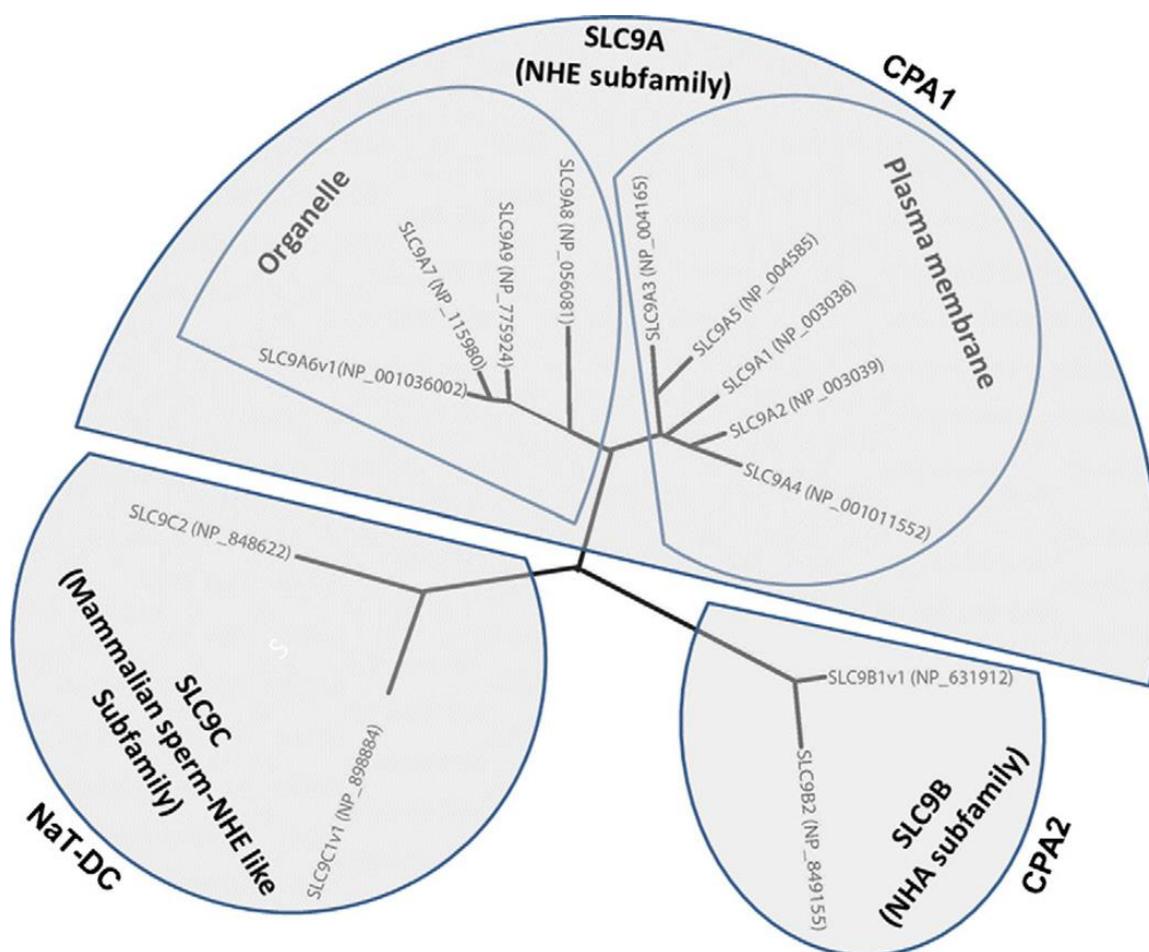
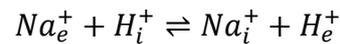


Abbildung 1-1: Einteilung der humanen SLC9 Isoformen in die Kation/Proton-Antiporter (*cation/proton antiporter*, CPA)-Familien: Die CPA1-Familie (auch NHE-Familie genannt) beinhaltet die Na^+/H^+ -Austauscher SLC9A1-9, die CPA2-Familie (auch NHA-Familie genannt) die potentiellen Na^+/H^+ -Austauscher SLC9B1-2 und die NaT-DC-Familie die potentiellen Na^+/H^+ -Austauscher SLC9C1-2. Abbildung aus Donowitz *et al.*, 2013.

(i) Die CPA1-Familie

Bisher charakterisierte Austauscher der CPA1-Familie beinhalten SLC9A-Austauscher aus Vertebraten und Invertebraten (Orlowski & Grinstein, 2004; Donowitz, Tse & Fuster, 2013), NHX-Austauscher aus Pflanzen (Chanroj *et al.*, 2012) sowie NhaP aus Archaeobakterien (z.B. *M. jannaschii* und *P. abyssi*, Hellmer *et al.*, 2002). Die generalisierte Transportgleichung



mit einer 1 H⁺ : 1 Na⁺-Stöchiometrie konnte aus der funktionellen Charakterisierung abgeleitet werden. Momentan sind neun Isoformen von SLC9A-Austauschern in Säugetieren bekannt; SLC9A1-9. Sie werden in unterschiedlichen Geweben (SLC9A1-5) und Organellen (SLC9A6-9) exprimiert und interagieren dabei mit anderen Transportsystemen. Die Austauscher SLC9A1 und SLC9A3 sind in dieser Hinsicht am besten untersucht. So sitzt SLC9A3 (auch bekannt als NHE3) unter anderem in der apikalen Membran des proximalen Tubulus eines Nephrons (Amemiya *et al.*, 1995), während SLC9A1 basolateral lokalisiert ist (Biemesdorfer *et al.*, 1992). SLC9A3 ist der quantitativ wichtigste Na⁺/H⁺-Austauscher für die Rückresorption von Na⁺-Ionen aus dem Lumen des Nierentubulus in die Epithelzelle (Spring, 1977; Jacobsen, Kragh-hansen & Sheikh, 1986; Baum, 1989). Na⁺-Ionen werden durch eine Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Seite an das Interstitium abgegeben. So sind SLC9A3 und die Na⁺/K⁺-ATPase für den transzellulären Na⁺-Transport über die Epithelmembran zuständig. SLC9A1 an der basolateralen Seite spielt in diesem Prozess eine untergeordnete Rolle. Seine Hauptaufgabe besteht in der Osmoregulation (Bianchini *et al.*, 1995), sowie der Homöostase des intrazellulären pH-Wertes (pH_i, Pouysségur *et al.*, 1984; Grinstein, Rotin & Mason, 1989). Neben dem Nierentubulus ist SLC9A1 ubiquitär in fast allen Geweben exprimiert. Ausnahmen bilden z.B. dopaminerge Neurone oder Mikroglia (Hwang *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2008). Ein Charakteristikum zur Unterscheidung zwischen SLC9A1 und SLC9A3 ist ihre Sensitivität gegenüber Amilorid (Mihaila, 2015). SLC9A1 wird durch Amilorid und Amilorid-Derivate blockiert, während SLC9A3 Amilorid-insensitiv ist (Levine *et al.*, 1993; Tse, S. a Levine, *et al.*, 1993; Pedersen *et al.*, 2007).

Neben der Niere wurde SLC9A3 zusammen mit den Austauschern SLC9A2 (NHE2) und SLC9A4 (NHE4) unter anderem im Epithelgewebe des Gastrointestinaltrakts entdeckt (Tse, S. A. Levine *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993; Hoogerwerf *et al.*, 1996; Chambrey *et al.*, 2001; Peti-Peterdi *et al.*, 2000; Pizzonia *et al.*, 1998). SLC9A5 (NHE5) exprimiert sowohl in die Plasmamembran als auch in synaptischen Vesikeln von Neuronen (Attaphitaya, Park &

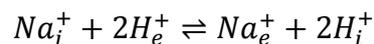
1. Einleitung

Melvin, 1999; Baird *et al.*, 1999). Die Austauscher SLC9A6-9 hingegen wurden ausschließlich in intrazellulären Organellen identifiziert (Garlid *et al.*, 1995; Miyazaki *et al.*, 2001; Numata & Orłowski, 2001; Brett *et al.*, 2002; Goyal, Vanden Heuvel & Aronson, 2003; Nakamura *et al.*, 2005). Es wird vermutet, dass sie eine Rolle bei der Ansäuerung von Endosomen spielen.

2002 und 2014 wurde jeweils ein Austauscher in den verwandten Archaeen *M. jannaschii* und *P. abyssi* identifiziert (*MjNhaP1* und *PaNhaP*, Hellmer *et al.*, 2002; Wöhlert *et al.*, 2014). Beide besitzen eine 1 H⁺ : 1 Na⁺-Stöchiometrie und werden der CPA1-Familie zugeordnet (Brett, Donowitz & Rao, 2005). Physiologisch nutzten die Archaeen (analog zu SLC9A-Austauschern) extrazelluläres Na⁺ um Protonen aus der Zelle zu transportieren; dieses Protein ermöglicht das Überleben in heißen Schloten mit einem Salzgehalt von 10-15 mg/L und einem pH_e von 4-6 (Jones *et al.*, 1983). Strukturelle Analysen von *PaNhaP* und *MjNhaP1* konnten 2014 Aufschluss über die Substratbindestelle und den Transportmechanismus von CPA1-Austauschern geben (Paulino *et al.*, 2014; Wöhlert, Kühlbrandt & Yildiz, 2014).

(ii) Die CPA2-Familie

Die CPA2-Familie beinhaltet unter anderem SLC9B-Austauscher (Brett, Donowitz & Rao, 2005; Chen *et al.*, 2016), den CHX-Austauschern aus Pflanzen (Maser, 2001; Sze *et al.*, 2004) sowie den bakteriellen *EcNhaA* (Goldberg *et al.*, 1987). Funktionell charakterisierte CPA2-Austauscher ermöglichten auch hier die Ableitung einer generalisierten Transportreaktion mit einer elektrogenen Stöchiometrie (2 H⁺ : 1 Na⁺, Taglicht *et al.*, 1993);



Im Vergleich zu SLC9A1-9 besitzen die bekannten SLC9B-Isoformen 1 und 2 aus Säugetieren (auch bekannt als NHA1 und NHA2) größere Homologie zu prokaryotischen Austauschern wie beispielsweise *EcNhaA*. Über die physiologische Rolle der SLC9B-Austauscher ist wenig bekannt. Homologe aus *Drosophila melanogaster* findet man in der apikalen Plasmamembran von Malpighischen Gefäßen (Niere, Day *et al.*, 2008; Chintapalli *et al.*, 2013). SLC9B2 aus der Maus wurde im Pankreas, der Niere und in Osteoklasten gefunden (Xiang *et al.*, 2007; Battaglini *et al.*, 2008). Kondapalli und Kollegen konnten 2012 erste Hinweise darauf geben, dass es sich bei SLC9B2 um einen funktionstüchtigen Austauscher handelt (Kondapalli *et al.*, 2012). 2016 wurden sowohl SLC9B1 als auch SLC9B2 in Mausspermien identifiziert (Chen *et al.*, 2016). Ein *knockout* von jeweils einem der beiden Austauscher resultiert in verminderter

Fertilität und Spermienmotilität, während männliche Mäuse (bzw. Mausspermien), in denen beide Austauscher ausgeschaltet sind (Doppel-*knockout*), komplett infertil (bzw. nicht-motil) sind.

Bisher wurde die Struktur von zwei prokaryotischen CPA2-Austauschern aufgeklärt: NhaA aus *E. coli* (Hunte *et al.*, 2005) und NapA aus *Thermus thermophilus* (*Tt*NapA, Lee *et al.*, 2013). Physiologisch nutzen beide Austauscher einen einwärtsgerichteten H^+ -Gradienten um Na^+ -Ionen nach außen zu transportieren. Dies geschieht bei *Ec*NhaA mit einer Stöchiometrie von $2 H^+ : 1 Na^+$ und ermöglicht dem Bakterium das Überleben in salzigen (Na^+ -reichen) Umgebungen (Padan *et al.*, 1989). Die Stöchiometrie von *Tt*NapA ist unbekannt. Ein elektrogener Austausch wird jedoch vermutet, da *Tt*NapA spannungsabhängig ist (Lee, Sykes & Fliegel, 2013). *Ec*NhaA wird durch den pH moduliert; bei einem Anstieg des pH_e von 7,0 bis 8,5 steigt die Austauschaktivität um drei Größenordnungen an (Taglicht, Padan & Schuldiner, 1991). Dabei besitzt *Ec*NhaA im Vergleich zu *Tt*NapA oder *Mj*NhaP1 (je 100 Transportzyklen pro Minute) eine extrem hohe Umsatzrate ($10^5/\text{min}$, Lee *et al.*, 2013; Paulino *et al.*, 2014; Taglicht *et al.*, 1991). *Ec*NhaA wird durch das Amilorid-Derivat 2-Aminoperimidin blockiert (Mochizuki-oda & Oosawa, 1985; Dibrov *et al.*, 2005).

(iii) Die Einteilung von SLC9C1 in die NaT-DC-Familie

Über SLC9C-Austauscher ist wenig bekannt. Wang und Kollegen identifizierten 2003 SLC9C1 in Mausspermien (auch bekannt als sNHE oder spNHE, Wang *et al.*, 2003). Genomanalysen deuteten 2006 einen zweiten putativen Austauscher (SLC9C2) in Testisgewebe der Maus an (Kimura *et al.*, 2006). Eine generalisierte Transportgleichung konnte bis heute aufgrund mangelnder Daten nicht aufgestellt werden. SLC9C1^{-/-} Mausspermien sind nicht-motil und männliche SLC9C1^{-/-} Mäuse dadurch infertil (Wang *et al.*, 2003). Alkalisierung der Spermien durch Ammoniumchlorid (NH_4Cl) konnte den Phänotyp teilweise retten. Interessanterweise konnte die Zugabe von membrangängigem zyklischen Adenosin-3'5'-Monophosphat (cAMP) Motilität und Fertilität fast vollständig wiederherstellen (Wang *et al.*, 2003). SLC9C1 konnte bis heute nicht heterolog exprimiert werden. Wang und Kollegen konstruierten aus diesem Grund 2007 eine Chimäre aus *Mm*SLC9A1 und *Mm*SLC9C1 (Wang *et al.*, 2007), die zusammen mit einer löslichen Adenylatcyclase (sAC) in HEK- (*human embryonic kidney*) Zellen exprimiert werden konnte (Wang *et al.*, 2007). Die Zellen zeigten eine erhöhte Resistenz gegen wiederholte Ansäuerung

1. Einleitung

im Vergleich zu Zellen ohne die Austauschermoleküle. Es ist unklar, ob es sich dabei um einen Na^+/H^+ -Austausch handelt.

Brett und Kollegen konnten SLC9-Austauscher auf Basis des evolutionären Ursprungs in die Untergruppen CPA1 und CPA2 aufteilen (Brett, Donowitz & Rao, 2005). Der 2003 entdeckte, spermien-spezifische Na^+/H^+ -Austauscher *MmSLC9C1* (Wang *et al.*, 2003) fiel in dieser Aufteilung aus dem Raster und wurde in eine gesonderte Familie abgeschoben, der „*Na⁺-transporting carboxylic acid decarboxylase*“- (Abbildung 1-1, NaT-DC) Familie. Die Begründung von Brett und Kollegen gibt dabei einen Hinweis auf die ungewöhnliche Beschaffenheit von SLC9C1;

“It is noteworthy that the recently discovered sperm-specific Na^+/H^+ exchangers found in mouse (...) and human do not cluster with other mammalian NHE genes and only weakly associate with the NaT-DC clade. Because they have no distinct orthologs in nonmammalian genomes sequenced thus far, their evolutionary origins remain obscure.” (Brett, Donowitz & Rao, 2005)

Sequenzanalysen von SLC9C1 zeigten die Anwesenheit von drei Domänen, die man aus anderen Proteinfamilien kennt: eine Austauschermoleküldomäne (NHE-Domäne), eine Spannungssensordomäne (VSD) und eine Bindestelle für zyklische Nucleotide (CNBD, Wang *et al.*, 2003).

Zusammenfassend wurden drei Na^+/H^+ -Austauscher in Spermien identifiziert: SLC9B1, SLC9B2 und SLC9C1. Es ist unklar ob es sich bei diesen Proteinen um funktionelle Na^+/H^+ -Austauscher handelt. Die beiden SLC9B-Isoformen gehören zur CPA2-Familie. Die einzigen Na^+/H^+ -Austauscher dieser Familie wurden in Prokaryoten charakterisiert (Murer, Hopfer & Kinne, 1976; Goldberg *et al.*, 1987; Furrer *et al.*, 2007). SLC9C1 stellt einen Außenseiter in der CPA-Familie dar (Brett, Donowitz & Rao, 2005). Nur einer dieser Austauschermoleküle wurde bisher im heterologen System exprimiert, allerdings unvollständig und als Chimäre (*MmSLC9C1*, Wang *et al.*, 2007).

1.2 Spermienphysiologie

Wie könnte der molekulare Mechanismus des Na^+/H^+ -Austauschs in Spermien untersucht werden? Ein Modellorganismus für chemotaktisches Schwimmverhalten und Spermienphysiologie ist der Seeigel. Die beiden Seeigelspezies *Arbacia punctulata* und

Strongylocentrotus purpuratus sind in dieser Hinsicht am besten charakterisiert (Kaupp & Alvarez, 2016; Wachten, Jikeli & Kaupp, 2017). Bei der sexuellen Fortpflanzung verschmelzen die Geschlechtszellen (Gameten, Spermium und Oozyte/Eizelle) zu einer Zygote. Für eine erfolgreiche Befruchtung muss das Spermium den Weg zur Eizelle finden. Die Spermien der Seeigelspezies *S. purpuratus* und *A. punctulata* nutzen dafür den Mechanismus der Chemotaxis. Seeigel sind externe Befruchter; die Verschmelzung von Spermium und Eizelle findet außerhalb des Körpers statt. Nach der Freisetzung der Gameten in den Ozean sondert die Eizelle einen Lockstoff ab, der vom Spermium detektiert werden kann. (Hansbrough & Garbers, 1981; Ward *et al.*, 1985; Singh *et al.*, 1988). Für beide Seeigelspezies wurde der Lockstoff identifiziert; Speract (*sperm activating*) ist ein Peptid aus 10 Aminosäuren (Gly-Phe-Asp-Leu-Asn-Gly-Gly-Gly-Val-Gly) und wird von Eizellen aus *S. purpuratus* abgesondert, Resact (*respiration activating*) aus *A. punctulata* besitzt 14 Aminosäuren (Cys-Val-Thr-Gly-Ala-Pro-Gly-Cys-Val-Gly-Gly-Gly-Arg-Leu) wobei Cys1 und Cys8 eine Disulfidbrücke bilden (Hansbrough & Garbers, 1981; Suzuki & Garbers, 1984; Ward *et al.*, 1985). Der Lockstoffgradient, der sich um die Eizelle aufbaut, wird vom Spermium zur Navigation genutzt (Lillie, 1912; Kaupp *et al.*, 2003; Jikeli *et al.*, 2015). Das Flagellum des Spermiums dient dabei als Antenne mit einer außerordentlich hohen Dichte an Rezeptoren für den Lockstoff; pro μm^2 sitzen 9.500 Rezeptor-Guanylatzyklen (GC) in der Membran (Pichlo *et al.*, 2014). Zum Vergleich, eines der Moleküle mit der größten Dichte pro Zelle stellt das Rhodopsin in Photorezeptoren mit circa 26.000-45.000 Molekülen/ μm^2 dar (Dangott *et al.*, 1989; Fotiadis *et al.*, 2003; Gunkel *et al.*, 2015).

Experimentell ermöglichen schnelle Mischverfahren die Stimulation der Spermien mit dem Lockstoff (Johnson, 1986; Kaupp *et al.*, 2003, Seifert *et al.*, 2014). Durch den Einsatz von spannungs-, pH- und Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen können die Vorgänge, die in Spermien nach der Lockstoffstimulation stattfinden, untersucht werden (Abbildung 1-2, *A. punctulata*, Strünker *et al.*, 2015).

1. Einleitung

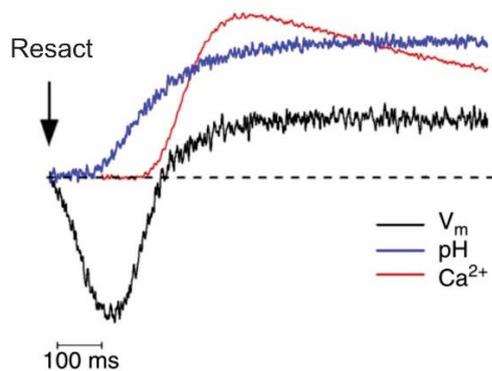


Abbildung 1-2: Vorgänge in Seeigelspermien (*A. punctulata*) nach einmaliger Stimulation mit dem Lockstoff Resact: Der Pfeil zeigt die Resact-Stimulation (25 pM) durch schnelle Mischverfahren. Gezeigt sind Änderungen in der Membranspannung (V_m , schwarz), des intrazellulären pH (blau) und der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (rot). Abbildung aus Strünker *et al.*, 2015.

Verfolgt man die Membranspannung (V_m) mit einem spannungssensitiven Farbstoff, beobachtet man bei der Stimulation mit dem Lockstoff eine transiente Hyperpolarisation (Zunahme von V_m zu negativeren Potentialen) mit anschließender Depolarisation (Abnahme von V_m , Abbildung 1-2, schwarz). Während der Hyperpolarisation kommt es zur Abnahme der intrazellulären Protonenkonzentration ($[H^+]_i$), also zu einer Alkalisierung des intrazellulären pH (pH_i , Abbildung 1-2, blau). Im Laufe der Depolarisation steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) schnell an; dieser Anstieg ist transient, nach einigen Sekunden sinkt $[Ca^{2+}]_i$ wieder ab (Abbildung 1-2, rot). Welche Mechanismen kontrollieren $[Ca^{2+}]_i$? Die Rezeptor-GC bindet den Lockstoff und synthetisiert zyklisches Guanosin-3'5'-Monophosphat (cGMP, Abbildung 1-3, Pichlo *et al.*, 2014). Zyklisches GMP öffnet einen K^+ -selektiven zyklisch Nukleotid-gesteuerten (CNGK)-Kanal (Bönigk *et al.*, 2009). Der resultierende K^+ -Ausstrom hyperpolarisiert die Zelle (Abbildung 1-2, schwarz). Die Hyperpolarisation öffnet den hyperpolarisationsaktivierten und zyklisch Nukleotid-modulierten (HCN)-Kanal (SpIH, Gauss *et al.*, 1998). Dieser ist im Vergleich zu klassischen K^+ -Kanälen nur schwach K^+ -selektiv und leitet im offenen Zustand einen Na^+ -Einstrom, der die Membran depolarisiert. Die Depolarisation und die Alkalisierung sind die beiden Stimuli, welche den CatSper- Ca^{2+} -Kanal öffnen und so einen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ zur Folge haben (Strünker *et al.*, 2011).

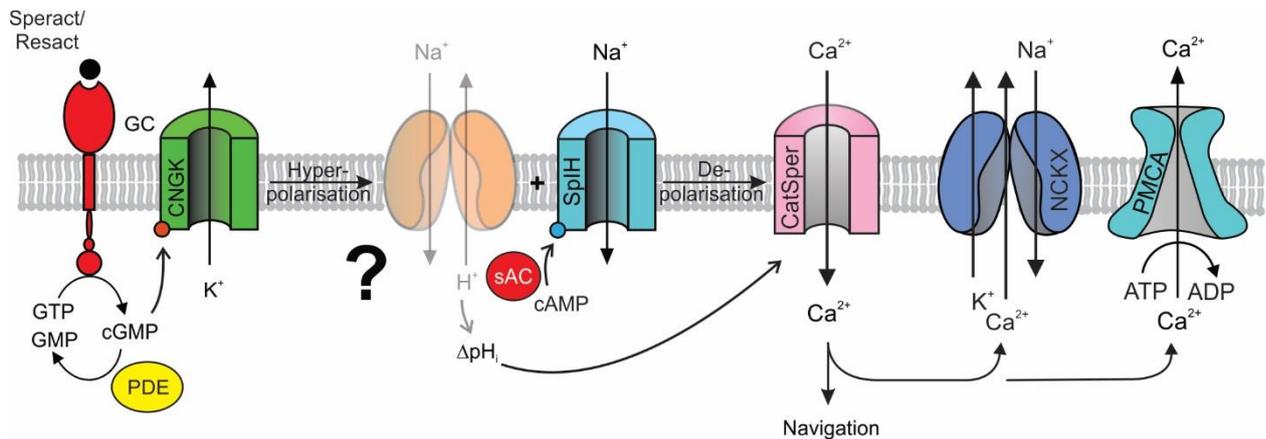


Abbildung 1-3: Chemotaktischer Signalweg in den Seeigelspezies *A. punctulata* und *S. purpuratus*: Eine Rezeptor-Guanylatzyklase synthetisiert bei Lockstoffbindung (Speract: *S. purpuratus*, Resact: *A. punctulata*) cGMP und öffnet einen K⁺-selektiven zyklisch Nukleotid-gesteuerten (CNGK)-Kanal. Dieser hyperpolarisiert das Spermium und öffnet einen hyperpolarisationsaktivierten und zyklisch Nukleotid-modulierten (HCN)-Kanal (SpIH). Die resultierende Depolarisation, zusammen mit einer intrazellulären Alkalisierung (ΔpH_i), öffnet den CatSper-Ca²⁺-Kanal. Die Änderung von $[Ca^{2+}]_i$ ermöglicht dem Spermium die Navigation im Lockstoffgradienten. Ein Na⁺/Ca²⁺/K⁺ Austauscher (NCKX) und eine Ca²⁺-ATPase (PMCA) transportieren Ca²⁺-Ionen anschließend aus der Zelle. Der molekulare Mechanismus hinter ΔpH_i ist nicht bekannt.

Nach der Stimulation mit dem Lockstoff kehrt $[Ca^{2+}]_i$ auf den Ausgangswert zurück. Zuständig dafür sind der Na⁺/Ca²⁺/K⁺ Austauscher (NCKX, Su & Vacquier 2002) und eine Ca²⁺-ATPase (PMCA, Abbildung 1-3, Gunaratne *et al.*, 2006; Gunaratne & Vacquier 2006).

Das Spermium bewegt sich auf einer helikalen Schwimmbahn fort (Abbildung 1-4a). Dabei sammelt es über die Zeit Informationen zur Lockstoffkonzentration in der Umgebung (*temporal sensing*, Berg & Brown 1972; Alvarez *et al.*, 2014). Schwimmt das Spermium in Richtung abnehmender Lockstoffkonzentration, resultiert das in einem asymmetrischen Schlagverhalten des Flagellums und dadurch in einer Krümmung der helikalen Schwimmbahn (Abbildung 1-4a, rote Pfeile, Alvarez *et al.*, 2012; Seifert *et al.*, 2014; Jikeli *et al.*, 2015).

Die Regulation des Ca²⁺-Einstroms ist Dreh- und Angelpunkt dieses chemotaktischen Schwimmverhaltens. Alvarez und Kollegen konnten zeigen, dass Seeigelspermien auf ihrem Weg nicht die absolute Ca²⁺-Konzentration sondern ihre zeitliche Änderung nutzen um zum Ei zu navigieren (Alvarez *et al.*, 2012; Kashikar *et al.*, 2012). Es ist noch unklar, welcher molekulare Mechanismus dazu führt, dass Ca²⁺-Ionen das Flagellum asymmetrisch schlagen lässt.

1. Einleitung

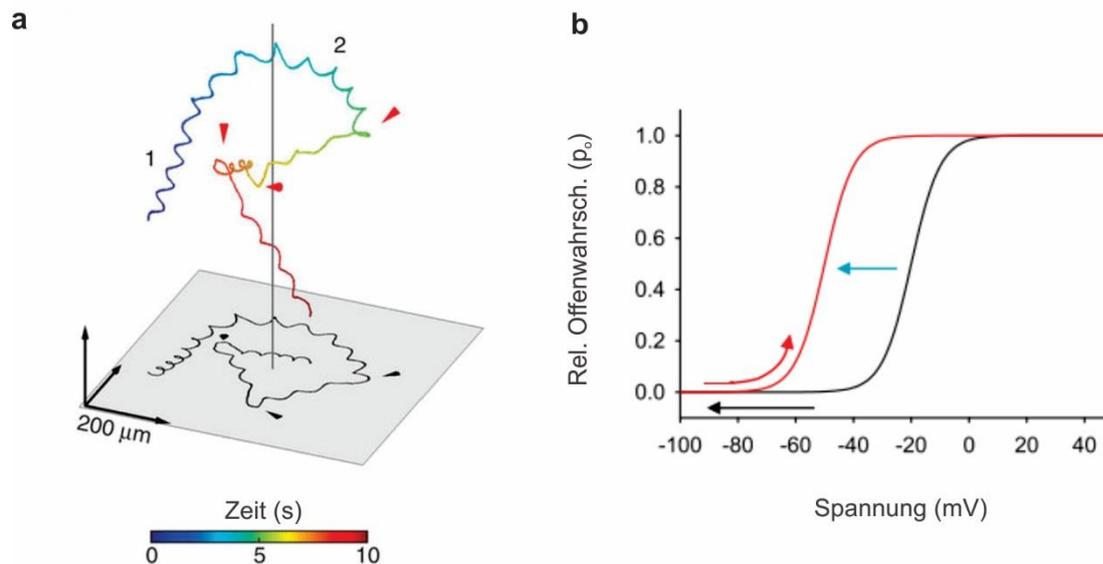


Abbildung 1-4: Schwimmverhalten von Seeigelspermien im Lockstoffgradienten und Modulation der Offenwahrscheinlichkeit von CatSper durch den pH_i . a) Die Achse senkrecht zur grauen Ebene zeigt die Freisetzung des Lockstoffs durch Photolyse an (Jikeli *et al.*, 2015). Sobald das Spermium zu niedrigeren Lockstoffkonzentrationen schwimmt, kommt es zur Neuausrichtung der helikalen Schwimmbahn (rote Pfeile). b) Die Spannungsabhängigkeit des CatSper- Ca^{2+} -Kanals wird durch intrazelluläre Alkalisierung zu negativeren Potentialen verschoben (blauer Pfeil). Bei Hyperpolarisation durch den CNGK-Kanal (schwarzer Pfeil) depolarisiert das Flagellum durch den SpIH-Kanal (siehe Abbildung 1-3). Das Zusammenwirken von Alkalisierung und Depolarisation führt zum Öffnen des CatSper-Kanals. Abbildung modifiziert nach Seifert *et al.*, 2014.

Der CatSper- Ca^{2+} -Kanal ist zuständig für den Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ im chemotaktischen Signalweg von Seeigelspermien (Seifert *et al.*, 2014). Er besteht aus vier homologen α -Untereinheiten (1-4) sowie fünf auxiliären Untereinheiten (β , γ , δ , ϵ und ζ , Navarro *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2017). CatSper ist sowohl spannungs- als auch pH_i -abhängig. Eine intrazelluläre Alkalisierung schiebt den Spannungswert der halbmaximalen Aktivierung ($V_{1/2}$) zu negativeren Potentialen (Seifert *et al.*, 2014). Das Ca^{2+} -Signal ist dabei mit einem Hill-Koeffizienten von 10,8 stark pH_i -abhängig. Die Alkalisierung ermöglicht es CatSper, im Laufe der Depolarisation zu öffnen (Abbildung 1-4b, Lishko *et al.*, 2012; Lishko & Kirichok 2010; Brenker *et al.*, 2012).

Wie wird das Zytosol des Spermiums alkalisiert? Es wurde ein spannungsabhängiger Na^+/H^+ -Austausch in Spermien von *S. purpuratus* beschrieben (Lee, 1984a, Lee 1984b; Lee & Garbers, 1986). Der Na^+/H^+ -Austausch wird durch den Lockstoff Speract aktiviert und

alkalisiert das Flagellum (Abbildung 1-3, orange). Fluorimetrische Untersuchungen an den Spermien zeigten, dass die Alkalisierung nur während der Hyperpolarisation stattfindet (Abbildung 1-2, Seifert *et al.*, 2014). Der molekulare Mechanismus, der diesem spannungsabhängigen Na^+/H^+ -Austausch zugrundeliegt, ist unbekannt.

Grundsätzlich können Ionenaustauscher eine gewisse Spannungsabhängigkeit des Transportprozesses aufweisen, wenn sie elektrogen sind (z.B. 2 H^+ gegen 1 Na^+ , Taglicht *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2013). Ein Beispiel sind die in Kapitel 1.1 besprochenen Na^+/H^+ -Austauscher der CPA2-Familie (Seite 4, Punkt (ii)). Die Austauschaktivität in Seeigelspermien ist allerdings elektroneutral (z.B. 1 H^+ gegen 1 Na^+ , Lee 1984a; Lee 1984b), was eher dagegen spricht, dass im Seeigelspermium ein SLC9B-Austauscher der CPA2-Familie existiert.

In Säugetierspermien scheinen der spermien-spezifische Austauscher SLC9C1 und die lösliche Adenylatzyklase funktionell verknüpft zu sein (Wang *et al.*, 2003, 2007). Die Anwesenheit der VSD und CNBD-Motive suggerieren, dass SLC9C1 spannungs- und cAMP/cGMP-abhängig ist. Dies ist aber nicht nachgewiesen worden, da sich SLC9C1-Proteine bisher nicht heterolog exprimieren ließen. Das SLC9C1-Gen wurde inzwischen auch in *S. purpuratus* identifiziert (*SpSLC9C1*, Nomura & Vacquier 2006). Wie in Mausspermien ist auch *SpSLC9C1* mit der löslichen AC assoziiert. Im Vergleich zu Säugetieren ist der Signalweg von Seeigelspermien weit besser verstanden. Das macht Seeigelspermien zu einem idealen Modell zur Untersuchung des spermien-spezifischen Na^+/H^+ -Austauschers SLC9C1.

1. Einleitung

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Bisherige Versuche, SLC9C1-Proteine funktionell zu exprimieren oder an intakten Spermien funktionell zu charakterisieren, scheiterten. Deshalb habe ich im Rahmen meiner Doktorarbeit untersucht, ob SLC9C1 dem Na⁺/H⁺-Austauscher in Seeigelspermien zugrunde liegt. Dabei kommen elektrophysiologische, molekularbiologische und biophysikalische Messverfahren zum Einsatz. Insbesondere stehen folgende Fragen im Vordergrund:

- Handelt es sich bei SLC9C1 um einen Na⁺/H⁺-Austauscher?
- Kann SLC9C1 durch die Membranspannung reguliert werden?
- Welchen Einfluss haben zyklische Nukleotide auf SLC9C1?
- Welche Rolle spielt SLC9C1 im chemotaktischen Signalweg von Seeigelspermien?

2. Material & Methoden

2.1 Lösungen und Medien

2.1.1 Lösungen für Spermienproben

Artifizielles Seewasser (ASW)

Natriumchlorid (NaCl)	423 mM
Calciumchlorid (CaCl ₂)	9,27 mM
Kaliumchlorid (KCl)	9 mM
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	22,94 mM
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	25,5 mM
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	0,1 mM
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	10 mM
pH, titriert mit Natriumhydroxid (NaOH)	7,8

Tabelle 2-1: Artifizielles Seewasser (ASW)

2.1.2 Lösungen für die Zellkultur

Fertiglösungen wurden (sobald nicht anders erwähnt) von der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) und Thermofischer Scientific (Waltham, USA) bezogen. Soweit erforderlich wurden sämtliche Lösungen durch Autoklavieren sterilisiert (30 min, 121°C).

F12-Medium

F12	500 ml
Fetales Kälberserum (Biochrome, Berlin)	10% (v/v)
Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)

Tabelle 2-2: F12-Medium

2. Material & Methoden

PBS-Puffer in H₂O

NaCl	137 mM
Dinatriumhydrogenphosphat	10 mM
KCl	2,6 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	1,9 mM
pH, titriert mit NaOH	7,2

Tabelle 2-3: PBS-Puffer

PLL-Lösung in H₂O

Poly-L-Lysin (PLL)	0,1 mg/ml
--------------------	-----------

Tabelle 2-4: PLL-Lösung

CT in H₂O

Triton-X100 (Sigma Aldrich, Saint Louis)	0,5% (v/v)
Chemiblocker (Millipore, Darmstadt)	5% (v/v)

Tabelle 2-5: CT

Stabilisierungspuffer in H₂O

HEPES	30 mM
KCl	70 mM
MgCl ₂	5 mM
EGTA	3 mM
Dithiothreitol (DTT)	1 mM
mPIC	0,2% (v/v)
pH, titriert mit NaOH	7,4

Tabelle 2-6: Stabilisierungspuffer

Hypotoner Lysepuffer in H₂O

HEPES	25 mM
NaCl	10 mM
EDTA	2 mM
DTT	1 mM
mPIC	0,2% (v/v)
pH, titriert mit NaOH	7,4

Tabelle 2-7: Hypotoner Lysepuffer**SDS Probenpuffer (4x) in H₂O**

TRIS/HCl	200 mM
SDS	8% (v/v)
Glyzerin	50% (v/v)
β-Mercaptoethanol	4% (v/v)
Bromphenolblau	0,04 % (w/v)
pH, titriert mit Hydrogenchlorid (HCl)	6,8

Tabelle 2-8: SDS Probenpuffer**2.1.3 Lösungen für die Elektrophysiologie****Extrazelluläre Lösung (ES) in H₂O**

NaCl	140 mM
KCl	5,4 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1,8 mM
HEPES	5 mM
Glucose	10 mM
pH, titriert mit NaOH	7,4

Tabelle 2-9: Extrazelluläre Lösung (ES)

2. Material & Methoden

Na⁺-substituierte NMDG⁺-ES in H₂O

N-Methyl-D-Glucamin (NMDG)	140 mM
KCl	5,4 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1,8 mM
HEPES	5 mM
Glucose	10 mM
pH, titriert mit HCl	7,4

Tabelle 2-10: Na⁺-substituierte ES

Na⁺-substituierte Li⁺-ES in H₂O

Lithiumchlorid (LiCl)	140 mM
KCl	5,4 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1,8 mM
HEPES	5 mM
Glucose	10 mM
pH, titriert mit HCl	7,4

Tabelle 2-11: Na⁺-substituierte Li⁺-ES

Symmetrische Na⁺/H⁺-ES

NaCl	14 mM
NMDG	126 mM
KCl	5,4 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1,8 mM
HEPES	5 mM
Glucose	10 mM
pH, titriert mit HCl	7,2

Tabelle 2-12: Symmetrische Na⁺/H⁺-ES

Pipettenlösung (IS) in H₂O

NaCl	10 mM
Kaliumaspartat	130 mM
EGTA	10 mM
CaCl ₂	1 mM
Dinatrium-Adenosin 5'-Triphosphat	2 mM
HEPES	1 mM
pH, titriert mit Kaliumhydroxid	7,2

Tabelle 2-13: Pipettenlösung (IS)**2.2 Fluoreszenzfarbstoffe**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fluorimetrische Messungen an Seeigelspermien sowie an Chinesische Hamsterovarien (CHO)-Zellen durchgeführt. Die Fluoreszenzmessungen an Spermien erfolgten in Zellpopulationen an der *Stopped-Flow*-Apparatur (Kapitel 2.4). Messungen an CHO-Zellen wurden in der Einzelzell-Fluorimetrie mit elektrophysiologischen Messverfahren kombiniert (Kapitel 2.7).

2.2.1 pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe

Änderungen des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) wurden mit dem Farbstoff BCECF (2',7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5(und-6) carboxyfluorescein) der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) untersucht. BCECF ist ein Fluorescein-Derivat, das seine Fluoreszenzeigenschaften pH-abhängig ändert.

BCECF kann ratiometrisch verwendet werden. Hierbei nutzt man die Tatsache, dass der Farbstoff bei verschiedenen Wellenlängen unterschiedlich auf pH-Änderungen reagiert. Zwei verschiedene Konfigurationen sind möglich. Auf der Anregungsseite (Emission gemessen bei 525 nm) ist der Farbstoff bei 480 nm pH-abhängig, bei 440 nm nicht (isosbestischer Punkt). Auf der Emissionsseite (angeregt bei 452/45 nm) steigt die Fluoreszenzintensität bei 492 nm mit dem pH-Wert an, bei 540 nm nimmt sie ab. Das jeweilige Fluoreszenzverhältnis R repräsentiert F_{480}/F_{440} in der ratiometrischen Anregung und F_{540}/F_{492} in der ratiometrischen Emission. Beide Verfahren sind unabhängig von Farbstoffkonzentration und Bleicheffekten. BCECF besitzt einen pK_s-Wert von 7,0 und ist damit optimal für pH-Messungen in biologischen Systemen geeignet. Für die Beladung über die Membran ist der polare Farbstoff

2. Material & Methoden

mit einem Acetoxymethyl (AM)-Ester gekoppelt. Dieser macht den Farbstoff unpolar und dadurch membrangängig. Der AM-Ester wird durch intrazelluläre Esterasen gespalten. Der Farbstoff reichert sich so in der Zelle an.

2.2.2 Spannungssensitive Fluoreszenzfarbstoffe

Veränderungen in der Membranspannung (V_m) können über Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der spannungsabhängige Farbstoff Di-8-ANEPPS (1-(3-sulfonatopropyl)-4-(beta-(2-(di-n-octylamino)-6-naphthyl)vinyl)pyridinium betaine) von der Firma Molecular Probes (Eugene, USA) verwendet. Er gehört zur Gruppe der „schnellen“ spannungssensitiven Farbstoffe (Ebner & Chen, 1995) und zeigt in wässriger Lösung praktisch keine Fluoreszenz. Diese entsteht sobald sich der amphiphatische Styryl-Farbstoff in die Zellmembran einlagert. Eine Änderung in V_m sorgt über eine Umverteilung der Elektronendichte im Molekül für die Verschiebung des Fluoreszenzspektrums. Die Zeitkonstante für diesen Prozess beträgt weniger als eine Millisekunde.

Um die Membranspannung V_m in *S. purpuratus* Spermien zu untersuchen, wurden Änderungen in der Fluoreszenz von Di-8-ANEPPS kalibriert (Strünker *et al.*, 2006; Seifert *et al.*, 2014). Dabei wurden die Spermien bei drei verschiedenen K^+ -Konzentrationen (9 mM, 30 mM und 100 mM) mit 10 nM Speract stimuliert. Mit verschiedenen K^+ -Konzentrationen änderte sich die Amplitude des Spannungssignals. Trägt man die Änderung des Fluoreszenzverhältnisses ΔR dabei gegen die extrazelluläre K^+ -Konzentrationen $[K^+]_e$ auf, kann die $[K^+]_e$ interpoliert werden, bei der eine Speract-Stimulation keine Fluoreszenzänderung zeigen würde. An diesem $[K^+]_e$ -„Null-Punkt“ kann über das Nernst-Potential von K^+ (E_K) die Ruhemembranspannung V_{rest} berechnet werden. Hinter dieser Methode steckt die Annahme, dass die intrazelluläre K^+ -Konzentration $[K^+]_i$ bekannt ist. Zusätzlich muss ΔR linear zu $[K^+]_e$ sein, um $\Delta R/mV$ bestimmen zu können. Die Gleichung

$$\Delta R = a \times \ln[K^+]_e + b$$

wurde an die Steigung der $[K^+]_e$ -Kalibrierung angepasst. Dabei ist a die Steigung und b der y-Achsenabschnitt bei dem $\Delta R = 0$. Die Änderung im Fluoreszenzverhältnis R wurde mit der Nernst-Gleichung

$$V_m = (RT/zF) \ln(e^{(\Delta R - b/a)}/[K^+]_i)$$

einer Membranspannung V_m zugeordnet. Für $[K^+]_i$ wurde ein Wert von 423 mM verwendet. Weiterhin ist in der Nernst-Gleichung R die ideale Gaskonstante ($8,314 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T die

Temperatur (291,15 K, 18°C), z die Valenz des Kations (1) und F die Faraday-Konstante ($9,649 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$).

2.2.3 Natriumsensitive Fluoreszenzfarbstoffe

In dieser Arbeit wurden Veränderungen von $[\text{Na}^+]_i$ mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Asante NaTRIUM Green-2 (ANG-2) gemessen. ANG-2 ist eine 2011 erschienene Weiterentwicklung des Na^+ -sensitiven ANG-1 der Firma TEFLabs (Austin, USA). Angeregt bei Licht der Wellenlänge 485 nm und gemessen bei einer Wellenlänge $>515 \text{ nm}$ zeigt er eine Zunahme der Fluoreszenzintensität bei steigenden Na^+ -Konzentrationen mit einem K_D (Dissoziationskonstante) von 38,6 mM (Lamy & Chatton, 2011).

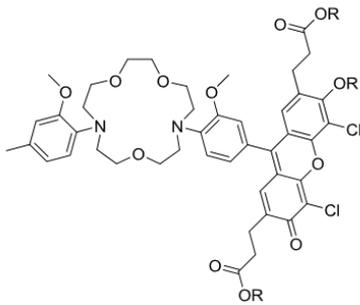


Abbildung 2-1: Molekülstruktur des Na^+ -abhängigen Fluoreszenzfarbstoff Asante NaTRIUM Green-2 (ANG-2).

2.3 Spermienproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Spermienproben der Seeigelgattung *S. purpuratus* untersucht. Diese wurden vom Marine Resources Center des Marine Biological Laboratory (MBL) Woods Hole, Massachusetts (USA) bereitgestellt. Entnahme der Proben (*dry sperm*) erfolgte durch Injektion von circa 500 μl einer 0,5 M KCl-Lösung in das Coelom des Seeigels. Das austretende Ejakulat wurde mit einer Pasteur-Pipette in ein Eppendorf-Gefäß überführt und auf Eis gelagert.

2. Material & Methoden

2.4 Die *Stopped-Flow*-Apparatur

Experimente an Spermienpopulationen wurden im Rahmen dieser Arbeit an einer *Stopped-Flow*-Apparatur SFM400 der Firma BioLogic (Caix, Frankreich) durchgeführt. Die *Stopped-Flow*-Apparatur erlaubt die Untersuchung biochemischer Reaktionen wenige Millisekunden nach dem Reaktionsstart (Johnson, 1986). Dabei werden die Proben über ein computergesteuertes Spritzensystem in einer Mischkammer gemischt und in eine Messkammer (Küvette) geleitet.

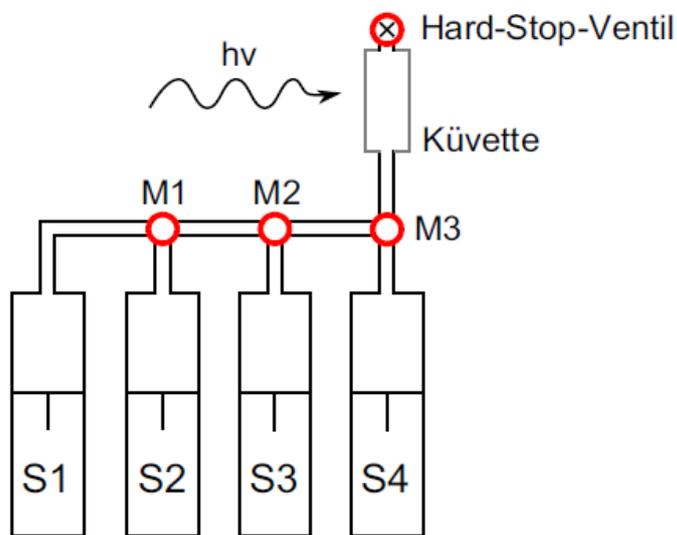


Abbildung 2-2: Schematische Abbildung der *Stopped-Flow*-Apparatur: Abbildung aus Brenker 2011.

Kernstück des Apparates ist das SFM-400-Modul mit vier Spritzen (S1-S4), die über externe Eingänge beladen werden. Die Beladung und Operation der Spritzen über Schrittmotoren findet durch eine Kontrolleinheit (MPS-60, BioLogic) statt und wird über die Biokine-Software (V 4.45, BioLogic) gesteuert. Die Lösungen können in drei Mischkammern (M1-M3) gemischt werden (Abbildung 2-2). Das Volumen der Röhren zwischen den Kammern M1 und M2 beträgt 17 μl , das zwischen den Kammer M2 und M3 22 μl . Als Messkammer hinter M3 diente eine Quarzküvette (FC-15) mit einem Volumen von 31 μl . Um Schwankungen der Flüssigkeitssäule in der Küvette zu vermeiden, wird der Probenfluss in der Küvette durch ein *Hard-Stop*-Ventil angehalten. Auch dieses wird über die Biokine-Software gesteuert.

2.4.1 Stopped-Flow-Fluorimetrie

Bei den hier durchgeführten Messungen wurden die Spermienproben in Spritze S4 und die Stimulationslösung in Spritze S3 geladen. Spritze S1 wurde mit Artifiziellem Seewasser (ASW) befüllt und diente zum Spülen zwischen den Messzyklen. S2 wurde befüllt, aber nicht verwendet. Ein Messzyklus beginnt mit einer Synchronisationsphase von 50 ms. Anschließend wurde das System 200 ms lang mit 200 μ l ASW durchspült (Flussrate 1 ml/s). Nach einer Pause von 300 ms wurden 100 μ l Stimulationslösung und 100 μ l Spermienlösung 50 ms lang (Flussrate 4 ml/s) in Kammer M3 gemischt. Das *Hard-Stop*-Ventil stoppt den Fluss nach 50 ms. Unter den genannten Bedingungen beträgt die Totzeit zwischen Kammer M3 und der Messküvette 9.1 ms. Eine geringere Flussrate resultiert in größeren Totzeiten (1,33 ml/s \triangleq 27,51 ms, 1 ml/s \triangleq 36,6 ms). Die pH_i - und Na^+ -Signale werden durch das Fluoreszenzverhältnis R von F_{494}/F_{540} bzw. die Fluoreszenz von 536 nm repräsentiert. Die dargestellten Spuren sind der Mittelwert von mindestens zwei Messungen, sie sind dargestellt als Prozent Änderung ($\Delta R/R$) in Relation zu den ersten 10-20 Datenpunkten nach Mischung.

Die Fluoreszenz wurde mithilfe einer LED-Lichtquelle (Lumencor, Beaverton, USA) angeregt. Sie wurde mit zwei Photomultipliern links und rechts der Messküvette (H9656-20, Hamamatsu Photonics, Japan) mit angeschlossenem Verstärker (C7169, Hamamatsu) gemessen. Die Abtastfrequenz der angeschlossenen *lock-in*-Verstärker (Ametek Signal Recovery, Modell 7230 DSP, Ametek, Paoli, USA) betrug 2-10 kHz und wurde mit einem Frequenzgenerator gesteuert (GW Instek, SFG2004). Die Temperatur in der Apparatur betrug 18°C. Gemessen wurde über 5 s bei den Spannungsmessungen und 10 s bei den pH - und Na^+ -Messungen.

Für Experimente mit BCECF wurde das Anregungslicht durch einen Brightline 452/45 nm Filter (Semrock, Rochester, USA) geleitet. Die Fluoreszenz wurde in der dualen Emission durch einen Brightline 494/20 nm und einen 540/15 nm Filter (Semrock) gemessen. Das Fluoreszenz-Verhältnis F_{494}/F_{540} repräsentiert das pH_i -Signal. Gemischt wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,33 ml/s.

Für Experimente mit Di-8-ANEPPS wurde das Anregungslicht durch einen Brightline 494/20 nm Filter (Semrock) geleitet. Die Fluoreszenz wurde in der dualen Emission durch einen Brightline 536/40 nm und einen Brightline 628/40 Filter (Semrock) gemessen. Das Fluoreszenz-Verhältnis F_{536}/F_{628} repräsentiert das V_m -Signal. Für Di-8-ANEPPS wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 4 ml/s gemessen.

2. Material & Methoden

Für Experimente mit ANG-2 wurde mit einer LED (340 mA, 77 kHz) durch einen 485/25 nm Filter (AHF, Tübingen, Deutschland) angeregt und durch einen Emissionsfilter 536/40 nm (Semrock) gemessen. Gemischt wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,33 ml/s.

2.4.2 Beladung der Spermienproben mit Fluoreszenzfarbstoffen

Zur Beladung wurde die *dry-sperm*-Probe 1:6 in ASW verdünnt und mit den jeweiligen Farbstoffen auf 18°C inkubiert. Für Messungen mit ANG-2 wurde der 1:6 Verdünnung zusätzlich Pluronic (20%, Molecular Probes) beigefügt (Endkonzentration 0,5%). Die einzelnen Beladungszeiten, Konzentrationen sowie Anregungs- und Emissions-Wellenlängen sind in Tabelle 2-14 zusammengefasst. Im Anschluss an die Beladung wurde die Probe 1:20 in ASW verdünnt (1:120 total) und für 5 min bei 18°C inkubiert.

Farbstoff	Konzentration	Beladungszeit	Anregung	Emission
BCECF-AM	10 µM	10 min	452/45 nm	494/20 nm, 540/15 nm
Di-8-ANEPPS	5 µM	5 min	494/20 nm	536/40 nm, 628/40 nm
ANG-2	10 µM	60 min	485 nm	536/40 nm

Tabelle 2-14: Beladung der verschiedenen Farbstoffe in 1:6 Verdünnung.

2.4.3 Immunhistochemie

Zum Nachweis von *SpSLC9C1* in Spermien wurde ein polyklonaler Antikörper generiert. Die *SpSLC9C1* Epitope aus *S. purpuratus* sind identisch zu *SpSLC9C1* Epitopen aus *A. punctulata* (Tabelle 2-15). Die Peptide wurden von der Firma David's Biotechnology (Regensburg, Deutschland) synthetisiert. Zwei Kaninchen wurden mit einem Mix aus den vier Peptiden (David's Biotechnology) immunisiert. Die Seren wurden gereinigt und zusammen mit einem (ungereinigten) Präimmunserum zur Kontrolle bereitgestellt. Das Resultat waren zwei polyklonale Antikörper SU1 und SU2 (gereinigt) sowie zwei Präimmunseren (ungereinigt).

Peptid-Sequenzen

EFADMMEEARLRMLKAEK

MVDNKKILRELKHIS

KMKRLMNAPSSIPPPPPENLL

GWTQEKVKLHLERGYL

Tabelle 2-15: Aminosäuresequenzen der SpSLC9C1-Epitope zur Herstellung polyklonaler Antikörper.

Spermienproben aus *S. purpuratus* für die Immunhistochemie wurden durch Dr. R. Seifert, H. Hamzeh und Prof. Dr. U.B. Kaupp im MBL Woods Hole, Massachusetts (USA, Kapitel 2.3) entnommen und auf 4°C gekühlt verschickt. Die Proben wurden in Bonn untersucht. Im ersten Schritt wurden die Spermien 1:10.000 in ASW verdünnt. Objektträger (Superfrost Plus, Thermo Fischer Scientific Menzel BV. & Co.KG) wurden mit einem Fettstift am Rand präpariert, um 1 ml der Spermienprobe aufzutragen. Nach Absetzen der Spermien (mindestens 3 h) auf 4°C wurde das ASW vorsichtig abgenommen und mit 4% Paraformaldehyd für 5-10 min zur Fixierung ersetzt. Die Probe wurde im Anschluss an zwei Waschschrte mit PBS für 1 h in CT inkubiert. Der primäre Antikörper bzw. das Präimmunserum wurden ü.N. bei 4°C in CT verdünnt inkubiert. Um den aufgereinigten Antikörper mit dem ungereinigten Präimmunserum vergleichen zu können, wurde das Präimmunserum 10x verdünnt eingesetzt. Dieser Wert wurde gewählt, weil üblicherweise circa 90% des Proteins bei der Aufreinigung der Antikörper verloren gehen. Am nächsten Tag wurde die Probe im Anschluss an drei Waschschrte mit CT für 1-2 h bei 4°C im Dunkeln mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Zum Schluss wurden die Objektträger noch zweimal gewaschen (PBS) und mit Aqua Poly/Mount (PolySciences Inc., Warrington, USA) unter 1,5H Plättchen (High Precision, Superior Marienfeld) eingedeckelt. Tabelle 2-16 und Tabelle 2-17 zeigen die in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper und ihre jeweiligen Verdünnungen in CT.

Antigen	Antikörper	Spezies	Verdünnung	Anbieter
<i>Sp</i> SLC9C1	SU1	Kaninchen	1:400	David's Biotechnology
<i>Sp</i> SLC9C1	SU2	Kaninchen	1:750	David's Biotechnology

Tabelle 2-16: Liste der Polyklonalen Antikörper: Angegeben sind Antigen, Name, Spezies der zur Herstellung immunisierten Tiere, eingesetzte Verdünnung in der Immunhistochemie und Anbieter der Antikörper.

2. Material & Methoden

Antigen	Fluorophor	Spezies	Verdünnung	Anbieter
Kaninchen	A488	Esel	1:500	Dianova

Tabelle 2-17: Eingesetzter sekundärer Antikörper: Angegeben sind Antigen, Fluorophor, Spezies der zur Herstellung immunisierten Tiere, eingesetzte Verdünnung in der Immunhistochemie und Anbieter der Antikörper.

2.5 Zellkultur und heterologe Genexpression

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einer immortalisierten CHO-Zelllinie gearbeitet. Zur Erhaltung wurden die Zellen in FCS-komplettiertem F12-Medium (Life Technologies, Carlsbad, USA) kultiviert (10% v/v) und bei 37°C (5% CO₂) gelagert. Die verwendeten DNA-Konstrukte wurden freundlicherweise von Dr. W. Bönigk bereitgestellt.

2.5.1 Herstellung einer stabilen *SpSLC9C1*-Zelllinie

Zur Untersuchung von *SpSLC9C1* wurde eine Zelllinie hergestellt, die den Austausch stabil ins Genom integriert hat. Zunächst wurde die DNA von *SpSLC9C1* mit der kodierenden Sequenz für ein humanes Influenza-Hämagglutinin (HA)-Epitop versehen, um die Expression mit einem anti-HA-Antikörper nachweisen zu können. Die *SpSLC9C1*-DNA wurde dann über Elektroporation in die Zelle gebracht. Bei dieser Methode wird die Zellmembran durch kurze Pulse einer Kondensator-Entladung permeabilisiert und somit durchlässig für die DNA.

Konfluent bewachsene 9 cm Schalen mit CHO-Wildtyp (WT)-Zellen (CHO-K1) wurden mit Trypsin abgelöst und in F12-Medium aufgenommen. Nach Zentrifugation im Eppendorf-Reaktionsgefäß (5 min bei 200 g) und Abnahme des Überstands wurden die Zellen so mit PBS resuspendiert, dass eine Zellkonzentration von 5x10⁶ Zellen/ml vorlag. 125 µl dieser Suspension wurden durch eine weitere Zentrifugation (5 min bei 200 g) pelletiert und in 125 µl „Puffer R“ (Invitrogen) resuspendiert. Nach Zugabe der DNA (2 µg) wurde der Transfektionsansatz (Zellsuspension in „Puffer R“ + DNA) in einer speziellen Goldspitze (100 µl, Invitrogen) aufgezogen und in die Elektroporationskammer des Mikroporators (Digital Bio Neon Transfection System, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) gestellt. Die Elektroporationskammer enthielt den Puffer „E₂“ (Invitrogen). Elektroporiert wurde mit drei Spannungspulsen von je 0,1 ms und 1245 V/Puls. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 5 cm Schalen mit 5 ml vorgelegtem F12 ausgesät.

Am Folgetag wurden die Zellen Trypsin abgelöst und auf 9 cm Schalen ausgesät. Die konfluent angewachsenen Zellen wurden nach ein bis zwei Tagen mit Trypsin abgelöst und in aufsteigenden Verdünnungen (1:10-1:10.000) auf 9 cm Schalen ausgesät. Drei Tage nach der Aussaat wurde das F12-Medium mit dem Antibiotikum Geneticin (G-418) zur Selektion der positiv transfizierten Zellen versetzt. Geneticin ist ein Antibiotikum, das die Proteinbiosynthese von Säugerzellen hemmt. Das Plasmid der transfizierten DNA kodiert neben *SpSLC9C1* zusätzlich das Gen der Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase. Dieses Enzym phosphoryliert die Hydroxylgruppen von Geneticin, wodurch dessen antibiotische Wirksamkeit verloren geht. Nur die Zellen, die die DNA stabil ins Genom integrierten, überleben die Antibiotikabehandlung.

Picken von homogenen Zellklonen

Die verdünnt ausgesäten Zellsuspensionen (1:10-1:10.000) bildeten bei optimaler Verdünnung vereinzelte Zellkolonien, die auf eine einzelne Vorläuferzelle zurückgehen. Diese Kolonien wurden markiert und mithilfe vorgefertigter Plastikringe (abgeschnittene 1 µl-Pipettenspitzen) mit silikonbeschichteter Unterseite „gepickt“. Dabei werden die markierten Kolonien mit dem Ring vom Rest der 9 cm Schale isoliert und separat mit Trypsin (25 µl) abgelöst. Die abgelösten homogenen Zellen wurden aspiriert und auf 96-Well-Zellkultur-Platten mit vorgelegtem F12-Medium übertragen. Dort wurden die Zellen hochgezogen und immunzytochemisch (siehe Kapitel 2.5.4) auf positive Klone getestet.

2.5.2 Transiente Genexpression

CHO-Zellen wurden mithilfe von Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Invitrogen) transfiziert. Bei dieser Methode werden Liposomen-Komplexe gebildet, die den Transfer der DNA in die Zelle erleichtert (Dalby *et al.*, 2004). Die Liposomen bestehen aus kationischen und neutralen Lipiden, die das anionische Rückgrat der DNA binden. Der Liposomen/DNA-Komplex überwindet die elektrostatische Hürde der Plasmamembran durch Fusion. Es wurden CHO-*SpSLC9C1*-Zellen transient mit *H_v1*-DNA, oder CHO-*H_v1*-Zellen mit den jeweiligen *SpSLC9C1*-Mutanten-DNA (*SpSLC9C1*-R399A, -R803Q, -R1053Q) transfiziert.

Es wurden 6×10^4 Zellen/Schale auf 4-Well-Zellkulturschalen mit 5 mm PLL-beschichteten Glasplättchen ausgesät und ü.N. auf 37°C (5% CO₂) zum Anwachsen inkubiert. Am Folgetag wurde jede Kulturschale mit PBS gewaschen und 400 µl OptiMEM Medium (Invitrogen)

2. Material & Methoden

vorgelegt. Für jede Schale wurden 50 µl mit 0,8-1,4 µg DNA und 50 µl mit 2 µl Lipofectamin 2000 separat in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 5 min bei RT in OptiMEM inkubiert. Anschließend wurden die beiden Ansätze gemischt (100 µl final, DNA + Lipofectamin 2000) und nach 20 min bei RT auf die Zellen gegeben. Der DNA/Lipofectamin 2000-Mix in der Zellkulturschale wurde für 4-6 Stunden bei 37°C (5% CO₂) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und in F12 gehalten.

2.5.3 SDS-Gelelektrophorese und *Western-Blot*-Analyse

Zur Untersuchung der positiven Klone aus der stabilen Zelllinie (Kapitel 2.5.1) wurden Proteine aus den Zelllinien präpariert. Diese wurden anschließend über Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und mit *Western-Blot*-Analyse immunologisch untersucht.

Proteinpräparation

Zur Proteinpräparation aus CHO-Zellen wurden konfluent bewachsene 9 cm Schalen in 1 ml PBS-EDTA mithilfe eines Gummispatels vom Schalenboden entfernt und anschließend für 5 min bei 500 g pelletiert. Das Pellet wurde im hypotonen Lysepuffer resuspendiert und für 5 min auf Eis gelagert. Zusätzlich zur hypotonen Zell-Lyse wurde die Zellsuspension durch eine Kanüle gezogen und 10 sek sonifiziert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bicinchoninsäure (*bicinchonic acid*, BCA)-Assay nach Lowry ermittelt (Gornall, Bardawill & David, 1949).

Konzentrationsbestimmung durch den BCA-Assay

Grundlage der Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem BCA-Assay ist die Biuret-Reaktion. Cu²⁺-Ionen bilden zusammen mit vier Peptidbindungen einen Komplex. Dabei wird Cu²⁺ zu Cu¹⁺ reduziert. Anschließend chelatieren zwei Moleküle BCA ein Cu¹⁺-Ion und bilden einen dunkelvioletten Farbkomplex der photometrisch gemessen werden kann. Die Absorption bei 562 nm ist proportional zur Proteinkonzentration mit einer Nachweisgrenze von 10 µg/ml. Zur Kalibrierung wird eine Verdünnungsreihe mit BSA-Lösung (*Bovine Serum Albumin*) angesetzt. Proteinproben und BSA-Kalibrierungsreihe wurden mit einem Gesamtvolumen von

20 µl/Schale in eine 24-Well-Platte gegeben und mit je 180 µl BCA (auf 200 µl/Schale) aufgefüllt (Thermofischer BCA-Assay-Kit, Lösung B und Lösung A im Verhältnis 1:50). Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm in einem *Plate-Reader* gemessen (Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA) und die Proteinkonzentration anhand einer Ausgleichsgerade durch den BSA-Standard bestimmt.

Auftrennung von Proteinen im SDS-Gel

Proteine wurden über eine SDS-PAGE in Anlehnung an Laemmli aufgetrennt (Laemmli, 1970). Das Trenngel enthielt 10% Acrylamid, das Sammelgel 5% (siehe Tabelle 2-18 und Tabelle 2-19). Der SDS-Probenpuffer (4x) wurde mit der gewünschten Proteinprobe 1:4 verdünnt und 5 min bei 95°C erhitzt. Die Auftrennung von je 15-30 µg Protein im Sammelgel erfolgte bei 12-15 mA, im Trenngel bei 24-30 mA. Als Marker wurde der *Applichem Prestained Protein Marker VI* (PanReac, Applichem, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen.

SDS-Sammelgel (5%)

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,5 ml
10% (w/v) SDS	20 µl
30% Acrylamid	340 ml
10% (w/v) Ammoniumpersulfat	40 µl
TEMED	3 µl
H ₂ O	1,12 ml

Tabelle 2-18: Zusammensetzung eines 5%igen SDS-Sammelgels.

SDS-Trenngel (10%)

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,5 ml
10% (w/v) SDS	60 µl
30% Acrylamid	2 ml
10% (w/v) Ammoniumpersulfat	40 µl
TEMED	3 µl
H ₂ O	2,42 ml

Tabelle 2-19: Zusammensetzung eines 10%igen SDS-Trenngels.

2. Material & Methoden

Transfer von Protein auf Blotmembran (Western Blot) und immunologischer Nachweis

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden diese auf eine PVDF-Blotmembran transferiert (Immobilon P, Millipore, Towbin, Staehelin, & Gordon 1979). Für den Transfer wurde ein Maxi Semi-dry-Blotter T788.1 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert und zusammen mit dem Gel im *semi-dry*-Verfahren zwischen die Elektroden gelegt. Der Transfer wurde über 35-45 min bei 2,4 mA/cm² Gelfläche durchgeführt. Der Erfolg des Transfers konnte anhand des *Prestained Protein Marker VI* überprüft werden. Zusätzlich wurde das SDS-Gel für 24 h in Coomassie Brilliant Blue R 250 (Applichem, Darmstadt) gefärbt.

Um den HA-markierten *SpSLC9C1* nachzuweisen, wurde die Membran mit Anti-HA-Antikörpern inkubiert. Nach Reaktivierung der getrockneten Membran in Methanol wurde sie für 30 min in PBS-T mit 2,5% Milchpulver (w/v) blockiert und anschließend für 5 min in PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Ratte- α -HA, 1:5000, Kremmer, HZ München, Deutschland) in PBS-T für 60 min bei RT. Nach zwei weiteren Waschschritten (PBS) wurde die Membran mit dem speziesspezifischen sekundären Antikörper für 45 min inkubiert (Ziege- α -Ratte-Meerrettich-Peroxidase, 1:5000, *horseradish-peroxidase*, HRP). Nach einem letzten Waschschriff (PBS) wurde die Membran für 5 min mit dem *Chemiluminescence Detection for Horseradish Peroxidase Substrate 3* (Applichem) behandelt. Durch Zugabe dieser *enhanced chemiluminescence*-Lösung wurden die Komplexe aus HA-markiertem Protein, primären und sekundären Antikörper über eine Chemielumineszenzreaktion nachgewiesen. Dabei kommt es durch die Oxidation von Luminol zur Chemilumineszenz. Die Detektion erfolgte auf einem CCD-Imaging System (LAS-3000, Fuji Photo Film, Düsseldorf, Deutschland).

2.5.4 Immunzytochemie und Membransheets

Im Rahmen dieser Arbeit wurden CHO-*SpSLC9C1*-Zellen immunzytochemisch untersucht. Dabei wurden primäre (Antigen spezifische) Antikörper und sekundäre (fluoreszente) Antikörper verwendet. Primäre Antikörper dienen der Erkennung und Bindung spezifischer Antigene (z.B. einer bestimmten Aminosäuresequenz im Protein). Die primären Antikörper können anschließend von fluoreszenzmarkierten, sekundären Antikörpern nachgewiesen und so im Mikroskop sichtbar gemacht werden. Neben immunreaktiven Molekülen (Antikörpern), wurde zusätzlich 4'6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zur Markierung von DNA benutzt. Eine

Liste der benutzten primären und sekundären Antikörper sind jeweils in Tabelle 2-20 und Tabelle 2-21 aufgelistet.

Antigen	Antikörper	Spezies	Verdünnung	Anbieter
HA-Tag	HA R001 3F10	Ratte	1:1000	E. Kremmer (HZ München)
RFP	RFP	Kaninchen	1:500	Biomol
Calnexin	Calnexin (CAL)	Maus	1:500	Abcam
<i>Sp</i> SLC9C1	SU1	Kaninchen	1:750	David's Biotechnology
<i>Sp</i> SLC9C1	SU2	Kaninchen	1:750	David's Biotechnology

Tabelle 2-20: Liste der für die Immunzytochemie benutzten primären Antikörper: Angegeben sind Antigen, Fluorophor, Spezies der zur Herstellung immunisierten Tiere, eingesetzte Verdünnung und Anbieter der Antikörper.

Antigen	Fluorophor	Spezies	Verdünnung	Anbieter
Ratte	A488	Esel	1:400	Dianova
Kaninchen	Cy3	Esel	1:250	Dianova
Maus	DyLight649	Esel	1:800	Dianova
Kaninchen	A488	Ziege	1:500	Dianova
Ratte	Cy3	Esel	1:250	Dianova

Tabelle 2-21: Liste der für die Immunzytochemie benutzten sekundären Antikörper: Angegeben sind Antigen, Name, Spezies der zur Herstellung immunisierten Tiere, eingesetzte Verdünnung und Anbieter der Antikörper.

Für die konfokale Mikroskopie wurden 3×10^4 Zellen/Schale auf 1,5H Glasplättchen in einer 4-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden mit einem membranständigen Cherry-CAAX-Ankerprotein transfiziert (0,8 µl/Schale, Lipofectamin 2000, Kapitel 2.5.2). Zur Vorbereitung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, für 5 min mit Paraformaldehyd (4%) fixiert und die Membran mit CT permeabilisiert. Die Zellen wurden mit dem primären Antikörper (Verdünnungen siehe Tabelle 2-20) für eine Stunde in CT inkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und für 20 min mit dem sekundären Antikörper (siehe Tabelle 2-21) unter Lichtausschluss inkubiert. Nach zwei PBS-Waschschritten wurden die 1,5H Plättchen mit Aqua Poly/Mount (PolySciences Inc.) auf dem Objektträger fixiert.

2. Material & Methoden

Die Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Fluoview FV1000, Olympus, Tokio, Japan) gemacht.

Präparation von Membransheets

CHO-*SpSLC9C1*-Zellen (6×10^4 Zellen/Schale auf 1,5H PLL überzogenen Glasplättchen) wurden über Nacht transient mit dem membranständigem CAAX-RFP Fusionsprotein transfiziert (Lipofectamin 2000). Circa 12 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen über Nacht auf 29°C (7,5% CO₂) inkubiert. Morgens wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Stabilisierungspuffer in der 4-Well-Platte gehalten. Anschließend wurden die Zellen durch einen Stabsonifikator (Vibra-Cell, Sonics, Newton, USA) einem 0,1 s langen Ultraschallpuls (Amplitude 5%) ausgesetzt. Der Ultraschallpuls wurde ggf. ein bis zwei Mal wiederholt, bis auf dem Zellteppich mit dem Mikroskop ein Krater zu erkennen war. Die Membransheets wurden mit dem in Kapitel 2.5.4 beschriebenen Färbeprotokoll angefärbt.

2.6 Kalibrierung durch die pH_{null} -Methode

Zur Untersuchung des pH_i -Wertes in Ruhe (pH_{rest}) und der pH-Pufferkapazität wurden CHO-Zellen mit der pH_{null} -Methode nach Eisner untersucht (Eisner, Kenning & O'Neill, 1989). Dabei wurden Zellen für 10 min mit BCECF-AM (10 μ M in ES) beladen und mit verschiedenen Nullpunktlösungen (pH_{null} -Lösungen) angesäuert oder alkalisiert. Die pH_{null} -Lösungen enthalten eine schwache Säure (Propionsäure, C₂H₆O₂) und eine schwache Base (Ammoniumchlorid, NH₄Cl). Diese existieren in einem pH-abhängigen Gleichgewicht zwischen der protonierten und deprotonierten Form. Bei pH = 7,4 sind beide unvollständig deprotoniert bzw. protoniert (pK_s C₂H₆O₂ = 4,87, pK_s NH₄Cl = 9,25) und im ungeladenen Zustand membrangängig. Nach Übergang der ungeladenen Form in die Zelle stellt sich dort ein neues Gleichgewicht zwischen deprotoniertem und protoniertem Zustand ein. Propionsäure säuert so die Zelle bei konstantem pH_e an, während Ammoniumchlorid die Zelle alkalisiert. So kann die pH_{null} -Lösung den pH_i in eine vorberechnete Richtung auslenken und bei ausreichend hoher Konzentration sogar klemmen. Ist der angestrebte pH-Wert der pH_{null} -Lösung gleich dem pH_i kommt es nicht zu einer Auslenkung der Fluoreszenz. Über die Gleichung

$$pH_{null} = pH_e - 0,5 \log [A]/[B]$$

wird das Säure/Base Konzentrationsverhältnis ($[A]/[B]$) für einen gewünschten pH_{null} berechnet. Für meine Versuche wurde eine konstante Konzentration von Propionsäure (5 mM)

mit verschiedenen Konzentrationen von Ammoniumchlorid verwendet, um den pH_i in Richtung pH_{null} 6,4, 6,8, 7,2, 7,6 und 8,0 herzustellen. Dafür wurde die oben genannte Formel nach [B] aufgelöst:

$$[B] = [A]/10^{2(pH_e - pH_{null})}$$

Um osmotische Effekte zu verhindern, wurde die NaCl-Konzentrationen der jeweiligen Säure/Base-Konzentration angepasst. Tabelle 2-22 zeigt die verwendeten Konzentrationen von Propionsäure (Na⁺-Propionat), Ammoniumchlorid und NaCl für die jeweiligen pH_{null} -Lösungen. Die Konzentrationen für KCl, MgCl₂, CaCl₂, HEPES und Glucose sind wie in der Standard-ES (Tabelle 2-9).

pH_{null}	[Na ⁺ -Propionat]	[Ammoniumchlorid]	[NaCl]
6,4	5 mM	0,05 mM	134,95 mM
6,8	5 mM	0,32 mM	134,68 mM
7,2	5 mM	1,99 mM	133,01 mM
7,6	5 mM	12,56 mM	123,44 mM
8,0	5 mM	79,25 mM	55,75 mM

Tabelle 2-22: Zusammensetzung der pH_{null} -Lösungen: Angegeben sind die verwendeten Konzentrationen von Propionsäure (Na⁺-Propionat) und Ammoniumchlorid zur Herstellung fünf verschiedener pH_{null} -Lösungen. Die NaCl-Konzentration wurde der entsprechenden Na⁺-Propionat und Ammoniumchlorid-Konzentration angepasst um osmotische Abweichungen zu vermeiden.

Gemessen wurde am Cell^R-Imaging System der Firma Olympus (Mikroskop Olympus IX81 Beleuchtungssystem MT20, 150 W Xenonlampe). BCECF wurde ratiometrisch über zwei Filter (430/25 nm und 470-490 nm, Semrock) angeregt. Die Emission wurde durch einen 535/25 nm-Filter (Semrock) in Kombination mit einem 500 nm LP dichroischen Spiegel (Semrock) gemessen. Integriert wurde alle 2 s (0,5 Hz) für 200 ms bei 430/25 nm und 100 ms bei 470-490 nm. Das Fluoreszenzverhältnis R von $(F_{470-490})/F_{430}$ repräsentiert das pH_i -Signal. Es ist dargestellt als Änderung ($\Delta R/R$) in Relation zu den circa 20 Datenpunkten der jeweils vorhergegangenen ES-Perfusion. Die Perfusion der pH_{null} -Lösungen und der ES war gravitationsgetrieben und wurde manuell über das *nanion-Perfusion-System* gesteuert. Die Auswertung geschah über die Olympus Cell^R Imaging Software Version 3.1.

2. Material & Methoden

2.7 Elektrophysiologie

Die Spannungsabhängigkeit von *SpSLC9C1* wurde elektrophysiologisch untersucht. Dabei wurden die Zellen auf 5 mm PLL-beschichteten Glasplättchen ausgesät. Für Messungen an *SpSLC9C1* wurden 2×10^4 Zellen/Schale der CHO-*SpSLC9C1*-Zelllinie ausgesät und für 24 h auf 37°C (5% CO₂) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für circa 12 h auf 29°C (7,5% CO₂) inkubiert.

Für Messungen von *SpSLC9C1* in Kombination mit dem H_v1-Protonenkanal wurde in CHO-*SpSLC9C1*-Zellen (6×10^4 Zellen/Schale, 5 mm PLL-beschichtete Glasplättchen) zusätzlich der H_v1-Kanal exprimiert.

Für Messungen der *SpSLC9C1*-Mutanten R399A und R1053Q wurde das jeweilige Konstrukt transient in einer stabilen CHO-H_v1-Zelllinie exprimiert. *Gating*-Ströme von *SpSLC9C1*-R1053Q und *SpSLC9C1*-R803Q wurden transient in CHO-WT-Zellen untersucht. Um positiv transfizierte Zellen zu erkennen, wurde mCherry in einem separaten Vektor (0,2 µg/Schale) cotransfiziert.

2.7.1 Die *Patch-Clamp*-Technik

Die *Patch-Clamp*-Technik (Membranfleck-Klemme) wurde zuerst von Erwin Neher und Bert Sakmann im Jahre 1976 beschrieben (Neher & Sakmann, 1976; Hamill *et al.*, 1981). Sie diente ursprünglich zur Messung von einzelnen Ionenkanälen. Dabei wird ein Membranfleck (*patch*) vom extrazellulären Medium durch eine Glaspipette elektrisch isoliert (Abbildung 2-3, *cell-attached*-Konfiguration). Die Messung der kleinen Ströme durch einzelne Kanäle erfordert die Reduzierung des Grundrauschens. Dieses Rauschen entsteht durch Schwankungen im Leckstrom zwischen der Glaspipette und der Zellmembran. Einen Großteil dieser Schwankungen liefert das thermische Rauschen, dessen Varianz umgekehrt proportional zum Widerstand ist, über den der Strom fließt. Führt man die Pipette an die Zelle heran und legt einen leichten Unterdruck an, bildet sich eine Verbindung. Der elektrische Widerstand kann dabei Werte von > 1 Gigaohm annehmen (Man spricht dann von einem *gigaohm-seal*). In diesem Bereich ist das thermische Rauschen so gering, dass der Strom einzelner Ionenkanäle aufgelöst werden kann.

Von der *cell-attached*-Konfiguration gelangt man in drei andere elektrophysiologische Messkonfigurationen. Für die *inside-out*-Konfiguration bewegt man die Pipette von der

cell-attached-Konfiguration aus leicht nach oben und reißt so ein Stück Membran aus der Zelle. Die Innenseite der Zellmembran ist dabei der Badlösung zugewandt (Abbildung 2-3, rechts). Legt man von der *cell-attached*-Konfiguration aus einen Unterdruck in Kombination mit einem kurzen Spannungspuls (400-600 mV, 0,5 ms) an, so reißt die Membran in der Pipette auf. Der Kontakt zwischen Pipette und Membran bleibt dabei oft intakt. In der so etablierten *whole-cell*-Konfiguration lassen sich Ströme über die gesamte Zellmembran messen (Abbildung 2-3, links). Durch das Kontinuum zwischen Pipette und Zelle kommt es zum Austausch der Pipettenlösung mit dem Zytoplasma. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Pipetten mit Widerständen von 5-7 M Ω verwendet. Der Zugangswiderstand R_Z betrug in der *whole-cell*-Konfiguration üblicherweise 7-15 M Ω .

Man gelangt in die *outside-out*-Konfiguration durch vorsichtige Bewegung der Pipette von der *whole-cell*-Konfiguration aus nach oben. Durch das langsame Ziehen schließt sich die Membran an der Pipette wieder, sodass die Innenseite der Zellmembran der Pipettenlösung zugewandt ist (Abbildung 2-3, Mitte).

2. Material & Methoden

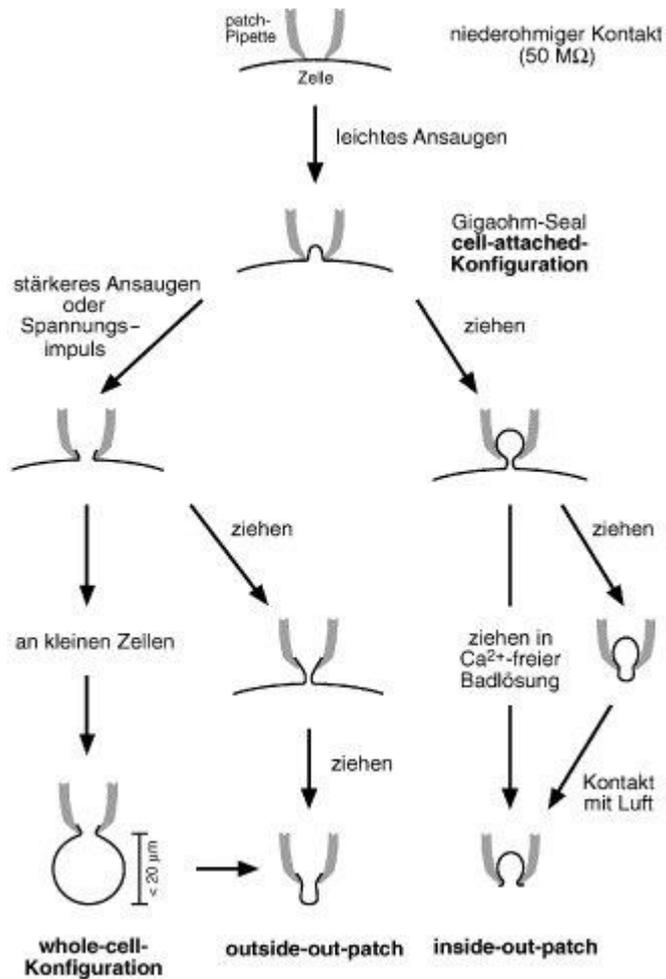


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung von Patch-Clamp-Konfigurationen: In der *cell-attached*-Konfiguration können Ionenkanäle der intakten Zellmembran gemessen werden. Die *whole-cell*-Konfiguration erlaubt die Messung aller Proteine in der Zellmembran. Die *outside-out* sowie die *inside-out*-Konfiguration ermöglicht die Messung eines Membranflecks. Dabei ist die Außen- bzw. die Innenseite der Membran der Badlösung zugewandt. Abbildung aus Numberger 1996.

Prinzip des Patch-Clamp-Verstärkers

Elektrophysiologische Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden in der sogenannten Spannungsklemme durchgeführt. In dieser Einstellung wird eine definierte Spannung zwischen Messelektrode und Referenzelektrode angelegt. Die Messelektrode befand sich in der Pipette und war mit IS befüllt, während sich die Referenzelektrode in der Badkammer mit ES befand. Der Strom, der durch die Messelektrode injiziert werden muss, um die gewünschte Spannung zu halten, ist das gemessene Signal.

Ein vereinfachtes Schema ist in Abbildung 2-4 dargestellt (Abbildung aus Brenker 2011). Die gewünschte Spannung (Kommandospannung V_K) wird mit der Spannung zwischen

Referenz- und Messelektrode an einem Operationsverstärker verglichen. Bei einer Differenz injiziert der Verstärker durch Rückkopplung über den Widerstand R_F einen Strom in die Pipette um die gewünschte Spannung zu erreichen. Ein Hauptmerkmal eines Operationsverstärkers ist, dass er die eingehenden Spannungen stromfrei messen kann (ein idealer Operationsverstärker besitzt einen unendlich hohen Widerstand), sodass der induzierte Strom nur über R_F in die Pipette geleitet wird. Durch diese Rückkopplung erreicht die tatsächliche Spannung zwischen Referenz- und Messelektrode innerhalb weniger μs die gewünschte Spannung V_K .

Die gehaltene Spannung $V = R_F \times I$ wird an einem weiteren Operationsverstärker stromfrei gemessen. An dieser Stelle kann der Strom I über den bekannten Widerstand R_F bestimmt werden ($I = V_K \times R_F$).

Die Rückkopplung findet im Vorverstärker am Pipettenhalter statt, während die Spannung $V = R_F \times I$ im Hauptverstärker bestimmt wird. Dort wird das Signal verstärkt und gefiltert (Tiefpass-Bessel-Filter, 10 kHz). Anschließend digitalisiert ein Analog-/Digital-Wandler das aufgenommene Signal mit einer Abtastfrequenz von bis zu 100 kHz.

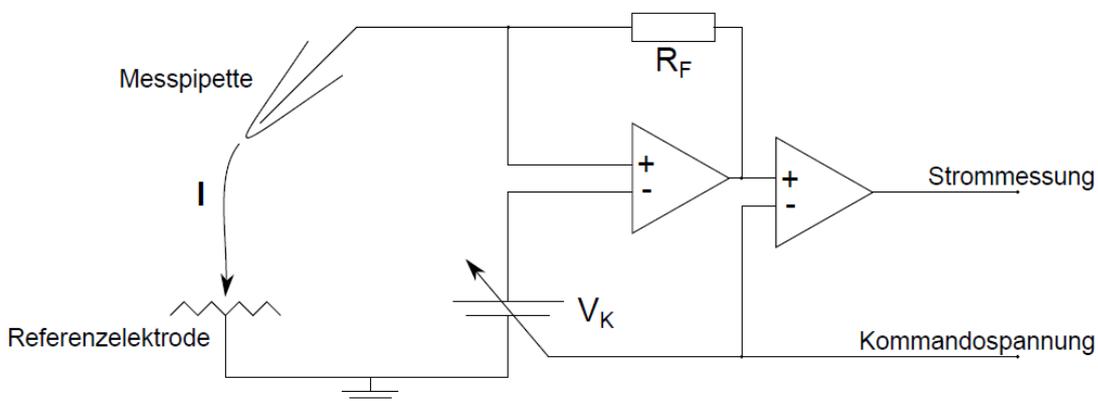


Abbildung 2-4: Prinzip des Patch-Clamp-Verstärkers. Abbildung aus Brenker 2011.

Vor jeder Messung wird der Referenzelektrode das Potential von 0 mV zugeschrieben (*offset*-Abgleich). Dabei werden die Spannungen in Relation zur Referenzelektrode angegeben; eine positive Spannung ist dadurch definiert, dass das Zytoplasma bzw. die intrazelluläre Seite der Membran gegenüber der extrazellulären Seite positiv geladen ist. Eine negative Spannung lädt die intrazelluläre Seite der Membran gegenüber der extrazellulären Seite negativ. Ein

2. Material & Methoden

Strom von Kationen über die Membran von innen nach außen ergibt positive Ströme (Auswärtsströme). Überqueren Kationen die Membran von außen nach innen, erzeugen sie negative Ströme (Einwärtsströme).

2.7.2 pH-Fluorimetrie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die pH-Fluorimetriemessungen der pH-sensitive Farbstoff BCECF ratiometrisch verwendet (Kapitel 2.2.1). Angeregt wurde mit einem Fluoreszenzsystem der Firma Photon Technology International (PTI, New Jersey, USA). Die abwechselnde Anregung bei einer Wellenlänge von 440 nm und 480 nm fand über einen Monochromator (DeltaRAM XTM, PTI) mit einer Bandbreite von jeweils 12,5 nm bei einer Frequenz von 5 Hz statt. Die Emissions-Wellenlänge wurde mit zwei hintereinandergestellten Filtern der Firma Brightline kontrolliert: einem 525/24 nm Filter im Filterwürfel des Mikroskops in Verbindung mit einem dichroischen Spiegel mit 500 nm LP Kantenwellenlänge sowie einem weiteren Filter (525/15 nm) vor dem Photomultiplier des PTI Systems. Integriert wurde das Fluoreszenzsignal an einem Photomultiplier (bedingt durch die Anregungsfrequenz von 5 Hz) über 100 ms pro Wellenlänge. Für alle Messungen wurde ein 60x Wasserobjektiv (Olympus UplanSApo, 60x, 1,20W) benutzt. Die Zelle wurde über die Pipette in der *whole-cell*-Konfiguration mit Farbstoff beladen (siehe Kapitel 2.7.1).

Zur Bestimmung von $V_{1/2}$ und s wurde die Steigung von ΔR des jeweiligen Fluoreszenzsignals durch eine lineare Regression beschrieben und gegen die Spannung (V) aufgetragen ($\Delta R/V$). Die Daten wurden über eine iterative Annäherung durch die Boltzmann-Gleichung beschrieben, wobei

$$\Delta R(V) = 1/(1 + \exp(V - V_{1/2})/s)$$

mit $s = (kT)/(q_g \times q_e)$. $V_{1/2}$ ist das Potential, an dem $\Delta R(V) = \Delta R_{\max}/2$. Die Mittelwerte wurden durch Normalisierung jedes Datensatzes zum jeweiligen Maximum und Minimum der Boltzmann-Anpassung bestimmt. Alle verwendeten Daten wurden durch iterative Annäherung zufriedenstellend beschrieben ($r^2 > 0,96$).

2.7.3 *Acid-load* von CHO-Zellen

Hier wurden die Auswirkungen von SLC9-spezifischen Blockern auf endogene Austauscher von nicht-transfizierten CHO-K1-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden 3×10^4 Zellen/Schale auf 4-Well-Zellkulturschalen mit 5 mm PLL-beschichteten Glasplättchen ausgesät und ü.N. auf 37°C (5% CO₂) zum Anwachsen inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit BCECF-AM in ES beladen (10 µM, 10 min) und anschließend angesäuert. Eine Gruppe von circa 30 Zellen wurde, wie in der pH-Fluorimetrie beschrieben, abwechselnd bei einer Wellenlänge von 440 nm und 480 nm angeregt um den pH_i zu verfolgen (Parameter wie in Kapitel 2.7.2). Im sogenannten *acid-load*-Experiment (Boron & De Weer, 1976; Pedersen *et al.*, 2007) wurden die CHO-Zellen zuerst mit 10 mM NH₄Cl in ES für 200 s perfundiert um die Zellen zu alkalisieren. Dabei überquert ungeladenes NH₃ die Zellmembran und stellt intrazellulär ein Gleichgewicht zwischen NH₃ und NH₄⁺ ein. Dieser Prozess verbraucht intrazellulär H⁺; der pH_i steigt dadurch an. Anschließend wurden die Zellen mit Na⁺-freier ES umspült (200 s). Ungeladenes NH₃ diffundiert aus der Zelle, setzt ein H⁺ frei und säuert die Zelle an. Die Abwesenheit von Na⁺ verhindert, dass endogene Austauscher aktiv sind. Im nächsten Schritt wird Amilorid (500 µM) in ES (140 mM Na⁺) für 200 s perfundiert. Abschließend werden die Zellen mit Amilorid-freier ES umspült.

2.7.4 Blitzlicht-Photolyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden biologisch inaktive Moleküle (*caged-compounds*) durch Blitzlicht-Photolyse in ihre aktive Form umgewandelt. Die Photolyse geschah in Kombination mit der pH-Fluorimetrie an der *Patch-Clamp*-Apparatur. Dazu wurden kurze UV-Licht-Pulse (1 ms) mit einer Xenon-Blitzlampe (JML-C2, Rapp OptoElectronic, Hamburg, Deutschland) auf die Zelle gerichtet. Das Licht wurde durch einen Bandpassfilter (UV-2 250-375, Rapp OptoElectronic) über einen Lichtleiter in den hinteren Mikroskop-Eingang geleitet. Die Blitzlampe besitzt zwei 1 mF Kondensatoren, die unabhängig voneinander mit maximal 385 V geladen werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur einer dieser beiden Kondensatoren genutzt. CHO-*Sp*SLC9C1-Zellen wurden vor der Messung für 30 min mit 10 µM membrangängigem BECMCM-cAMP in F12-Medium beladen. Zusätzlich enthielt die Pipettenlösung mit 100 µM BCMCM-cAMP.

2. Material & Methoden

2.7.5 Messung von *Gating*-Strömen

Gating-Ströme entstehen, wenn geladene Aminosäuren eines membranständigen Proteins bei Spannungsänderungen eine andere Konformation im elektrischen Feld einnehmen. Sie wurden zuerst in Natriumkanälen von Tintenfisch-Axonon beschrieben (Armstrong & Bezanilla, 1974). Um *Gating*-Ströme in der Spannungsklemme messen zu können, müssen sie von ionischen Strömen und linear kapazitiven Strömen isoliert werden.

Die Zellmembran fungiert in der *whole-cell*-Konfiguration als Kondensator (C_m). Beim Anlegen einer gewünschten Spannung wird C_m über einen transient injizierten Strom aufgeladen. Der injizierte Strom zum Laden von C_m ist proportional zur gewünschten Spannung. Für die Messung der normalerweise kleinen *Gating*-Ströme muss dieser kapazitive Strom bestimmt und abgezogen werden (Bezanilla, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden dafür sogenannte P/4-Protokolle benutzt. Die linear-kapazitiven Ströme werden dabei für jeden Spannungspuls separat bestimmt. Dabei gehen dem eigentlichen Spannungspuls vier Spannungspulse mit einem Viertel des gewünschten ΔV_m voraus. Diese wurden in entgegengesetzter Polarität zum Spannungspuls ausgeführt. Aufaddiert ergeben diese P/4-Pulse die linear-kapazitiven Ströme für den jeweiligen Spannungspuls, ohne den *Gating*-Mechanismus des Proteins zu aktivieren. Die linear-kapazitiven Ströme werden anschließend abgezogen (Clampex V1.10.2.0.12, MDS Analytical Technologies).

Die gemessenen Ströme wurden über die Zeit integriert, um die Anzahl der transportierten Ladungen Q zu bestimmen. Q wurde dann gegen die Spannung (V) aufgetragen (Q/V). Zur Bestimmung der Spannungsabhängigkeit wurden die Daten über eine iterative Annäherung durch die Boltzmann-Gleichung angepasst:

$$Q(V) = 1 / (1 + \exp(V - V_{1/2})/s)$$

mit $s = (kT)/(q_g \times q_e)$. Die Mittelwerte (Q/Q_{\max}) wurden durch Normalisierung jedes Datensatzes zum jeweiligen Maximum und Minimum der Boltzmann-Anpassung bestimmt. Die Anzahl der Ladungen (q_g), die am Prozess beteiligt sind, wurde durch $q_g = (kT)/(s \times q_e)$ bestimmt. Alle verwendeten Daten wurden durch iterative Annäherung zufriedenstellend beschrieben ($r^2 > 0,98$).

2.7.6 Die *Patch-Clamp*-Apparatur

Der *Patch-Clamp*-Messstand ist auf einem schwingungsgedämpften Tisch positioniert. Ein Faradaykäfig schirmt den Messstand vor äußeren elektromagnetischen Feldern ab. Das Kernstück bildet ein inverses Mikroskop (Olympus IX 71, Tokio, Japan). Ein hausintern gebauter Objektisch und der Pipettenhalter/Vorverstärker wurden über zwei Mikromanipulatoren (PatchStar, Scientifica, Sussex, Vereinigtes Königreich) gesteuert. Eine hausintern gebaute Perfusionskammer konnte durch eine gravitationsgetriebene Perfusion mit unterschiedlichen Lösungen perfundiert werden.

Die Referenzelektrode besteht aus einem Silberchloriddraht, der über eine Agarbrücke (3 M KCl) mit der Badlösung verbunden ist. Die Pipettenlösung ist über eine Silberchloridelektrode mit dem Vorverstärker verbunden. Steuerung und Dokumentation der Messungen erfolgte über einen Axopatch 200B-Verstärker (Molecular Devices, Silicon Valley, USA), der über ein digitales Erfassungssystem (Digidata 1440A, Molecular Devices) mit einem Computer verbunden ist.

3. Ergebnisse

3.1 Sequenzanalyse von SLC9C1

In der Maus besitzt SLC9C1 eine Größe von 1175 Aminosäuren, im Menschen 1177 Aminosäuren und im Seeigel (*Strongylocentrotus purpuratus*) 1325 Aminosäuren. Im Vergleich dazu besitzen die humanen SLC9A1 (*HsSLC9A1*, auch bekannt als NHE1) und SLC9A3 (*HsSLC9A3*, auch bekannt als NHE3) 815 bzw. 825 Aminosäuren (Strausberg *et al.*, 2002). Damit ist SLC9C1 deutlich größer als andere Austauscher der SLC9-Familie. Eine Sequenzanalyse gibt erste Hinweise auf den ungewöhnlichen Aufbau des putativen Na⁺/H⁺-Austauschers. Der SLC9C1 besitzt drei unterschiedliche Homologiedomänen: eine Austauscherdomäne (NHE-Domäne), eine Spannungssensordomäne (VSD) und eine Bindestelle für zyklische Nukleotide (CNBD).

3.1.1 Die Austauscherdomäne

Vier Mitglieder der SLC9-Superfamilie sind strukturell aufgeklärt worden: NhaP1 aus *M. jannaschii* (*MjNhaP1*, Goswami *et al.*, 2011), NhaP aus *P. abyssi* (*PaNhaP*, Paulino *et al.*, 2014), NhaA aus *E. coli* (*EcNhaA*, Hunte *et al.*, 2005) und NapA aus *T. thermophilus* (*TtNapA*, Furrer *et al.*, 2007). *MjNhaP1* und *PaNhaP* gehören zur Familie der elektroneutralen CPA1-Austauscher, während *EcNhaA* und *TtNapA* der elektrogenen CPA2-Familie zugeordnet werden (Brett, Donowitz & Rao, 2005). *MjNhaP1* und *EcNhaA* sind am besten untersucht und werden hier zum Vergleich mit SLC9C1 herangezogen (Abbildung 3-1). Abbildung 3-2 zeigt die Sequenz der NHE-Domäne von *SpSLC9C1* (Aminosäuren 1-529), *MjNhaP1*, *EcNhaA* und *HsSLC9A1* (Aminosäuren 1-555, gehört zur CPA1-Familie)

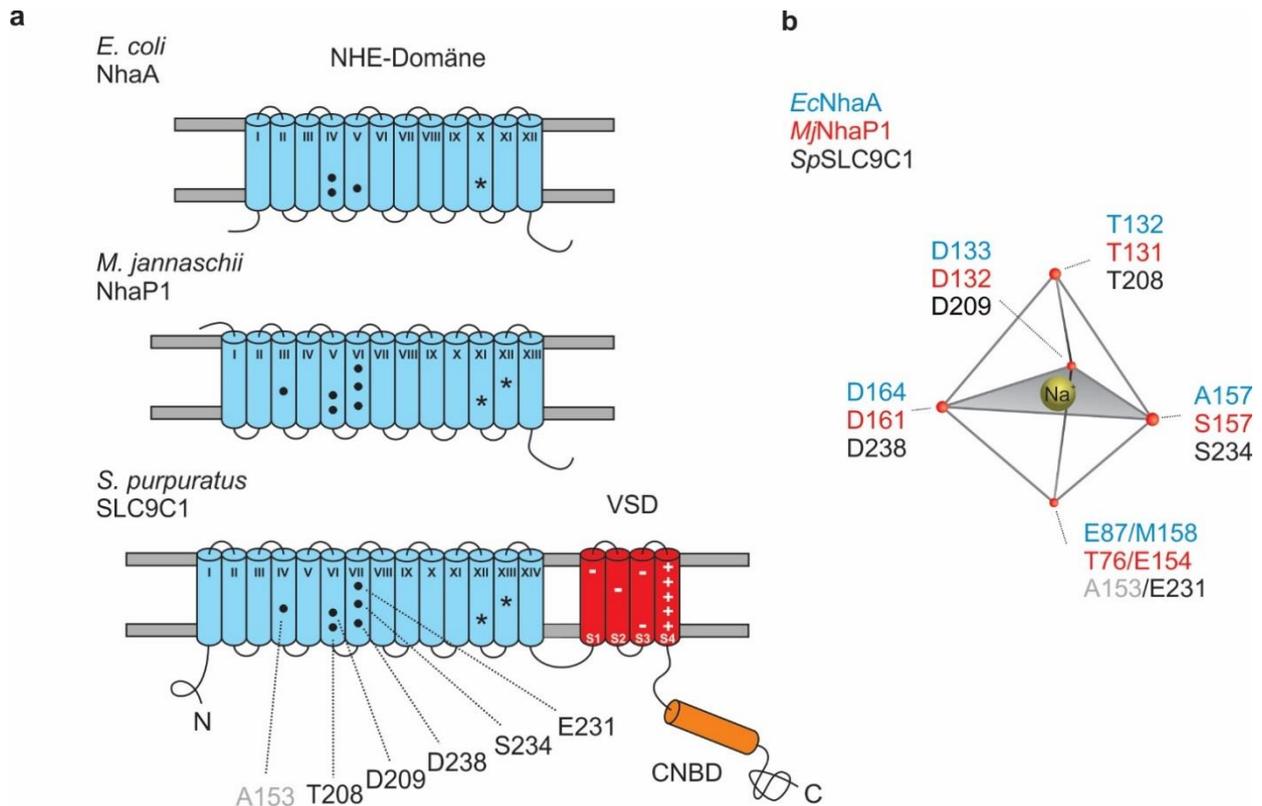


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Na^+/H^+ -Austauscher *EcNhaA*, *MjNhaP1* und *SpSLC9C1*, sowie der Na^+ -Bindestelle: a) Der Na^+/H^+ -Austauscher NhaA aus *E. coli* besitzt 12 (I-XII), NhaP1 aus *M. jannaschii* 13 (I-XIII) und SLC9C1 aus *S. purpuratus* 18 Transmembrandomänen (I-XIV der Austauscher/NHE-Domäne zusammen mit S1-4 der Spannungssensordomäne, VSD). Die Bindestelle für zyklische Nucleotide (CNBD) liegt intrazellulär. In *SpSLC9C1* sind Aminosäuren der Natriumbindestelle aus *MjNhaP1* konserviert (schwarze Punkte, siehe b). Die Sterne markieren Aminosäuren, bei denen eine Punktmutation zu einer Inaktivierung des Na^+/H^+ -Austauschs in *MjNhaP1* führte. b) Natriumbindestelle mit konservierten Aminosäuren aus *E. coli* (blau), *M. jannaschii* (rot) und *S. purpuratus* (schwarze Punkte der NHE-Domänen in a). Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

MjNhaP1 und *EcNhaA* besitzen jeweils 13 und 12 Transmembrandomänen (TMD I-XIII und I-XII, Abbildung 3-2, Abbildung 3-2, rot und blau). Der N-Terminus liegt bei *MjNhaP1* extra- und bei *EcNhaA* intrazellulär (Hunte *et al.*, 2005; Paulino *et al.*, 2014). Obwohl viele Einzelheiten des Na^+/H^+ -Austauschmechanismus noch unklar sind, konnten die Substratbindestelle und einige transportrelevante Aminosäuren in *MjNhaP1* und *EcNhaA* identifiziert werden (Hellmer, Teubner & Zeilinger, 2003; Kuwabara *et al.*, 2004; Arkin *et al.*, 2007; Padan, 2008; Maes *et al.*, 2012; Schushan *et al.*, 2012; Wöhlert, Kühlbrandt & Yildiz, 2014). In *MjNhaP1* bilden die Aminosäuren Thr131, Asp132, Ser157 und Asp161 zusammen mit den weniger konservierten Aminosäuren Thr76/Glu154 eine trigonal-bipyramidale

3. Ergebnisse

Na⁺-Koordinationsstelle (Abbildung 3-2b, Abbildung 3-2 schwarze Punkte). CPA1-Austauscher besitzen ein charakteristisches Asn/Asp-Motiv, das an der Substratbindung beteiligt ist (Abbildung 3-2, *MjNhaP1*-TMD VI, schwarzer Kasten). In *EcNhaA* befindet sich an dieser Stelle ein CPA2-charakteristisches Asp/Asp-Motiv (TMD V). Dieses ist ebenfalls an der Substratbindung beteiligt (Maes *et al.*, 2012). Zwei wichtige Arg-Reste in *MjNhaP1* sind mit entscheidend für die Austauschfunktion (Arg320 und Arg347, Abbildung 3-2, *MjNhaP1*-TMD XI und XII, Hellmer *et al.*, 2003).

Hydrophathieanalysen sagen 14 TMDs für SLC9C1 aus *S. purpuratus* voraus (*SpSLC9C1*, Abbildung 3-2, I-XIV grau, Kyte & Doolittle 1982). Bis auf eine Aminosäure (Ala anstelle von Thr76) sind alle Aminosäuren der Substratbindestelle vom CPA1-Austauscher *MjNhaP1* in *SpSLC9C1* konserviert (Abbildung 3-1b, TMD V und VI). Die Arginine liegen in den vorausgesagten TMDs XII und XIII (Arg399 und 431) und sind ebenfalls hoch konserviert.

		I		II I	
SpSLC9C1	--MKK-----R.VKLREL.VPAVAALAVAVLIQSATGSSGGSGHTPTTQATHADD---HDLTTHNGTE---EHDDGHDDGH-----DDL-HAHAPKIV-FISGSCLF				- 87
MjNhaP1	-----				MELMMAIG-YLGLALVI - 16
EcNhaA	-----				- 0
HsSLC9A1	MVLRSGICGLSPHRIFPSSLVVVALVGLLPLVLRSHGL---QLSPTASTIRSSEPPRRERSIGDVTTPAPEVTPESRPVNHVSVDHGMKPRK-AFPVLGIDYTHVRTPFEISLWILLACL				- 115
		III II I		IV III II	
SpSLC9C1	GAISRSFLFK-----LPIPYTVVLLILGAILGVVAVNVPL-----VEEHTRDVAHMDPHVLLQIFLPVLIFESAFAMDVHTFMRSFSQVCI-----I				- 169
MjNhaP1	GSLVARIAEK-----LKI.PDIPLLLLGLIIGF.FLQIIPS-----DS-AMEIFEYAGPT-----GLIFILLGGAF.TMRI.SLLKRVIKTVVR-----I				- 92
EcNhaA	---MKHLHR--FFSSDA-----SGGIILIIAAILAMIMANGATSGWYHDFLETPVQLRVGSLINKNMLLWINDALMAVFFL-----LVGLEVKRELMQGSLASLROAAPPVIA				- 100
HsSLC9A1	KIGF-HVIPT-----ISSIVPESCLLIVVGLLVGGLIKRGVGE-----TPP-----F-LQSDVFFLFLPPIILDAGYFLPLRQFTENGLTILI-----F				- 192
		V IV III		VI V IV	
SpSLC9C1	ALFGLVVASVLTAVLAM-----NLFNYNWNFSEAMMFGAIMSADDPVAVVALLKDLGASKQLGT--IEGESLINDGCAIVFNVMKMFVFFP-----Q				- 256
MjNhaP1	DTITFLITLLISGFIFN-----MVLNIPYTPVGYLFGAITAADDPATLIPVFSRVFTNPEVAI--TLEAESIENDPLGIVSTVILGLFGLFSS-----S				- 181
EcNhaA	AIGGMIVPALLYLA-FN-----YADPITREGWAIPAAFDIAFALGVLALLGSRVPLALKIFLMALAIIDDLGAIILALFYTNDLSM-----				- 181
HsSLC9A1	AVVGTLWNAFFLGGIMYAVCLVVGGEQINNIGLLDNLLFGSIIISAVDPVAVLAVFEEIHNELLHI--LVFGEGLINDAVTVVLYHLFFEEFANYE-----H				- 285
		VIII VII VI		IX VIII VII	
SpSLC9C1	--LTST-VGQNVL-YFLQVAVAGPLWGYAVAKVTVFF-LSHIFNDALVEITITLAATYLYYYIGDIW-----LEVSGVLAVVVLGLIVNA-EKTSISP--EVEVFLHREWMLAYLANT				- 362
MjNhaP1	-----NPLIDLITLAGGAIIVVGLLLAKIYEKIIIIHCDHFHEYVA--PLVLGGAMLLLYVGDDLLPSICGYGFSGYMAVAIMGLYLGD-ALFRADD--IDYKYIVSFCDDLSLLARV				- 286
EcNhaA	-----ASLGVAAVAIAVLAVLNLCGV-----RRFGVYLLVGVVLTAV-LKSGVHATLAGVIVGFFIPLKEKHGRSPAKRLEHVLHPVAVYL--ILPL				- 266
HsSLC9A1	--VGIVDIFLGLF-SFFVVALGGVLVGVVYGVIAAFT-SRFTSHIRVIEPLFVFLYSYMAVLSAE-L-----FHLSGIMALIASGVVMRPFVEANISH--KSHTTIKYFLKMWSSVSET				- 392
		XII XI X		XIII XII XI	
SpSLC9C1	LIFMMVGVVVTQKALVAVDKMDWFYLIILYLAIITIFGMVISLFSF---ILS-----R-IGYGLTW---RNAVIMTWGGLRGAVGLALALVVENLAGN-----				- 448
MjNhaP1	FIFVFLGACIKLSMLENYFIPGLLV---ALGSIFLARPLGVFLG---L-IGSKHSF-----KEKLYFALEGPRGVVPAALAVTVGIEILKNAD-----				- 367
EcNhaA	FAFANAGVSLQGVTLDGLTS---ILPLGI IAGLLIGKPLGISLFCWLALR-LKLAHLPEGTTYQIMAVGIL-CGIGFTMSIFIASLAFGS-----VDPE-----				- 356
HsSLC9A1	LIFIFLGVSTVAGS-HHWNW--TFVISTLL-FCLIAEVLGVLGLTWFKFRIVKLT-----KDQFI IAYGGLRGAIASFSLGYLLDKKHFPM-----				- 476
		XIV XIII XII			
SpSLC9C1	-----DVGSKFLFHTAGIVVLTVINATTIQ-TLLRILGMSDISIPKRLAMAGAVRRIHEGQNRNLNMLKSDRFL-----ADADWDIATAA				- 529
MjNhaP1	-----KIP-ASITKYITPTDIAGTIIIGTFMTILLSVILEASWAGMLALKLGE---YKPKYKEESH-----				- 426
EcNhaA	-----LINWA--KLGILVGSII---SSAVIGYSWLR---VRLRPS-----V-----				- 388
HsSLC9A1	-----CDLFLTAAITVIFFTVFVQVLGGQ---RAGP-----CLGDPHRLFPWKERKACDLKCDSSPSTTNLLCDLGRA-TPPFWASVSSIVK				- 555

Abbildung 3-2: Vergleich der Austauscher/NHE-Domäne aus verschiedenen Mitgliedern der SLC9-Familie: Gezeigt sind SLC9C1-NHE-Domänen aus dem Seeigel *S. purpuratus* (*SpSLC9C1*, Aminosäuren 1-529) mit NhaP1 aus dem Archaeen *M. jannashi* (*MjNhaP1*), NhaA aus *E. coli* (*EcNhaA*) und der NHE-Domäne aus dem humanen SLC9A1 (*HsSLC9A1*, Aminosäuren 1-555). Die 12 und 13 Transmembrandomänen (TMD) von *EcNhaA* und *MjNhaP1* sind jeweils blau und rot markiert. Hydrophathieanalysen sagen 14 TMDs in *SpSLC9C1* voraus (grau). Konservierte Aminosäuren der Na⁺-Bindestelle sowie transportrelevante Aminosäuren sind schwarz markiert. Die schwarze Box zeigt das CPA1-spezifische Asn/Asp-Motiv in *SpSLC9C1* (TMD VII), *MjNhaP1* (TMD VI) und *HsSLC9A1* (Struktur unbekannt), sowie das CPA2-spezifische Asp/Asp-Motiv in *EcNhaA* (TMD V).

3. Ergebnisse

3.1.2 Die S4-Spannungssensordomäne

Membranproteine können Änderungen der Membranspannung (V_m) detektieren und in Konformationsänderungen umwandeln. Spannungsgesteuerte Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Kanäle besitzen dafür spezielle Spannungssensordomänen (VSDs oder S4-VSDs, Abbildung 3-3a, Bezanilla 2008). 2005 wurde darüber hinaus eine membranständige Phosphatase mit einer funktionellen VSD entdeckt (Abbildung 3-3b, Murata *et al.*, 2005). Diese Motive bestehen aus vier TMDs (S1-4) mit einer charakteristischen Ladungsverteilung. Das namensgebende S4-Motiv besitzt mehrere positiv geladene Aminosäuren, zumeist Arg, jeweils unterbrochen von zwei ungeladenen, meist hydrophoben Aminosäuren. In S1 bis S3 befinden sich häufig negativ geladene Aminosäuren, oftmals Asp, die Gegenladungen zu den positiv geladenen Aminosäuren in S4 bereitstellen (Papazian *et al.*, 1995). Eine Sequenzanalyse zeigt am C-Terminus von SLC9C1 ein Motiv mit großer Ähnlichkeit zu einer klassischen VSD. Diese Domänen sind am besten beim spannungsgesteuerten *Shaker-K*⁺-Kanal aus *Drosophila melanogaster* (*DmShaker*) untersucht (Bezanilla, 2008).

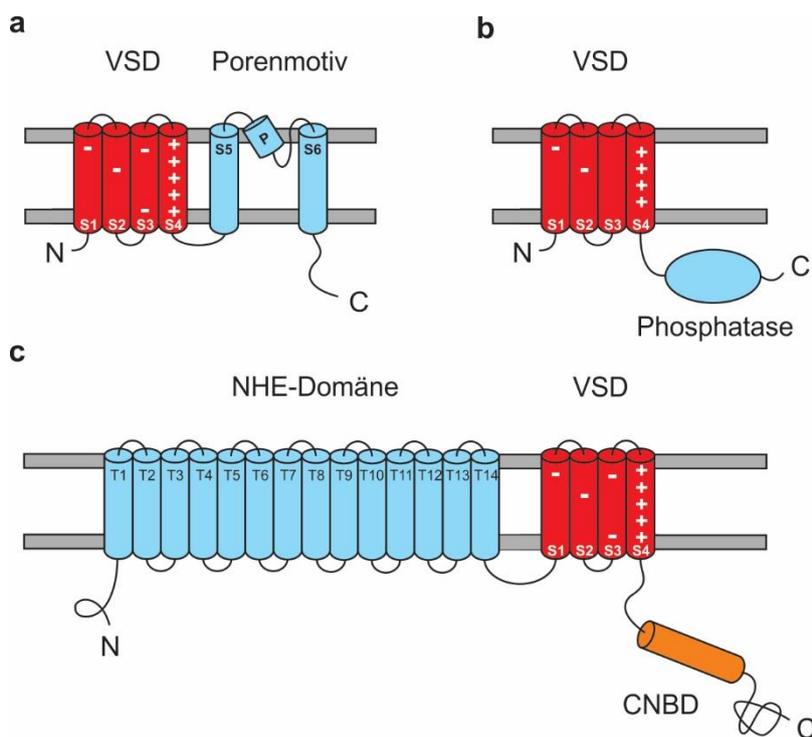


Abbildung 3-3: Darstellung der VSD in unterschiedlichen Proteinen: Gezeigt sind VSDs (rot) in a) spannungsgesteuerten Ionenkanälen, b) der spannungsgesteuerten Phosphatase aus *C. intestinalis* (*voltage-sensor-containing-phosphatase*, *CiVSP*) und c) *SpSLC9C1* zusammen mit NHE-Domäne und CNBD.

Ein Sequenzvergleich der VSD von *SpSLC9C1* mit der aus *DmShaker* und *CiVSP* ist in Abbildung 3-4 dargestellt. Dieser zeigt konservierte, negativ geladene Aminosäuren in den TMDs S1-S3 von *SpSLC9C1* (rot markierte Aminosäuren). Wie *DmShaker*, besitzt *SpSLC9C1* sieben positiv geladene Aminosäuren in S4 (*CiVSP* besitzt vier, Abbildung 3-4, blau markierte Aminosäuren).

	<u>S1</u>	
<i>SpSLC9C1</i>	KICHHMAFEVTTINIAIVLNIVPIIMEFVVQDKMASVSTMAAPGSTVSSEPSSLQKIEDAL	- 732
<i>DmShaker</i>	---AARVVVAIISVVFILLSIVIFCLETLPEFKHYKVFNTTTNGTKIEE--DEVPDITDPF	- 279
<i>CiVSP</i>	AVIDHLGMRVFGVFLIFLDIILMIIDLSPGKS-----ESSQSFYDGM	- 151
	<u>S2</u>	<u>S3</u>
<i>SpSLC9C1</i>	RISNYVFFVIYAI E AIVKILGLG-RH-YIVSHWNKFDAFILVVALVDIIIA E TLLKGSIT	- 790
<i>DmShaker</i>	FLIETLCIIWFTF E LTVRFLACPNKLNFCRDVMNVIDIIAIIPIYFIT--LATVVAEEEDT	- 337
<i>CiVSP</i>	ALALSCY---FMLDLGLRIFAYGPKN-FFTNPWEVADGLIIVVTFVVVTIFYTVLDEYVQE	- 209
	<u>S4</u>	
<i>SpSLC9C1</i>	INLS-----SIKVV K LF R LL R GL R M L RL T KALIPKLILVVNGKI-NN	- 831
<i>DmShaker</i>	LNLKAPVSPQDKSSNQAMSLAIL R VIRL V RV F RIF K LS R H S KGLQILG--RTLKASMRE	- 395
<i>CiVSP</i>	-----TGADGLGRLVVLARLL R VV L RL A RIF Y SH Q QMKASSRRTISQNK-RRYRK	- 257
	+ + + + + + +	

Abbildung 3-4: Sequenzvergleich der VSD: Gezeigt sind die VSDs aus *SpSLC9C1*, *DmShaker* und *CiVSP*. Hervorgehoben sind konservierte negativ (rot) und positiv geladene Aminosäuren (blau).

3.1.3 Die Bindestelle für zyklische Nukleotide

Bindestellen für zyklische Nukleotide sind bei Eukaryoten in vier Proteinfamilien beschrieben: den Protein Kinasen A (PKA) und G (PKG, Vaandrager & de Jonge 1996; Rall *et al.*, 1957; Sutherland & Rall 1957; Cook *et al.*, 1957; Lipkin *et al.*, 1959; Walsh *et al.*, 1968), den zyklisch Nukleotid-sensitiven Ionenkanälen (Kaupp & Seifert, 2002; Craven & Zagotta, 2006) und dem Guanin-Austauschfaktor Epac (*exchange protein activated by cAMP*, Rehmann, Schwede, *et al.*, 2003; Rehmann, Prakash, *et al.*, 2003). Sie kontrollieren eine Vielzahl von physiologischen Prozessen und besitzen einen gemeinsamen Grundaufbau. Für den Vergleich mit *SpSLC9C1* wurde die Bindestelle aus *MmHCN2* (Aminosäuren 523 – 640) herangezogen (Abbildung 3-5). Diese CNBDs befinden sich am C-Terminus des jeweiligen Proteins und umfassen drei α -Helices (α A, α B und α C) und acht β -Faltblätter (β 1 – β 8). Zwischen β 6 und β 7 bildet eine zusätzliche Helix zusammen mit einem konservierten Arginin die Phosphat-Bindekassette (PBC, *phosphate-binding cassette*). Wichtige Aminosäuren für die Bildung der Tertiärstruktur (gelb) und Substratbindung (grün) sind in Abbildung 3-5 dargestellt (Weber & Steitz, 1987; Kaupp *et al.*, 1989). Aminosäuren für die Bindung des zyklischen Nukleotids sind die Purin-bindenden Val und Leu in β 4 und β 5 sowie Gly und Glu in β 6 zur Koordination der Ribofuranose. In *SpSLC9C1* sind diese Aminosäuren konserviert (Abbildung 3-5).

3. Ergebnisse

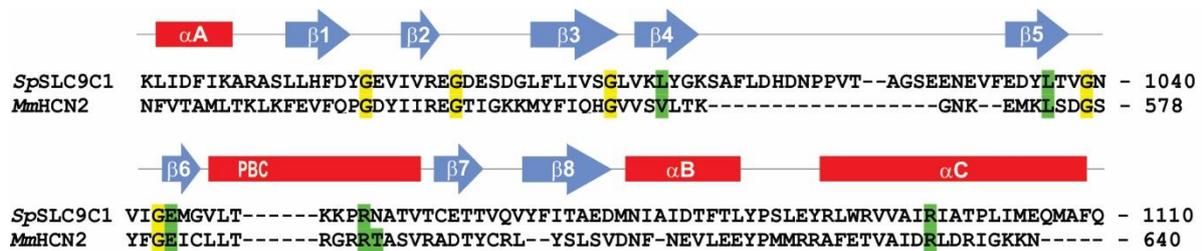


Abbildung 3-5: Sequenzvergleich der CNBD: Gezeigt sind die CNBD aus *SpSLC9C1* und *MmHCN2*. Die Bindestelle umfasst drei α -Helices (αA , αB und αC), acht β -Faltblätter ($\beta 1 - \beta 8$) und eine Phosphat-Bindekassette (PBC, *phosphate binding-cassette*). Grün markierte Aminosäuren sind die purinbindenden Val und Leu ($\beta 4$ und $\beta 5$), die ribofuranosebindenden Gly/Glu ($\beta 6$) sowie die phosphatbindenden Arg/Thr. Gelb markierte Gly-Reste zwischen den β -Faltblättern $\beta 1$ & 2, $\beta 2$ & 3, $\beta 3$ & 4 sowie $\beta 5$ & 6 sind an der Ausbildung der Tertiärstruktur beteiligt.

Zwei wichtige Arg-Reste zur Bindung von zyklischem Nukleotid-3'5'-Monophosphat (cNMP) sind Arg591 in der PBC und Arg632 in der αC -Helix (Varnum, Black & Zagotta, 1995; Tibbs, Goulding & Siegelbaum, 1997; Cukkemane *et al.*, 2007; Bönigk *et al.*, 2009). Beide Aminosäuren sind in *SpSLC9C1* konserviert (Arg1053 in der PBC und Arg1097 in der αC -Helix, Abbildung 3-5, grüne Markierung).

3.2 *SpSLC9C1* erreicht die Plasmamembran von CHO-Zellen

Es wurde eine CHO-Zelllinie hergestellt, die *SpSLC9C1* (Versehen mit einem HA-Epitop) stabil exprimiert (CHO-*SpSLC9C1*-Zellen). Im Western-Blot erkannte ein Anti-HA-Antikörper zwei Proteinbanden auf einer Laufhöhe von 137 und 146 Kilodalton (kDa, Abbildung 3-6a, Pfeile). Diese stimmen mit der vorausgesagten Molekülmasse (M_w) von 146,6 kDa überein. In untransfizierten Zellen erkennt der Anti-HA-Antikörper keine Bande. Eine mögliche Interpretation für das Auftreten von zwei Banden ist eine posttranslationale Modifikation, z.B. Glykosylierung oder Phosphorylierung.

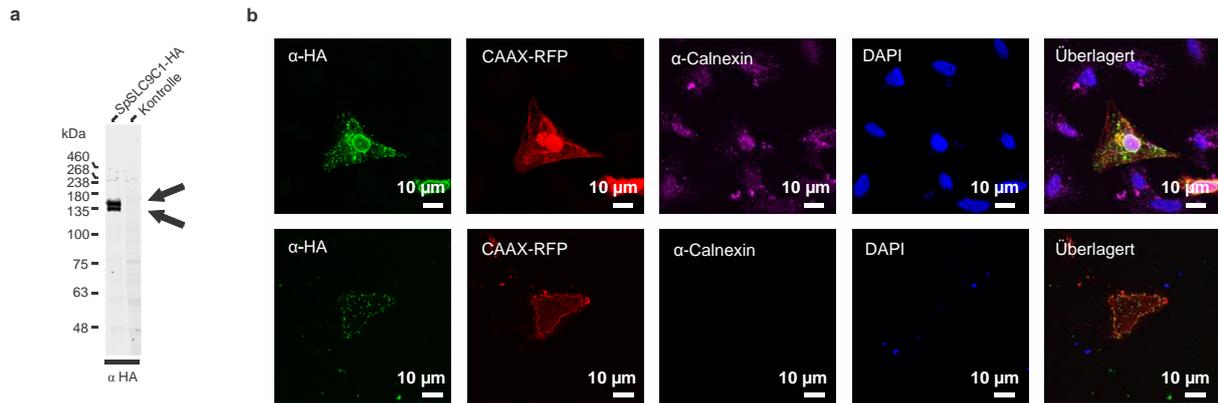


Abbildung 3-6: Western-Blot und Immunzytochemie von CHO-*SpSLC9C1*-Zellen: a) Eine Western-Blot-Analyse von CHO-*SpSLC9C1*-Zellen (HA-markiert) zeigt zwei Banden mit einer Molekülmasse (M_w) von 137 kDa und 146 kDa (Pfeile). b) Immunzytochemische Untersuchung von CHO-*SpSLC9C1*-Zellen (HA-markiert). Die obere Reihe zeigt ganze Zellen. In der unteren sind Membransheets zu sehen. *SpSLC9C1*: α -HA, grün, Plasmamembran: CAAX-RFP, rot, Endoplasmatisches Retikulum: α -Calnexin, magenta, Zellkern: DAPI, blau. Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

Die CHO-*SpSLC9C1*-Zelllinie wurde anschließend immunzytochemisch untersucht. Der Antikörper erkannte den HA-markierten Austauscher (Abbildung 3-6b, obere Reihe, grün).

Um zu prüfen, ob *SpSLC9C1* die Zellmembran erreicht, wurde eine weitere Zellkulturplatte (60% konfluent) vor der Antikörperinkubation mit einem Stabsonifikator beschallt (Abbildung 3-6b, untere Reihe). Die auf den Glasplättchen anheftenden Reste der Plasmamembran (Membransheets, rot) wurden anschließend mit dem Anti-HA-Antikörper sowie mit verschiedenen Organell-Markern untersucht. Die Membransheets zeigten weder Zellkerne (blau), noch Vesikel des Endoplasmatischen Retikulums (Calnexin markiertes ER, magenta). Der Anti-HA-Antikörper markierte die Membransheets jedoch (grün). Diese Ergebnisse zeigen, dass *SpSLC9C1* im heterologen CHO-Zellsystem exprimiert und in der Plasmamembran verankert ist. Im nächsten Schritt soll *SpSLC9C1* auf seine Funktionstüchtigkeit untersucht werden.

3.3 *SpSLC9C1* besitzt einen funktionstüchtigen Spannungssensor

Eine Bewegung der VSD konnte 1973 von Armstrong und Bezanilla als *Gating*-Strom nachgewiesen werden (Armstrong & Bezanilla, 1973). Diese schnellen transienten Ströme betragen nur einen Bruchteil der viel größeren Ionenströme durch die Pore. Um zu untersuchen,

3. Ergebnisse

ob diese *Gating*-Ströme ebenfalls in *SpSLC9C1* vorhanden sind, wurden CHO-*SpSLC9C1*-Zellen elektrophysiologisch untersucht. Spannungspulse von -15 mV bis -155 mV erzeugten transient-negative Ströme zu Beginn (sogenannte *on*-Ströme) sowie transient-positive Ströme zum Ende des Spannungspulses (sogenannte *off*-Ströme, Abbildung 3-7a). In nicht-transfizierten CHO-Zellen (CHO-K1) wurden keine *Gating*-Ströme beobachtet (Abbildung 3-7b). Für jede Spannung wurden die *off*-Ströme über die Zeit integriert, um die Menge an Ladungen (Q) zu bestimmen, welche die Membran überqueren. Die Ladung (Q) wurde anschließend gegen die angelegte Spannung (V) aufgetragen (Q/V , *inset* von Abbildung 3-7a). Zur Bestimmung der halb-maximalen Aktivierung ($V_{1/2}$) sowie der Steigung s wurden die Werte der Q/V Kurve mit der Boltzmann-Gleichung angepasst ($V_{1/2} = -91,4$ mV, $s = 9,2$ mV, Abbildung 3-7a). Der Mittelwert (\pm Standardabweichung, SD) betrug $-94,7 \pm 2,9$ mV für $V_{1/2}$ und $8,5 \pm 0,8$ mV für die Steigung s (Abbildung 3-7c, schwarze Punkte, $n = 6$). Nimmt man eine Boltzmann-Verteilung mit zwei Energieniveaus an, lässt sich die Anzahl der Ladungen (q_g) abschätzen, die an dem Prozess beteiligt sind (Bezanilla & Villalba-Galea, 2013). Bei einem Steigungswert von $s = 8,5$ mV ergeben sich dabei $q_g = 3,1$ Elementarladungen e_0 .

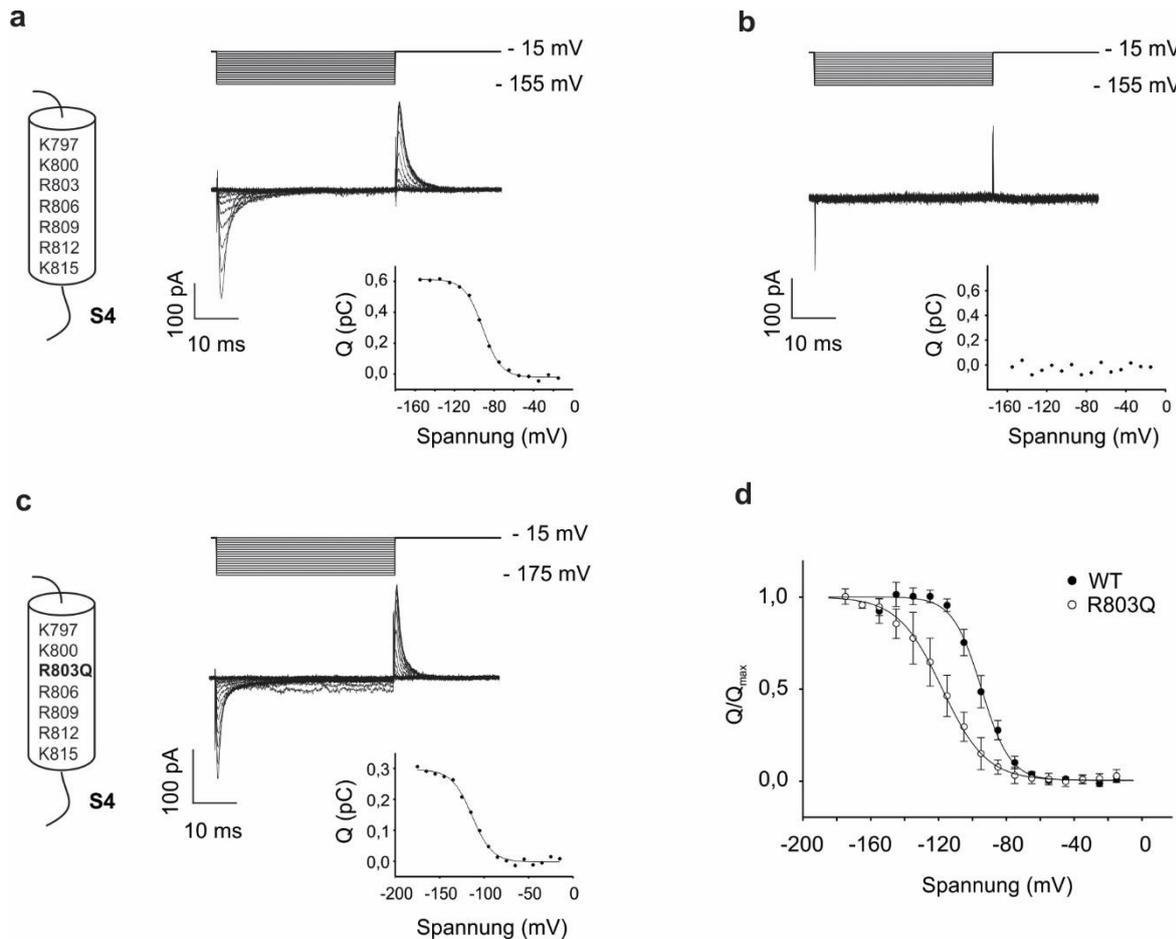


Abbildung 3-7: Gating-Ströme von *SpSLC9C1*-WT und der S4-Mutante *SpSLC9C1*-R803Q: a) Schematische Darstellung der S4-TMD des Spannungssensors im *SpSLC9C1*-WT. Spannungsprotokoll (oben); Ausgehend von -15 mV wurden für 40 ms Spannungspulse bis -155 mV (Δ -10 mV) angelegt. Die Spannungspulse erzeugten transient negative Ströme zu Beginn (*on*-Ströme) und transient positive Ströme zum Ende des Pulses (*off*-Ströme, unten). Die *off*-Ströme wurden integriert, um die Ladungen Q zu bestimmen. Q wurde gegen die Spannung V aufgetragen (Q/V , *inset*) um den $V_{1/2}$ -Wert und die Steigung s zu bestimmen. Die durchgezogene Linie zeigt die Anpassung durch die Boltzmann-Gleichung ($V_{1/2} = -91,4$ mV, $s = 9,2$ mV). b) In nicht-transfizierten CHO-K1-Zellen erzeugte das gleiche Spannungsprotokoll keine *Gating*-Ströme. c) Schematische Darstellung der mutierten S4-TMD in *SpSLC9C1*-R803Q. Ein Spannungsprotokoll von -15 mV bis -175 mV (oben) resultierte in einem $V_{1/2}$ -Wert von -113,6 mV und einer Steigung s von 11,4 mV (*inset*). d) Die normalisierten Ladungen Q/Q_{\max} wurden gegen die Spannung V (mV) aufgetragen (Q/V). Die Mittelwerte für $V_{1/2}$ -Werte (\pm SD), s (\pm SD) und Anzahl beteiligter Ladungen q_g für WT und die R803Q Mutante (n = Anzahl der Experimente) betragen; WT (schwarze Kreise): $V_{1/2} = -94,7 \pm 2,9$ mV, $s = 8,5 \pm 0,8$ mV, $q_g = 3,1 e_0$, $n = 6$, R803Q (offene Kreise): $V_{1/2} = -117,9 \pm 7,1$ mV, $s = 12,0 \pm 1,1$ mV, $q_g = 2,0 e_0$, $n = 7$. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

3. Ergebnisse

Die S4-TMD von *SpSLC9C1* besitzt, wie der *Shaker-K⁺*-Kanal, sieben positiv geladene Aminosäuren (Arg- und Lys-Reste, Abbildung 3-4, blau). Bei Änderungen der Membranspannung richten die Ladungen sich neu im elektrischen Feld aus (Liman *et al.*, 1991). Neutralisiert man im *Shaker-K⁺*-Kanal die dritte Ladung in S4 (Arg368), ändert sich $V_{1/2}$ und s der VSD (Perozo *et al.*, 1994; Aggarwal & MacKinnon, 1996; Larsson *et al.*, 1996; Seoh *et al.*, 1996). Eine Neutralisierung der homologen Aminosäure Arg803 in *SpSLC9C1* durch Austausch mit einem Glutamin (R803Q) verschiebt den $V_{1/2}$ -Wert um -23 mV auf $-117,9 \pm 7,1$ mV und flacht die Boltzmann-Kurve ab ($n = 7$, Abbildung 3-7d). Aus der Steigung s ($13,0 \pm 1,1$ mV) ergeben sich nun 2,0 Elementarladungen e_0 die sich verschieben. Das lässt den Schluss zu, dass Arg803 eine ganze Elementarladung zu den gemessenen *Gating*-Strömen beiträgt und das elektrische Feld vollständig überquert. Diese Schlussfolgerung stimmt mit der Beobachtung von Larsson und Kollegen überein, die Arg368 im *Shaker-K⁺*-Kanal untersuchten (Liman *et al.*, 1991; Bezanilla, Perozo & Stefani, 1994; Aggarwal & MacKinnon, 1996; Larsson *et al.*, 1996; Seoh *et al.*, 1996).

3.4 Die *Gating*-Ströme werden durch cAMP moduliert

Sequenzanalysen zeigen dass *SpSLC9C1* auch eine Bindestelle für zyklische Nukleotide besitzt. Im nächsten Schritt soll untersucht werden, ob die *Gating*-Ströme durch zyklische Nukleotide moduliert werden. Dafür wurden *Gating*-Ströme in Anwesenheit von cAMP oder cGMP (jeweils 1 mM) in der Pipettenlösung untersucht. Dabei zeigte sich, dass cAMP den $V_{1/2}$ -Wert um 20 mV zu weniger negativen Potentialen verschiebt, ohne jedoch die Steigung s zu ändern (Abbildung 3-8b, offene Kreise, $V_{1/2} = -74,4 \pm 6,4$ mV, $s = 8,8 \pm 1,9$ mV, $q_g = 2,9 e_0$, $n = 7$). 1 mM cGMP in der Pipettenlösung war weniger effektiv (Abbildung 3-8b, schwarze Dreiecke, $V_{1/2} = -86,9 \pm 3,0$ mV, $s = 8,3 \pm 1,0$ mV, $q_g = 3,1 e_0$, $n = 7$).

Um zu untersuchen, ob die Modulation der Spannungsabhängigkeit der *Gating*-Ströme durch direkte Bindung von cAMP an die CNBD vermittelt wird, wurde die CNBD durch eine Punktmutation inaktiviert. Der Austausch von Arg1053 in der PBC zu einem Gln (R1053Q, Harzheim *et al.*, 2008; Bönigk *et al.*, 2009; Tibbs *et al.*, 1997) veränderte nicht den $V_{1/2}$ -Wert im Vergleich zum Wildtyp in Abwesenheit von cNMP (Abbildung 3-8c, schwarze Punkte, $V_{1/2} = -93,4 \pm 1,7$ mV, $s = 9,4 \pm 2,0$ mV, $q_g = 2,8 e_0$, $n = 6$), beseitigte aber die $V_{1/2}$ -Modulation durch 1 mM cAMP (Abbildung 3-8c, schwarze Dreiecke, $V_{1/2} = -93,9 \pm 4,2$ mV, $s = 10,3 \pm 1,0$ mV, $q_g = 2,5 e_0$, $n = 5$).

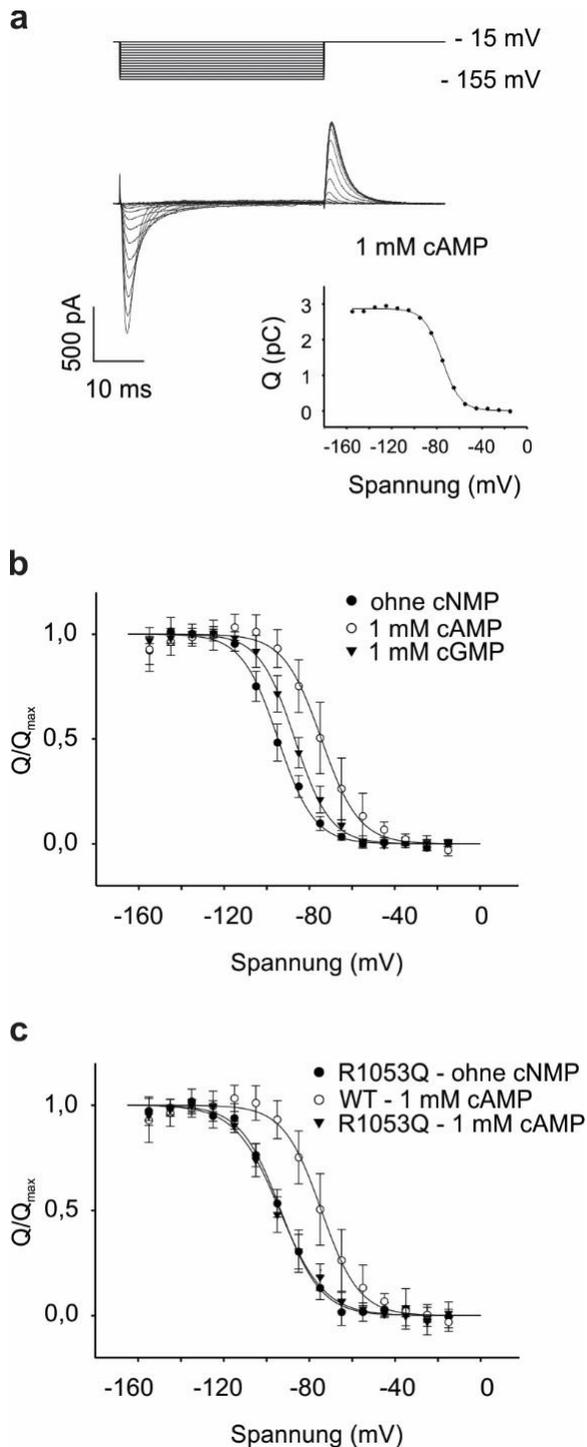


Abbildung 3-8: Gating-Ströme von *SpSLC9C1*-WT in An- und Abwesenheit zyklischer Nukleotide:

a) Spannungsprotokoll (oben); Ausgehend von -15 mV wurden für 40 ms Spannungspulse bis -155 mV (Δ -10 mV) angelegt. Gating-Ströme von *SpSLC9C1* in Anwesenheit von 1 mM cAMP in der Pipettenlösung (unten). Das *inset* zeigt die integrierten Ladungen Q aufgetragen gegen die Spannung V (Q/V). Die durchgezogene Linie repräsentiert eine Anpassung durch die Boltzmann-Gleichung ($V_{1/2} = -75,4$ mV, $s = 8,2$ mV). b) Die normalisierten Ladungen Q/Q_{\max} wurden gegen die Spannung aufgetragen. Vergleich von *SpSLC9C1*-Gating-Strömen ohne zyklisches Nukleotid-3'5'-Monophosphat (cNMP, schwarze Kreise), mit 1 mM cAMP (offene Kreise) und mit 1 mM cGMP (schwarze Dreiecke). Die Mittelwerte von $V_{1/2}$ (\pm SD), s (\pm SD) und Anzahl beteiligter Ladungen q_g (n = Anzahl der Experimente) betragen: ohne cNMP: $V_{1/2} = -94,7 \pm 2,9$ mV, $s = 8,5 \pm 0,8$ mV, $q_g = 3,1 e_0$, $n = 6$. 1 mM cAMP: $V_{1/2} = -74,4 \pm 6,4$ mV, $s = 8,8 \pm 1,9$ mV, $q_g = 2,9 e_0$, $n = 7$. 1 mM cGMP: $V_{1/2} = -86,9 \pm 3,0$ mV, $s = 8,3 \pm 1,0$ mV, $q_g = 3,1 e_0$, $n = 7$. c) cAMP moduliert die Gating-Ströme durch direkte Bindung an die CNBD. Die normalisierten Ladungen Q/Q_{\max} sind aufgetragen gegen die Spannung V (Q/V). *SpSLC9C1*-R1053Q-Gating-Ströme ohne cNMP (schwarze Kreise): $V_{1/2} = -93,4 \pm 1,7$ mV, $s = 9,4 \pm 2,0$ mV, $q_g = 2,8 e_0$, $n = 6$. *SpSLC9C1*-WT mit 1 mM cAMP (offene Kreise): $V_{1/2} = -74,4 \pm 6,4$ mV, $s = 8,8 \pm 1,9$ mV, $q_g = 2,9 e_0$, $n = 7$. und *SpSLC9C1*-R1053Q mit 1 mM cAMP (schwarze Dreiecke): $V_{1/2} = -93,9 \pm 4,2$ mV, $s = 10,3 \pm 1,0$ mV, $q_g = 2,5 e_0$, $n = 5$. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

Anschließend wurde untersucht, ob 1 mM cAMP auch den $V_{1/2}$ -Wert der S4 Mutante R803Q moduliert. Der $V_{1/2}$ -Wert der Mutante verschob sich in Gegenwart von 1 mM cAMP um 20 mV auf $-96,8 \pm 6,6$ mV (Abbildung 3-9, schwarze Dreiecke, $n = 6$). Die Anzahl beteiligter

3. Ergebnisse

Ladungen hat sich nicht geändert ($s = 13,5 \pm 2,6$ mV, $q_g = 1,9 e_0$). Alle Ergebnisse sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

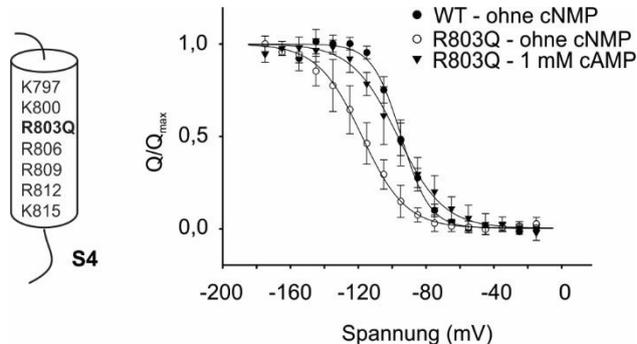


Abbildung 3-9: 1 mM cAMP verschiebt den $V_{1/2}$ der R803Q Mutante um 20 mV: Die linke Abbildung zeigt die S4-Domäne der SpSLC9C1-R803Q-VSD. Rechts sind die normalisierten Ladungen Q/Q_{\max} der SpSLC9C1-WT-Gating-Ströme gegen die Spannung V (Q/V) dargestellt. Ohne cNMP (schwarze Kreise): $V_{1/2} = -94,7 \pm 2,9$ mV, $s = 8,5 \pm 0,8$ mV, $q_g = 3,1 e_0$, $n = 6$. SpSLC9C1-R803Q-Mutante ohne cAMP (offene Kreise): $V_{1/2} = -117,9 \pm 7,1$ mV, $s = 12,0 \pm 1,1$ mV, $q_g = 2,0 e_0$, $n = 7$. SpSLC9C1-R803Q-Mutante mit 1 mM cAMP (schwarze Dreiecke): $V_{1/2} = -96,8 \pm 6,6$ mV, $s = 13,5 \pm 2,6$ mV, $q_g = 1,9 e_0$, $n = 6$. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der $V_{1/2}$ -Wert der Gating-Ströme durch cAMP moduliert wird. Die Modulation wurde aufgehoben, wenn die CNBD durch eine Punktmutation inaktiviert ist. Daraus lässt sich schließen, dass cAMP die Gating-Ströme durch direkte Bindung an die CNBD beeinflusst.

3.5 SpSLC9C1 ist ein spannungsgesteuerter Na^+/H^+ -Austauscher

Neben Gating-Strömen wurden keine anderen Ströme beobachtet. Sollte ein Ionenaustausch stattfinden, muss dieser elektroneutral sein. Ein möglicher Na^+/H^+ -Austausch wurde mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BCECF untersucht (siehe Kapitel 2.2.1).

Zuerst sollte untersucht werden, ob nicht-transfizierte CHO-Zellen (CHO-K1) und CHO-SpSLC9C1-Zellen vergleichbare Ruhe-pH-Werte (pH_{rest}) oder Pufferkapazitäten besitzen. Dafür wurden je 30 Zellen verschiedenen pH_{null} -Lösungen ausgesetzt (pH_{null} -Methode, Eisner *et al.*, 1989). Die Zellen wurden mit membrangängigem BCECF-AM beladen (10 min, 10 μM in ES) und in Abständen von einer Minute abwechselnd mit ES und

einer von fünf verschiedenen pH_{null} -Lösungen perfundiert (6,4, 6,8, 7,2, 7,6 und 8,0). Die pH_{null} -Lösungen sind auf einen pH von 7,4 titriert, lenken den pH_i der Zellen aber über ihr jeweiliges Säure-Base-Konzentrationsverhältnis in Richtung des angestrebten pH-Wertes aus (Abbildung 3-10a, siehe Kapitel 2.6).

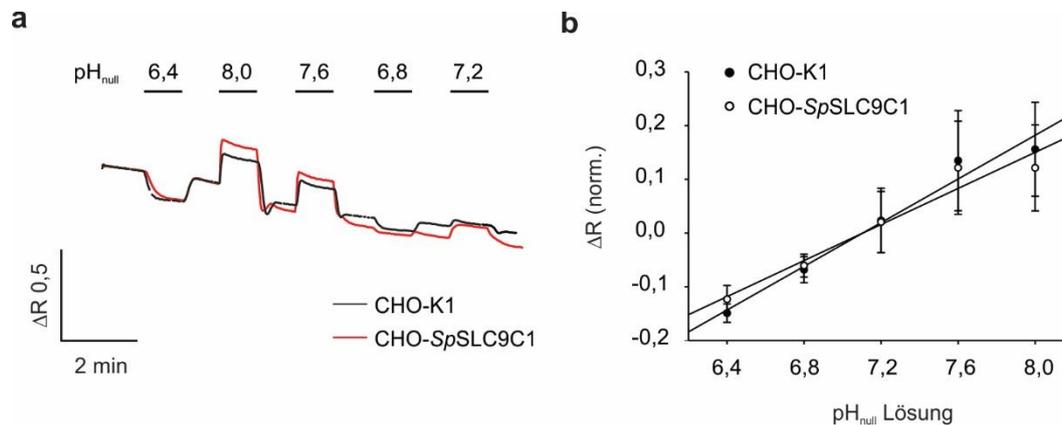


Abbildung 3-10: Untersuchung der Pufferkapazität und des pH_i (pH_{rest}): Gezeigt sind die Änderungen im Fluoreszenzverhältnis (ΔR) von BCECF als Indikator für eine Änderung des pH_i über die Zeit. Der pH_i wurde in nicht-transfizierten CHO-Zellen (CHO-K1) und CHO-SpSLC9C1-Zellen mit fünf pH_{null} -Lösungen (6,4, 6,8, 7,2, 7,6 und 8,0) ausgelenkt. a) Dargestellt ist eine repräsentative Messung beider Zellgruppen, die abwechselnd mit ES und einer der fünf pH_{null} -Lösungen umspült werden ($n = 60$). Die pH_{null} -Lösungen lenken den pH_i je nach Säure/Base-Konzentrationsverhältnis (siehe Kapitel 2.6) in Richtung eines vorberechneten pH-Wertes (pH_{null}) aus. b) Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) der ΔR -Werte, normalisiert auf die vorhergegangenen ES-Perfusion der pH_{null} -Lösungen. Der pH_{rest} liegt in CHO-K1- und SpSLC9C1-Zellen bei 7,1. Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

Die Änderung des Fluoreszenzverhältnisses R wurde auf den Wert der vorhergegangenen ES-Perfusion normalisiert und zusammengefasst (siehe Kapitel 2.2.1 und 2.6). CHO-K1 und CHO-SpSLC9C1-Zellen zeigen keinen Unterschied in der pH_i -Auslenkung durch die pH_{null} -Lösungen (Abbildung 3-10b). Eine Regressionsgrade ergibt einen pH-Wert, an dem $\Delta R = 0$ ist (extrapolierter pH_{rest}). CHO-K1 und CHO-SpSLC9C1-Zellen haben beide einen pH_{rest} von 7,1.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob sich SpSLC9C1 elektrophysiologisch in der Spannungsklemme aktivieren und beobachten lässt. Im Experiment wurden einzelne Zellen über die Pipette mit 10 μM BCECF beladen. Angeregt wurde mit Licht der Wellenlänge 440 und 480 nm, die Emission wurde bei 525 nm gemessen (siehe Kapitel 2.2.1 und 2.7.2). Beim

3. Ergebnisse

Übergang vom *giga-seal* in die *whole-cell*-Konfiguration (Abbildung 3-11a, schwarzer Pfeil) kommt es auf beiden Wellenlängen zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Dieser Anstieg zeigt die Beladung der Zelle mit Farbstoff an. Das Gleichgewicht wird aber nur spät erreicht. Um die Zeit abzukürzen, bei der stabile Messungen durchgeführt werden können, habe ich das Fluoreszenzverhältnis $R = F_{480}/F_{440}$ verwendet (Abbildung 3-11b). Das Fluoreszenzverhältnis R steigt nach Durchbruch in die *whole-cell*-Konfiguration zwar auch zunächst an, erreicht jedoch nach circa 30 s einen stabilen Wert, der zwischen $R = 4,5 - 5$ lag.

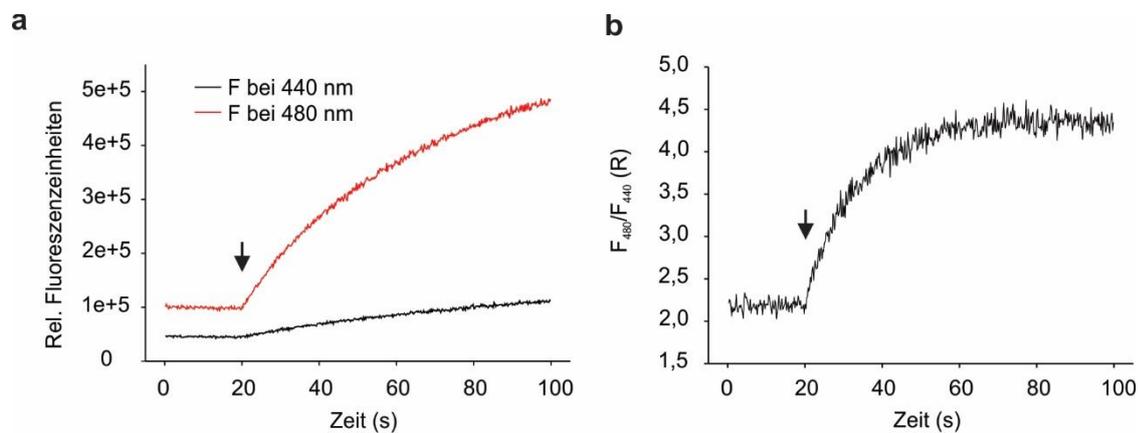


Abbildung 3-11: Beladung von CHO-Zellen in der pH-Fluorimetrie: Der Pfeil zeigt den Übergang vom *giga-seal* in die *whole-cell*-Konfiguration an. a) Fluoreszenzmessung (525/15 nm) bei einer Anregung von 440 nm (schwarz) und bei einer Anregung von 480 nm (rot). b) Fluoreszenzverhältnis R (F_{480}/F_{440}) derselben Messung. Obwohl die Fluoreszenz in beiden Wellenlängen weiter zunimmt (a), erlaubt das ratiometrische Messverfahren den Start der Messung circa 30 s nach dem Übergang in die *whole-cell*-Konfiguration.

Gemessen wurde zunächst unter physiologischen Bedingungen (ES, mit $[Na^+]_e = 140$ mM; IS mit $[Na^+]_i = 14$ mM, siehe Tabelle 2-9). Nach Ende der Ladungsphase (circa 30 s) wurde, ausgehend von einer Haltespannung von -40 mV, ein Spannungssprung (20 s) auf -100 mV angelegt. In der CHO-*SpSLC9C1*-Zelllinie kam es zu einem Anstieg von R (Abbildung 3-12a, rote Spur). Dieser reflektiert eine Abnahme von H^+ -Konzentration und dadurch eine intrazelluläre Alkalisierung. In nicht-transfizierten Zellen ergab der Spannungssprung keine Änderung in R (Abbildung 3-12a, schwarze Spur). Ist diese Abnahme von H^+ ein Hinweis auf einen Na^+/H^+ -Austausch?

Na⁺/H⁺-Austauscher transportieren H⁺ entgegen des Na⁺-Konzentrationsgradienten. Die „Richtung“ des elektroneutralen Na⁺/H⁺-Austauschs (Ex) lässt sich durch folgende Gleichung beschreiben;

$$Ex = (RT \ln([Na^+]_i/[Na^+]_e)) - (RT \ln([H^+]_i/[H^+]_e))$$

Dabei ist R die ideale Gaskonstante ($8,314 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T die Temperatur ($291,15 \text{ K}$) und $[Na^+]_{e/i}$ sowie $[H^+]_{e/i}$ die jeweils extra und intrazelluläre Na⁺-und H⁺-Konzentration. Eine Umkehr des Na⁺-Gradienten sollte eine Umkehr des H⁺-Transports zur Folge haben. Dies wurde untersucht, indem die extrazelluläre Na⁺-Konzentration $[Na^+]_e$ auf 0 mM gesetzt wurde (Na⁺-substituierte ES, Tabelle 2-10). Unter diesen Bedingungen konnte bei gleicher Stimulation eine Abnahme von R beobachtet werden (Abbildung 3-12b, blaue Spur). Diese Abnahme reflektiert eine Zunahme der intrazellulären H⁺-Konzentration und dadurch eine intrazelluläre Ansäuerung des Zytoplasmas. Wie zuvor zeigte R keine Veränderung in nicht-transfizierten Zellen (Abbildung 3-12b, schwarze Spur).

Der H⁺-Ausstrom (intrazelluläre Alkalisierung) bei einwärtsgerichtetem Na⁺-Gradienten (rote Spur) wird hier als *forward-mode*, der H⁺-Einstrom (intrazelluläre Azidifizierung) bei auswärtsgerichtetem Na⁺-Gradienten als *reverse-mode* definiert (blaue Spur).

Unter symmetrischen intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen sind sekundär-aktive Austauscher inaktiv, da kein treibender Gradient vorhanden ist. Um diese Bedingungen an *SpSLC9C1* zu testen, wurde eine Lösung mit $[Na^+]_e = [Na^+]_i$ (14 mM) und $\text{pH}_e = \text{pH}_i$ ($7,2$) verwendet (Tabelle 2-12). Unter symmetrischen Na⁺- und H⁺-Konzentrationen zeigt ein Spannungssprung keine Austauschaktivität. Erst wenn die Zelle wieder mit ES (140 mM Na^+) perfundiert wird, resultiert ein Spannungssprung in einer intrazellulären Alkalisierung (Abbildung 3-12c).

3. Ergebnisse

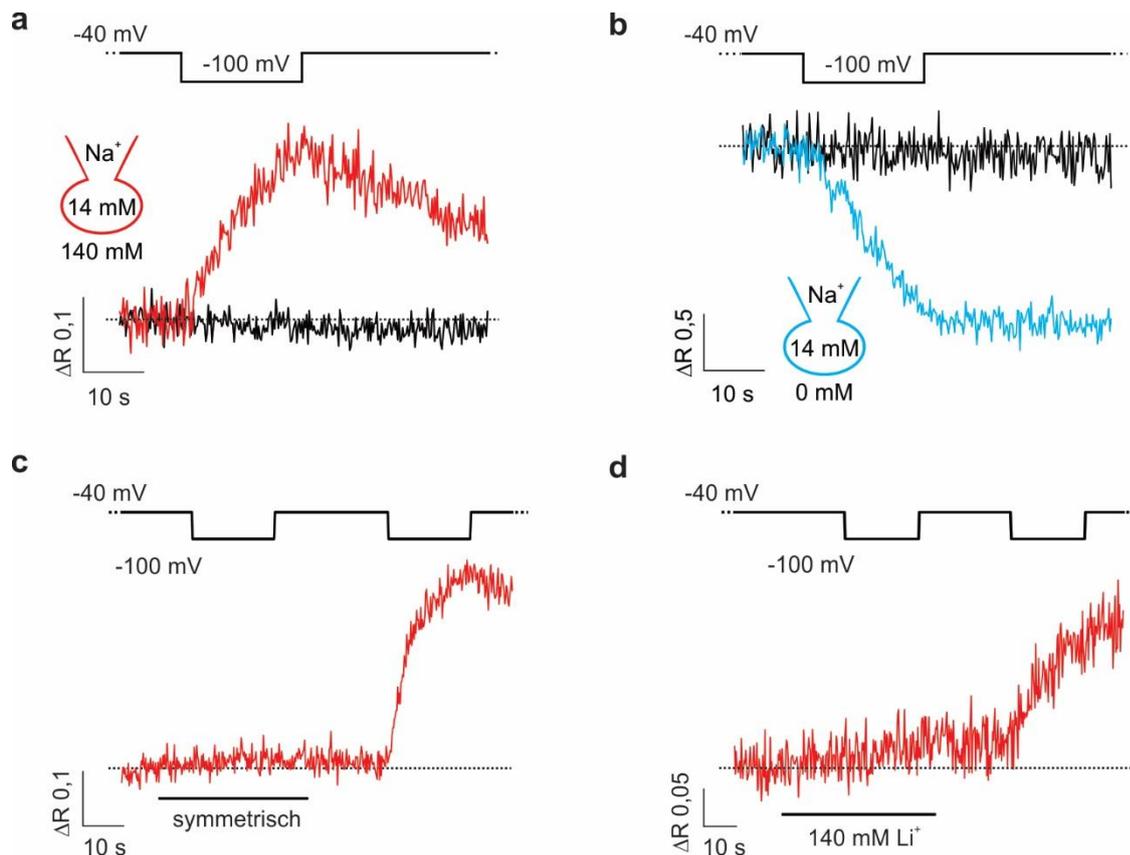


Abbildung 3-12: Spannungsimduzierte Änderung im pH_i durch in CHO-SpSLC9C1-Zellen: a) Dargestellt sind Spannungsprotokoll und Änderung des Fluoreszenzverhältnisses (ΔR) von BCECF als Indikator für eine Änderung des pH_i -Wertes über die Zeit. Ein Spannungspuls (20 s) von -40 mV auf -100 mV resultiert in einem Anstieg von R und damit einem Anstieg vom pH_i (rote Spur, *forward-mode*). Der Natriumgradient ist in dieser Konfiguration einwärts gerichtet. Nicht-transfizierte Zellen zeigen keine Änderung (schwarze Spur). b) Eine Umkehr des Natriumgradienten resultiert in einer Umkehr des spannungsinduzierten H^+ -Transports in CHO-SpSLC9C-Zellen (blaue Spur, *reverse-mode*). Nicht-transfizierte Zellen zeigen keine Änderung im pH_i (schwarze Spur). c) Wenn CHO-SpSLC9C1-Zellen mit einer Lösung umspült werden, die symmetrische intra- und extrazellulären Na^+ und H^+ -Konzentrationen beinhaltet ($[\text{Na}^+]_e = [\text{Na}^+]_i = 14 \text{ mM}$, $\text{pH}_e = \text{pH}_i = 7,2$, schwarzer Balken), findet kein spannungsaktivierter Na^+/H^+ -Austausch statt. Bei Rückkehr zur Standard-ES induziert ein Spannungssprung den Ionenaustausch wieder. d) CHO-SpSLC9C1-Zellen werden während des ersten Spannungssprungs mit 140 mM Li^+ -Lösung umspült (schwarze Linie). In dieser Zeit findet kein spannungsinduzierter Ionenaustausch statt. Erst eine Rückkehr zur Standard-ES ermöglicht den Na^+/H^+ -Austausch wieder. Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

Von sechs Mitgliedern der SLC9-Familie (SLC9A1-5, sowie SLC9A7) ist bekannt, dass sie neben Na^+ und H^+ ebenfalls Lithium (Li^+) transportieren können (Donowitz, Tse & Fuster, 2013). Um Li^+ als Substrat für SpSLC9C1 zu testen, wurde eine extrazelluläre Lösung verwendet, die statt Na^+ 140 mM Li^+ beinhaltet (Tabelle 2-11). Während

CHO-*SpSLC9C1*-Zellen mit Li^+ -Lösung perfundiert wurden, zeigte ein Spannungssprung von -40 mV auf -100 mV keine Änderung in R (Abbildung 3-12d).

Hellmer und Kollegen haben 2003 zwei transportrelevante Arginine in *MjNhaP1* identifiziert (Arg320 und Arg347, Hellmer *et al.*, 2003). Eine Punktmutation von Arg zu Ala inaktiviert (R320A) bzw. vermindert die Transportaktivität (R347A) von *MjNhaP1*. Beide Aminosäuren sind in *SpSLC9C1* konserviert (Arg399 und Arg431, siehe Abbildung 3-2). Eine Punktmutation von Arg399 zu Ala (R399A) inaktiviert auch hier den Ionentransport. Ein Spannungspuls von -40 mV auf -100 mV (20 s) zeigt keine Änderung in R (Abbildung 3-13a). Dass bei *SpSLC9C1*-R399A trotzdem *Gating*-Ströme messbar sind gibt einen Hinweis darauf, dass der mutierte Austauscher immer noch in die Plasmamembran exprimiert wird ($V_{1/2} = -87,7 \pm 2,8 \text{ mV}$, $s = 10,4 \pm 1,8 \text{ mV}$, $n = 3$, Abbildung 3-13b und c).

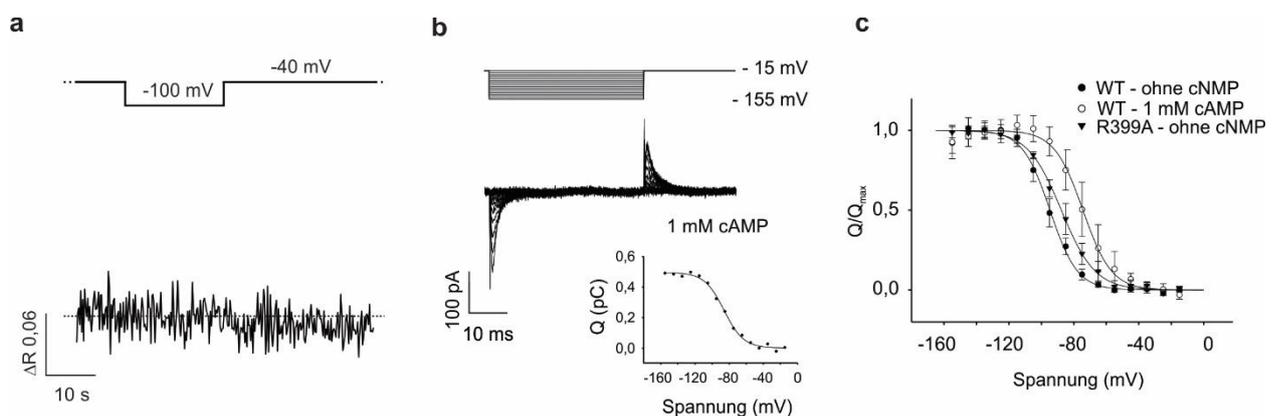


Abbildung 3-13: Eine Punktmutation von Arg399 zu Ala (R399A) resultiert in einem Verlust der Austauscheraktivität von *SpSLC9C1*: a) Dargestellt sind Spannungsprotokoll und Änderung des Fluoreszenzverhältnisses (ΔR) von BCECF als Indikator für eine Änderung des pH_i über die Zeit. Ein Spannungspuls von -40 mV auf -100 mV (20 s) zeigt keine Veränderung von R. b) Dargestellt sind Spannungsprotokoll und *Gating*-Ströme (pA) der *SpSLC9C1*-R399A-Mutante über die Zeit (ms). Ein Spannungsprotokoll von -15 mV bis -155 mV (40 ms) resultiert in *Gating*-Strömen ($V_{1/2} = -86,4 \text{ mV}$, $s = 11,3 \text{ mV}$, repräsentative Messung) und bestätigt die Anwesenheit von *SpSLC9C1*-R399A in der Zellmembran. c) Drei Messungen ergaben einem Mittelwert (\pm Standardabweichung, SD) der *Gating*-Ströme von $-87,7 \pm 2,8 \text{ mV}$ für $V_{1/2}$ und $10,4 \pm 1,8 \text{ mV}$ für s (schwarze Dreiecke). Zum Vergleich sind Q/V -Kurven von *SpSLC9C1*-WT in An- (offene Kreise) und Abwesenheit von cAMP gezeigt (schwarze Kreise). Alle Werte sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass es sich bei *SpSLC9C1* um einen spannungsgesteuerten und elektroneutralen Na^+/H^+ -Austauscher handelt, der Protonen entgegen des

3. Ergebnisse

Natriumgradienten transportiert. Die Rückkehr der Spannung auf V_{rest} von -40 mV terminiert die jeweilige intrazelluläre Alkalisierung (*forward-mode*) oder Azidifizierung (*reverse-mode*).

3.6 Die Spannungsabhängigkeit von *SpSLC9C1*

Als nächstes sollte die Spannungsabhängigkeit von *SpSLC9C1* untersucht werden. Um eine Aussage über das Spannungs-Aktivitäts-Verhältnis treffen zu können, muss die gesamte Spannungsabhängigkeit an derselben Zelle untersucht werden. Zusätzlich ist wichtig, dass die vom Austauscher induzierten pH-Änderungen im linearen Bereich des BCECF-Farbstoffs stattfinden. Idealerweise sollte die Messung immer vom selben Ausgangs-pH_i gestartet werden. Diese Bedingungen verhindern, dass eine Sättigung der Farbstoffkapazität fälschlicherweise als eine Abnahme der Na⁺/H⁺-Aktivität interpretiert wird.

Zunächst wurde untersucht, ob identische Spannungssprünge reproduzierbare pH_i-Änderungen hervorrufen. Die repetitive Aktivierung von *SpSLC9C1* führt jeweils zu einer transienten Alkalisierung; der pH_i-Wert kehrt nach Ende des Spannungssprungs wieder auf seinen Ausgangswert zurück (Abbildung 3-14). Dieser Prozess ist langsam und die Änderung von R nimmt spätestens nach dem dritten Spannungspuls ab. Auf diese Weise kann die Spannungsabhängigkeit von *SpSLC9C1* nicht reproduzierbar an einer Zelle gemessen werden. Die Gründe dafür können in der Abnahme der Sensitivität des pH-Farbstoffs oder in der zeitbedingten Abnahme der Austauscheraktivität (ein sogenannter *rundown*, Zhen *et al.*, 2006) liegen.

a

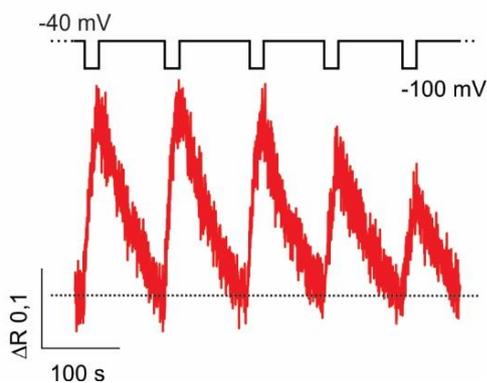


Abbildung 3-14: Wiederholte Aktivierung von *SpSLC9C1* im *forward-mode*: Dargestellt sind Spannungsprotokoll und Änderung des Fluoreszenzverhältnisses (ΔR) von BCECF als Indikator für eine Änderung des pH_i über die Zeit. Im *forward-mode* kann *SpSLC9C1* dreimal vom selben Ausgangs-pH_i aktiviert werden. Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb *SpSLC9C1* zusammen mit dem Protonenkanal H_v1 koexprimiert und im *reverse-mode* gemessen. H_v1 vermittelt bei Depolarisation einen H^+ -Auswärtsstrom, der die Zelle alkalisiert (DeCoursey & Cherny, 1995). Diese Alkalisierung wird genutzt, um den pH_i -Wert nach Ansäuerung durch *SpSLC9C1* im *reverse-mode* wieder auf den Ausgangswert zu bringen. H_v1 ist depolarisationsaktiviert bei Spannungen ≥ 30 mV und überlappt dadurch mit nicht dem Spannungsbereich des hyperpolarisationsaktivierten *SpSLC9C1*. Zunächst habe ich die pH_i -Änderung untersucht, die ausschließlich von H_v1 in einer Zelle hervorgerufen wurden (Abbildung 3-15).

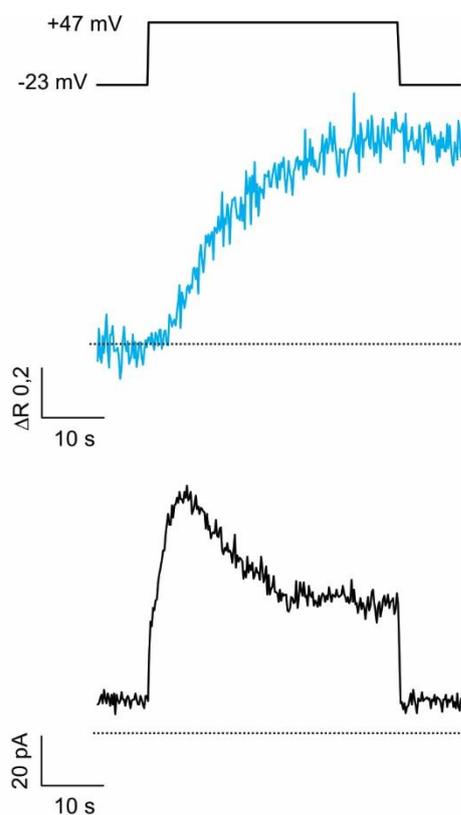


Abbildung 3-15: pH-Fluorimetrie an H_v1 -exprimierenden CHO-WT-Zellen in Abwesenheit von *SpSLC9C1*: Dargestellt sind Spannungsprotokoll und Änderung des Fluoreszenzverhältnisses (ΔR) von BCECF als Indikator für eine Änderung des pH_i über die Zeit. Die untere Abbildung zeigt den Strom (pA) durch H_v1 über die Zeit. Ein Spannungspuls (35 s) von -23 mV auf +47 mV (oben) öffnet H_v1 und alkalisiert dadurch das Zytoplasma (blaue Spur). Die Alkalisierung erreicht nach circa 25 s einen stabilen Zustand. Die Offenwahrscheinlichkeit von H_v1 ist pH-abhängig und wird durch die Alkalisierung stetig herabgesetzt. Der H_v1 -Strom (unten, schwarze Spur) ist dabei transient. Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

Ein Spannungssprung von -23 mV auf +47 mV resultiert in einer schnellen Alkalisierung durch H_v1 , die nach circa 15 s einen stabilen Wert erreicht (Abbildung 3-15, oberes Bild). Der dazugehörige H_v1 -Strom zeigt ein transientes Verhalten; ein schnell ansteigender H^+ -Auswärtsstrom erreicht nach wenigen Sekunden sein Maximum und nimmt anschließend wieder ab. Dieser Umstand ist unter anderem der pH-Sensitivität von H_v1 geschuldet, der bei alkalischem pH_i größere Spannungen zur Aktivierung benötigt (Musset & Decoursey, 2012). Seine Leitfähigkeit wird bei +47 mV in der Spannungsklemme durch die Alkalisierung

3. Ergebnisse

sukzessive herabsetzt (Abbildung 3-15, unteres Bild, Musset & Decoursey 2012). Außerdem verringert ein pH_i -Anstieg die Treibkraft (*driving force*) für einen H^+ -Auswärtsstrom.

In Zellen, die sowohl H_v1 als auch SpSLC9C1 exprimieren, wurde überprüft, wie reproduzierbar identische Spannungssprünge in pH -Änderungen umgesetzt werden. Durch die repetitive Ansäuerung von SpSLC9C1 (*reverse-mode*) und die anschließende Alkalisierung durch H_v1 entsteht ein sägeblattähnliches „Zick-Zack“-Muster (Abbildung 3-16).

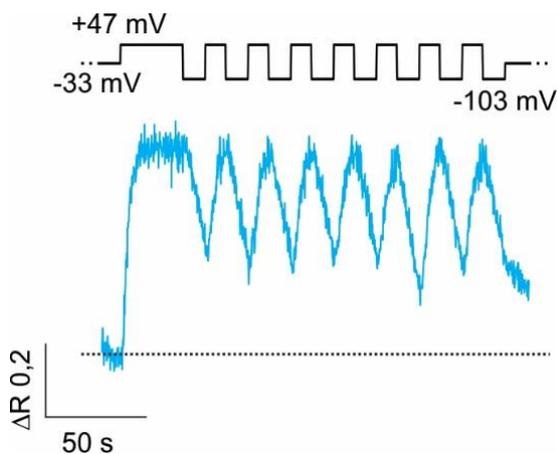


Abbildung 3-16: pH-Fluorimetrie an CHO- SpSLC9C1 -Zellen mit koexprimiertem H_v1 -Kanal: Dargestellt sind Spannungsschrittprotokoll und Änderung des Fluoreszenzverhältnisses (ΔR) von BCECF als Indikator für eine Änderung des pH_i über die Zeit. Die Messung zeigt die abwechselnde Aktivierung von H_v1 bei +47 mV und SpSLC9C1 (im *reverse-mode*) bei -103 mV. Die dadurch ausgelöste Alkalisierung und Azidifikation erzeugt in der Messung ein „Zick-Zack“-Muster. Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

Es wurde überprüft, ob der Spannungsbereich zur Aktivierung von SpSLC9C1 den H_v1 -Kanal öffnet und vice versa. Zellen die nur den H_v1 -Kanal exprimieren zeigen auch bei der kleinsten Spannung von -23 mV keine H_v1 -Aktivität (Abbildung 3-17a). Zellen die nur den Austauscher exprimieren zeigen keinen Unterschied in der Fluoreszenz bei -40 mV und +50 mV (Abbildung 3-17b).

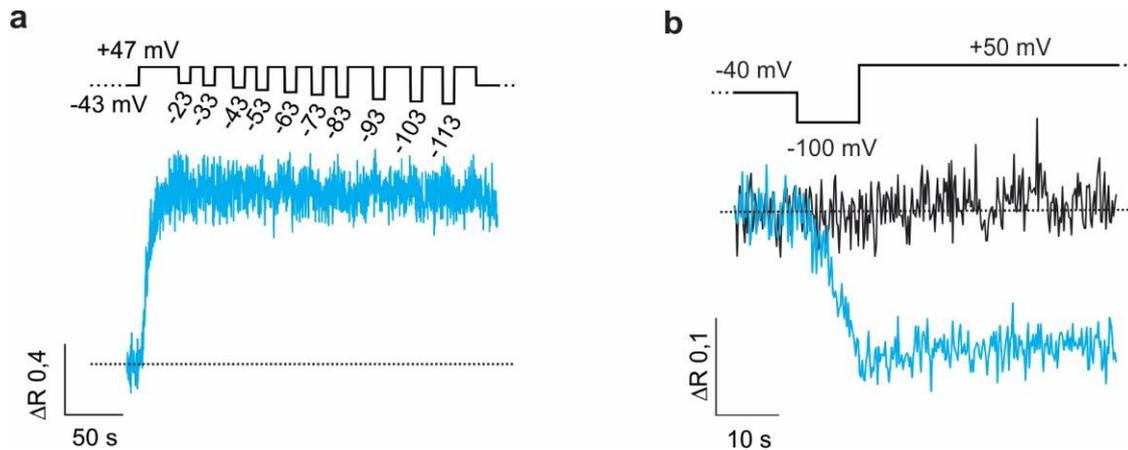


Abbildung 3-17: Kontrollmessungen in CHO-Zellen mit dem H_v1 -Kanal (ohne $SpSLC9C1$) und CHO- $SpSLC9C1$ -Zellen (ohne H_v1): Dargestellt sind Spannungsprotokoll und Änderung des Fluoreszenzverhältnisses (ΔR) von BCECF als Indikator für eine Änderung des pH_i über die Zeit. a) Der H_v1 -Kanal (ohne $SpSLC9C1$) zeigt keine Änderungen im pH_i bei Spannungspulsen von -23 mV bis -113 mV. b) CHO- $SpSLC9C1$ -Zellen (blau), bzw. nicht-transfizierten CHO-K1-Zellen (schwarz) ohne den H_v1 -Kanal zeigen keine Änderungen im pH_i bei +50 mV. Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

Anschließend wurde die Spannungsabhängigkeit von $SpSLC9C1$ durch Anlegen unterschiedlicher Spannungswerte untersucht. Der H_v1 -Kanal wurde in diesem Protokoll immer bei derselben Spannung von +47 mV aktiviert (Abbildung 3-18a & b).

Zur Analyse wurde die Steigung des Fluoreszenzverhältnisses R jeder Ansäuerung gegen die jeweilige Spannung aufgetragen und normalisiert (Abbildung 3-18c). Die Spannungsabhängigkeit wurde durch eine Boltzmann-Gleichung angepasst (Abbildung 3-18c, *inset*). Abbildung 3-18a zeigt eine repräsentative Messung mit einem $V_{1/2}$ -Wert von -70,4 mV und einer Steigung s von 3,0 mV. Wenn die Reihenfolge der Spannungspulse (von -103 mV bis -23 mV) umgekehrt wird, kommt es zu einem ähnlichen Ergebnis (Abbildung 3-18b, $V_{1/2} = -68,4$ mV, $s = 3,1$ mV). Der Mittelwert für $V_{1/2}$ und die Steigung s beträgt $-70,9 \pm 2,5$ mV und $3,3 \pm 0,9$ mV ($n = 7$, Abbildung 3-18d). Alle Ergebnisse sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

3. Ergebnisse

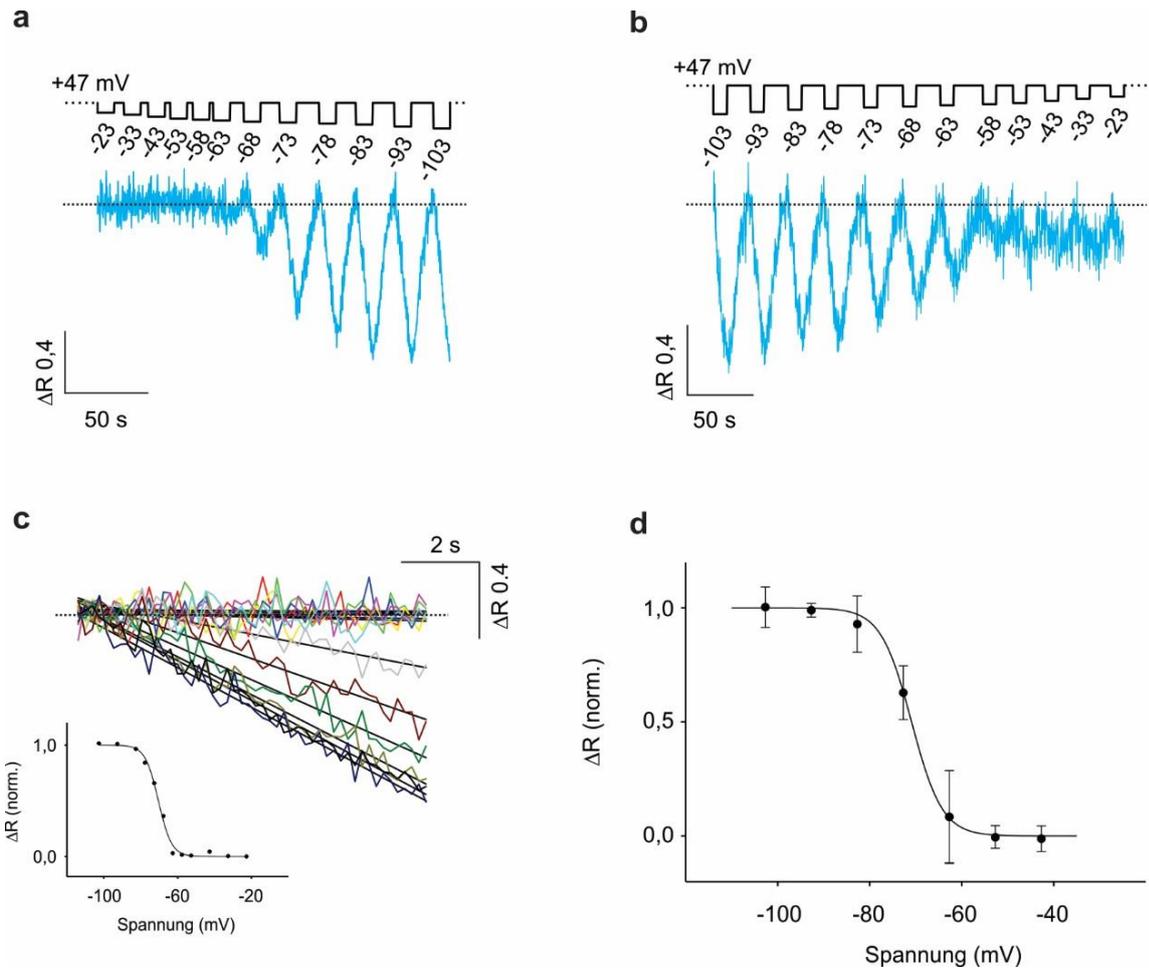


Abbildung 3-18: pH-Fluorimetrie zur Bestimmung von $V_{1/2}$ und der Steigung s in CHO-SpSLC9C1-Zellen mit dem H₁-Kanal: Dargestellt sind Spannungsprotokoll und Änderung des Fluoreszenzverhältnisses (ΔR) von BCECF als Indikator für eine Änderung des pH_i über die Zeit. a) Spannungssprünge von -23 mV bis -103 mV zeigen die Spannungsabhängigkeit der SpSLC9C1 vermittelten Ansäuerung. Es ergab sich ein $V_{1/2}$ -Wert von -70,4 mV und eine Steigung s von 3,0 mV (repräsentative Messung). b) Eine Umkehr in der Reihenfolge der Spannungspulse (-103 mV bis -23 mV) kommt zu demselben Ergebnis ($V_{1/2} = -68,4$ mV, $s = 3,1$ mV, repräsentative Messung). c) Zur Analyse wurde für jedes ΔR die Steigung bestimmt. Diese wurde normalisiert (1 = maximal aktiv, 0 = inaktiv) und gegen die Spannung aufgetragen (inset, Messung aus a). d) Sieben Messungen ergaben einen Mittelwert (\pm SD) von $-70,9 \pm 2,5$ mV für $V_{1/2}$ und $3,3 \pm 0,9$ mV. Alle Werte sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

3.7 Die Spannungsabhängigkeit wird durch cAMP moduliert

Mithilfe von H_v1 konnte die Spannungsabhängigkeit von $SpSLC9C1$ bestimmt werden. In Kapitel 3.4 wurde gezeigt, dass die Bewegung des Spannungssensors durch cAMP moduliert wird. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob zyklische Nukleotide auch die Austauschaktivität beeinflussen. Dazu wurde die Spannungsabhängigkeit von $SpSLC9C1$ (im *reverse-mode*) mithilfe von H_v1 in der Anwesenheit von 1 mM cAMP und cGMP in der Pipettenlösung untersucht. Gegenüber einem $V_{1/2}$ -Wert von -70,4 mV ($s = 3,0$ mV) ohne cNMP startet der Ionenaustausch mit 1 mM cAMP bei weniger negativen Potentialen mit einem $V_{1/2}$ -Wert von -53,4 mV ($s = 3,3$ mV). Abbildung 3-19a und b zeigen jeweils eine repräsentative Messung ohne und mit 1 mM cAMP in der Pipette. Sieben Messungen ergaben einen Mittelwert von $-56,8 \pm 2,7$ mV für $V_{1/2}$ und $4,6 \pm 1,5$ mV für die Steigung s (Abbildung 3-19c, weiße Punkte). Wie bei den *Gating*-Strömen, war cGMP (1 mM) weniger effektiv ($V_{1/2} = -67,8 \pm 5,4$ mV, $s = 2,8 \pm 1,0$ mV, Abbildung 3-19c, schwarze Dreiecke).

3. Ergebnisse

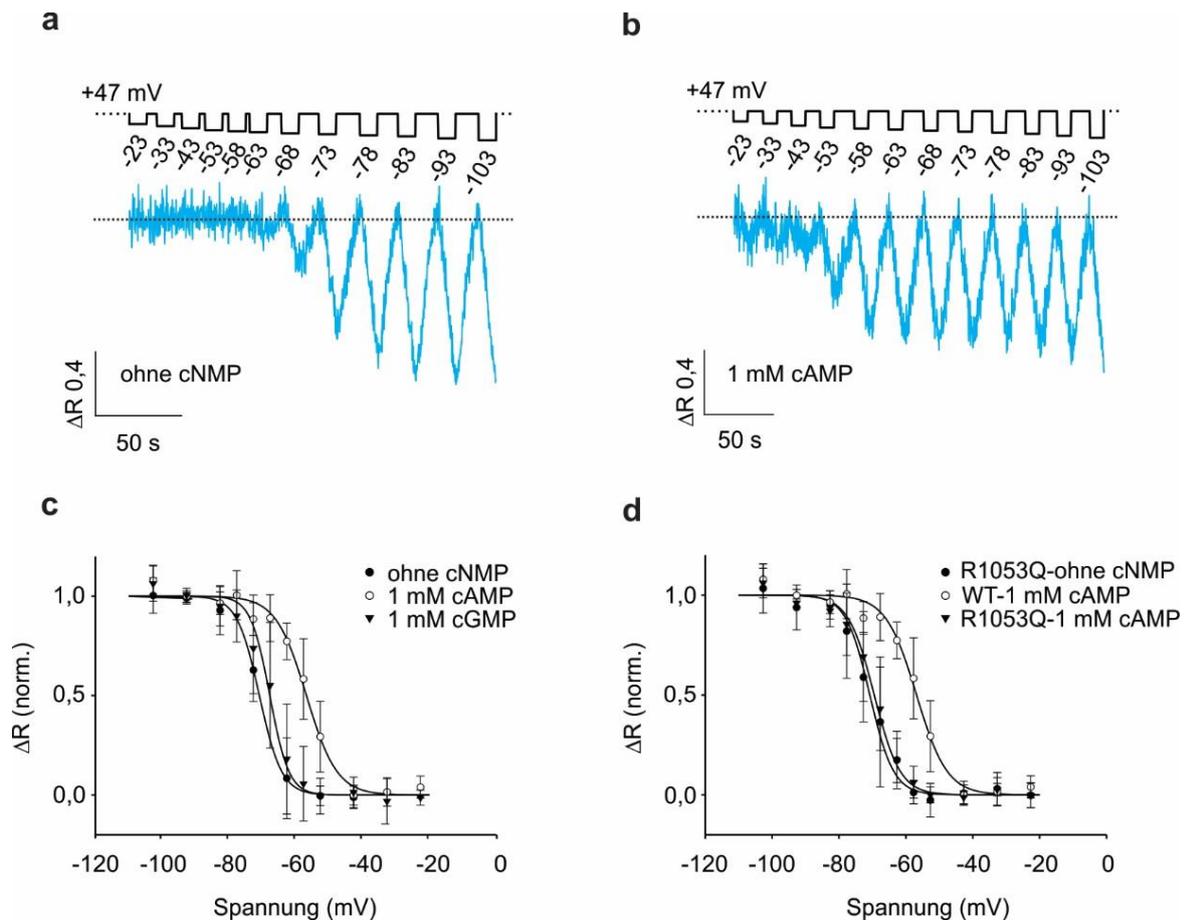


Abbildung 3-19: Spannungsabhängigkeit von *SpSLC9C1* in An- und Abwesenheit von zyklischen Nucleotiden in CHO-*SpSLC9C1*-Zellen (mit H1): Dargestellt sind Spannungsprotokoll und Änderung des Fluoreszenzverhältnisses (ΔR) von BCECF als Indikator für eine Änderung des pH_i über die Zeit. a) Repräsentative Messung in Abwesenheit von zyklischen Nucleotiden ($V_{1/2} = -70,4$ mV, $s = 3,0$ mV) im Vergleich mit b) einer repräsentativen Messungen mit 1 mM cAMP ($V_{1/2} = -53,4$ mV, $s = 3,3$ mV). c) Normalisierte Steigungen der ΔR -Werte sind gegen die Spannung aufgetragen. Mittelwerte für $V_{1/2}$ und s durch Anpassung an die Boltzmann-Gleichung sind: ohne cNMP (schwarze Kreise): $V_{1/2} = -70,9 \pm 2,5$ mV, $s = 3,3 \pm 0,9$ mV, $n = 7$. 1 mM cAMP (offene Kreise): $V_{1/2} = -56,8 \pm 2,7$ mV, $s = 4,6 \pm 1,5$ mV, $n = 7$. 1 mM cGMP (schwarze Dreiecke), $V_{1/2} = -67,8 \pm 5,4$ mV, $s = 2,8 \pm 1,0$ mV, $n = 9$. d) Eine Punktmutation in der CNBD (R1053Q) zur Verringerung der cNMP-Affinität zeigt in Abwesenheit von cAMP keine Änderung zu $V_{1/2}$ -Wert und s des Wildtyps ($V_{1/2} = -70,8 \pm 4,8$ mV, $s = 3,6 \pm 1,1$ mV, $n = 5$, schwarze Punkte), verhindert aber die Modulation durch 1 mM cAMP ($V_{1/2} = -69,5 \pm 3,8$ mV, $s = 3,9 \pm 1,2$ mV, $n = 6$, schwarze Dreiecke). Zum Vergleich sind Daten des Wildtyps mit 1 mM cAMP aufgetragen (offene Kreise). Alle Werte sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

Es wurde geprüft, ob cAMP die Spannungsabhängigkeit über die direkte Bindung an die CNBD beeinflusst. Die R1053Q-Mutante hatte keinen Einfluss auf den $V_{1/2}$ -Wert in Abwesenheit von cNMP (Abbildung 3-19d, schwarze Punkte, $V_{1/2} = -70,8 \pm 4,8$ mV,

$s = 3,6 \pm 1,1$ mV, $n = 5$), sie verhinderte aber die Modulation durch cAMP (Abbildung 3-19d, schwarze Dreiecke, $V_{1/2} = -69,5 \pm 3,8$ mV, $s = 3,9 \pm 1,2$ mV, $n = 6$).

Die Bestimmung von $V_{1/2}$ hat gezeigt, dass die Spannungsabhängigkeit von *SpSLC9C1* durch cAMP moduliert wird. Ein Nachteil der hier benutzten Methode ist der Vergleich von verschiedenen Zellen miteinander. Ein eleganter Weg zur Untersuchung der direkten Wirkung zyklischer Nukleotide ist der Einsatz sogenannten *caged-compounds*. Im Rahmen dieser Arbeit kamen zu diesem Zweck die biologisch inaktiven Moleküle BCMCM-cAMP und BECMCM-cAMP (*caged* cAMP) zum Einsatz, die durch Blitzlicht-Photolyse in ihre aktive Form (cAMP) umgewandelt werden können.

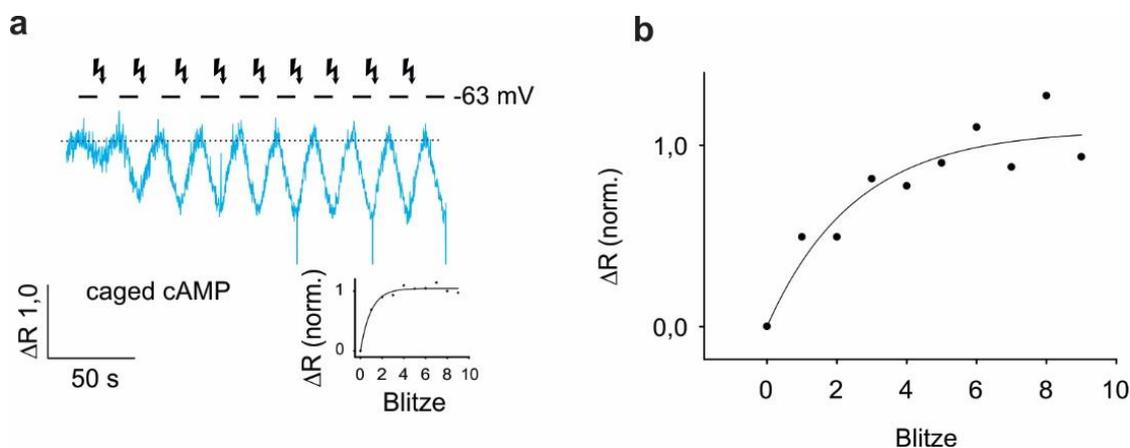


Abbildung 3-20: Modulation der Spannungsabhängigkeit von *SpSLC9C1* durch *caged-compounds*: Dargestellt sind Spannungsprotokoll und Änderung des Fluoreszenzverhältnisses (ΔR) von BCECF als Indikator für eine Änderung des pH_i über die Zeit. Freisetzung von cAMP aus einer biologisch inaktiven Form (*caged* cAMP) zeigt die Modulation der Spannungsabhängigkeit an einer Zelle (CHO-*SpSLC9C1*-Zellen mit dem H_v1 -Kanal). a) Blitzlicht-Photolyse von *caged* cAMP erhöht die *SpSLC9C1*-Aktivität bei gleichbleibender Spannung (-63 mV). Im *inset* ist die Änderung im Fluoreszenzverhältnis R (normalisiert) gegen die Anzahl der Blitze aufgetragen. Die Aktivität sättigt nach 3-4 Blitzen. b) Eine Verringerung der Lichtintensität der Blitze verzögert die Sättigung der *SpSLC9C1* Aktivität auf 5-6 Blitze. Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

In diesem Experiment wurde *SpSLC9C1* zusammen mit dem H_v1 -Protonenkanal koexprimiert und wiederholt auf einer Spannung gehalten, die unterhalb des $V_{1/2}$ -Wertes liegt (-63 mV, Abbildung 3-20a). In diesem Spannungsbereich ist der Austauscher nur marginal aktiv (siehe Abbildung 3-19c, schwarze Punkte). Die Freisetzung von cAMP sollte die Austauschaktivität bei gleichbleibender Spannung fast bis zur Sättigung bringen (Abbildung 3-19c, weiße Punkte).

3. Ergebnisse

Die Beladung der Zelle mit *caged* cAMP geschah zu diesem Zweck sowohl über die Membran als auch über die Pipette (siehe Kapitel 2.7.4).

Vor der Blitzlicht-Photolyse zeigte der *Sp*SLC9C1 nur eine geringe Austauschaktivität (Abbildung 3-20a). Der erste Blitz (300 V) steigerte die *Sp*SLC9C1 vermittelte Ansäuerung. Der Effekt sättigte nach circa zwei bis drei Blitzen (Abbildung 3-20a, *inset*). Eine verminderte Lichtintensität (200 V) verzögerte die Sättigung der Austauschaktivität durch die Blitzlicht-Photolyse auf circa sechs Blitze (Abbildung 3-20b). Nach der vollständigen Freisetzung von *caged* cAMP wurde die Spannungsabhängigkeit bestimmt ($n = 3$). Es ergab sich ein $V_{1/2}$ -Wert von $-55,3 \pm 5,1$ mV und eine Steigung s von $5,0 \pm 0,6$ mV (Abbildung 3-21).

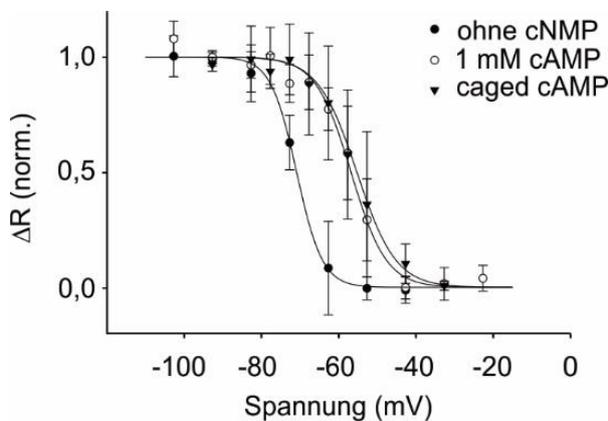


Abbildung 3-21: Spannungsabhängigkeit von *Sp*SLC9C1 nach Freisetzung von *caged* cAMP: Nach Freisetzung von cAMP aus der biologisch inaktiven Form (*caged* cAMP) in CHO-*Sp*SCL9C1-Zellen wurden $V_{1/2}$ - und s -Werte ermittelt: $V_{1/2} = -55,3 \pm 5,1$ mV, $s = 5,0 \pm 0,6$ mV, $n = 3$, schwarze Dreiecke. Zum Vergleich sind Kurven der Spannungsabhängigkeit in An- (offene Kreise) und Abwesenheit von cAMP gezeigt (schwarze Kreise, siehe Abbildung 3-19 und Tabelle 3-1). Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

3.8 SLC9-spezifische Blocker sind ineffektiv gegen *Sp*SLC9C1

Bestimmte Na^+/H^+ -Austauscher werden durch Amilorid blockiert (Mochizuki-oda & Oosawa, 1985; Mihaila, 2015). Unter anderem blockieren Amilorid und Amilorid-Derivate den Ionentransport von SLC9A1, aber nicht von SLC9A3 (Levine *et al.*, 1993; Orłowski, 1993; Tse, S. a Levine, *et al.*, 1993). Über Chimären aus Amilorid-sensitiven und insensitiven Austauschern wurden drei Sequenzabschnitte in SLC9A1 aus dem Menschen, der Maus und der Ratte identifiziert, die diese Sensitivität vermitteln (Abbildung 3-22, *Hs*-, *Mm*- und *Rn*SLC9A1, rot, Pedersen *et al.*, 2007).

	III	IV	
SpSLC9C1	-FKKLPIPYTVVLLILGAILGVVASNVPLVEEHTRDVAHMDPHVLLQIFLPLVLI FESAFAMDV		156
HsSLC9A1	PTISSIVPESCLLIVVGLLVGGLIKGVGET-----PPF-LQSDVFFLELLPPIILDAGYFLPL		179
MmSLC9A1	PTISSIVPESCLLIVVGLLVGGLIKGVGET-----PPF-LQSDVFFLELLPPIILDAGYFLPL		183
RnSLC9A1	PTISSIVPESCLLIVVGLLVGGLIKGVGET-----PPF-LQSDVFFLELLPPIILDAGYFLPL		183
HsSLC9A3	HKVTSVVPESALLIVLGLVVLGGIVWAADHI-----ASF TLTPTVFFFYLLPPIVLDAGYFMPN		123
MmSLC9A3	HKVTSIVPESALLIVLGLVVLGGIVWAADHI-----ASF TLTPTLFFFYLLPPIVLDAGYFMPN		128
RnSLC9A3	HKVTSVVPESALLIVLGLVVLGGIVWAADHI-----ASF TLTPTLFFFYLLPPIVLDAGYFMPN		130
	XII	XIII	
SpSLC9C1	DWFYLIILYLAIITIRGMVISLFSPILSRI-GYGLTWRNAVIMTWGGLRGAVGLALALVVENL		434
HsSLC9A1	NWTFVISTLLFCLIA RVLVGLT WFWINKFRIVKLT PKDQFI AYGGLRGAT AFS GYLLDKK		461
MmSLC9A1	NWTFVISTLLFCLIA RVLVGLT WFWINKFRIVKLT PKDQFI AYGGLRGAT AFS GYLLDKK		465
RnSLC9A1	NWTFVISTLLFCLIA RVLVGLT WFWINKFRIVKLT PKDQFI AYGGLRGAT AFS GYLLDKK		465
HsSLC9A3	NTAFVLLTLV FISVYRAIG VVLQ TWILNRYRMVQLEP IDQV VLSYGG LRGAV AFALV VLLDGD		418
MmSLC9A3	NTAFVLLTLV FISVYRAIG VVLQ TWILNRYRMVQLET IDQV VMSYGG LRGAV AYALV VLLDEK		413
RnSLC9A3	NTAFVLLTLV FISVYRAIG VVLQ TWILNRYRMVQLET IDQV VMSYGG LRGAV AYALV VLLDEK		415

Abbildung 3-22: Sequenzvergleich von Abschnitten der NHE-Domäne von SLC9A1 und SLC9A3 aus Säugetieren mit dem jeweiligen Sequenzabschnitt aus SpSLC9C1: Amilorid und Amilorid-Derivate blockieren SLC9A1, aber nicht SLC9A3 in Säugetieren. Gezeigt sind SLC9C1 aus dem Seeigel *S. purpuratus* (SpSLC9C1) sowie SLC9A1- und SLC9A3-Na⁺/H⁺-Austauscher aus Mensch (Hs-), Maus (Mm-) und Ratte (Rn-). Die rot markierten Sequenzabschnitte sind mit der Vermittlung einer Sensitivität gegen Amilorid und Amilorid-Derivate assoziiert (Pedersen *et al.*, 2007). Die schwarz markierten Aminosäuren zeigen Unterschiede zwischen SLC9A1 und SLC9A3 in den jeweiligen Abschnitten. Keine der Peptidsequenzen sind in SpSLC9C1 konserviert.

Abbildung 3-22 zeigt die Aminosäuren in den jeweiligen Abschnitten, die in SLC9A1, aber nicht in SLC9A3 konserviert sind (Mensch und Maus, schwarze Markierung). Die Sequenzabschnitte sind weder in Sp-, noch in Hs- oder MmSLC9C1 konserviert (vorausgesagte TMDs V, XII und XIII von SpSLC9C1, grau). Womöglich haben SLC9-Blocker keinen Einfluss auf den spermien-spezifischen SLC9C1.

Vier Blocker wurden an CHO-SpSLC9C1-Zellen in der pH-Fluorimetrie auf ihre Wirksamkeit geprüft: Amilorid, N-substituierte Amilorid-Derivate (EIPA), Cariporide (HOE642) und Phloretin (Burckhardt, Di Sole & Helmle-Kolb, 2002). Die Substanzen wurden in folgenden Konzentrationen (gelöst in ES) verwendet; Amiloride = 500 µM, EIPA = 100 µM, Cariporide = 100 µM und Phloretin = 200 µM. Zwei Spannungspulse (10 s) von -100 mV wurden in An- und Abwesenheit des jeweiligen Blockers angelegt (Abbildung 3-23a-d). Bei keiner der eingesetzten Substanzen konnte ein Block der SpSLC9C1-Aktivität festgestellt werden.

3. Ergebnisse

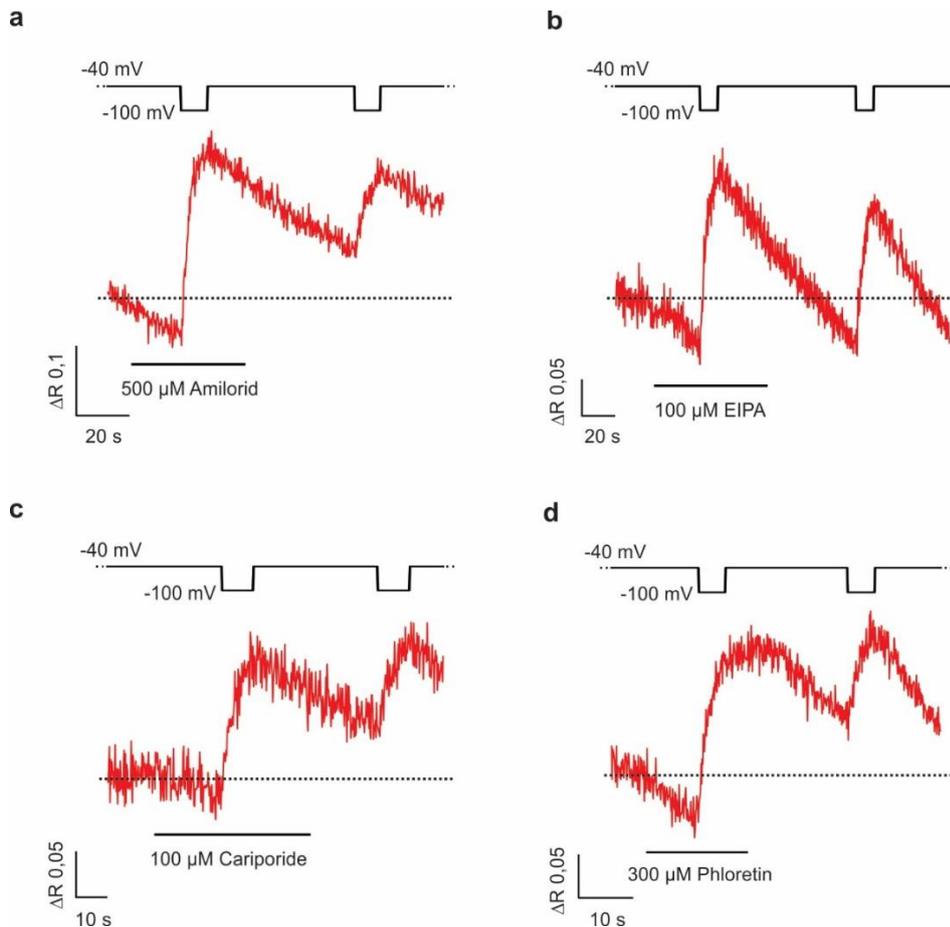


Abbildung 3-23: Untersuchung von SLC9-Blockern an *SpSLC9C1*: Vier Blocker (in ES) wurden auf ihre Wirksamkeit an CHO-*SpSLC9C1*-Zellen in der pH-Fluorimetrie untersucht (Amiloride = 500 μM , EIPA = 100 μM , Cariporide = 100 μM und Phloretin = 200 μM). Dargestellt sind Spannungsprotokoll und Änderung des Fluoreszenzverhältnisses (ΔR) von BCECF als Indikator für eine Änderung des pH_i über die Zeit. Zwei Spannungspulse (10 s) von -40 mV auf -100 mV wurden in An- und Abwesenheit des jeweiligen Blockers angelegt. Keine der eingesetzten Substanzen zeigte einen Block der Austauscheraktivität. Eine geringere Auslenkung von ΔR reflektiert entweder einen *rundown* der Austauschaktivität oder einer Abnahme der pH-Sensitivität von BCECF (siehe Kapitel 3.6). Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

SLC9A1 ist ein ubiquitär vorkommender Austauscher in Säugern und dient unter anderem der Zell-Homöostase (Pouyssegur *et al.*, 1984; Grinstein, Rotin & Mason, 1989). SLC9A1-spezifische Blocker zeigten keine Wirkung auf *SpSLC9C1* (Abbildung 3-23). Dadurch konnte kontrolliert werden, ob endogene SLC9A1-Austauscher in CHO-Zellen die hier angewandten Messverfahren beeinflussen. Zuerst wurde dazu die Wirksamkeit von Amilorid auf SLC9A1 in CHO-Zellen geprüft. Im sogenannten *acid-load*-Experiment wurden nicht-transfizierte CHO-Zellen mit 10 mM NH_4Cl in ES alkalisiert (200 s, Kapitel 2.7.3). Anschließend wurden die Zellen mit Na^+ -freier ES umspült (200 s). Ungeladenes NH_3

diffundiert aus der Zelle, setzt ein H^+ frei und säuert die Zelle an. Die Abwesenheit von Na^+ verhindert, dass endogene Austauscher aktiv sind. Es wird keine pH_i -Änderung beobachtet. Im nächsten Schritt wird Amilorid ($500 \mu M$) in ES ($140 mM Na^+$) für 200 s perfundiert. Erst wenn die Zellen mit Amilorid-freier ES umspült werden, alkalisieren die Zellen auf ihren Ursprungswert (representative Messung Abbildung 3-24, $n=3$). Das lässt den Schluss zu, dass Amilorid die endogenen Na^+/H^+ -Austauscher blockiert.

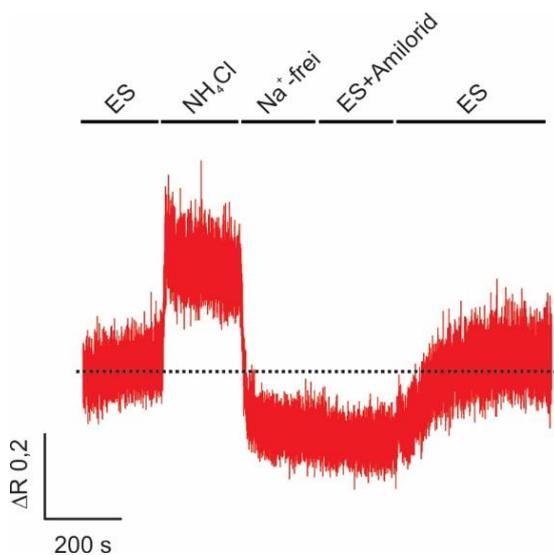


Abbildung 3-24: Repräsentative Messung eines acid-load-Experiments in CHO-K1-Zellen: Dargestellt ist die Änderung des Fluoreszenzverhältnisses (ΔR) von BCECF als Indikator für eine Änderung des pH_i über die Zeit. BCECF-AM-beladene Zellen ($10 \mu M$ in ES, 10 min, circa 30-Zellen) werden 200 s mit NH_4Cl in ES alkalisiert. Anschließende Perfusion mit Na^+ -freier ES (NMDG-substituiert) säuert die Zellen an. Die Anwesenheit von $500 \mu M$ Amilorid in normaler ES ($140 mM Na^+$) verhindert eine Rückkehr zum Ausgangs-pH der Zellen. Erst als Amilorid-freie ES perfundiert wird alkalisieren die Zellen auf den Ausgangswert ($n=3$). Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

Als nächstes wurde die Spannungsabhängigkeit von $SpSLC9C1$ mithilfe von H_v1 (Kapitel 3.6) in Anwesenheit von $500 \mu M$ Amilorid untersucht. Abbildung 3-25a zeigt eine repräsentative Messung ($V_{1/2} = -72,3 mV$, $s = 1,9 mV$). Vier Messungen ergaben einen Mittelwert von $-72,3 \pm 2,2 mV$ für $V_{1/2}$ und $2,8 \pm 1,1 mV$ für s (Abbildung 3-25b, schwarze Dreiecke). Dieser weicht nicht von den Werten der Messungen ohne Amilorid ab ($V_{1/2} = -70,9 \pm 2,5 mV$, $s = 3,3 \pm 0,9 mV$, $n=7$, schwarze Punkte). Daraus kann geschlossen werden, dass Amilorid-sensitive, endogene Na^+/H^+ -Austauscher in CHO-Zellen keinen Einfluss auf die hier angewandten Messverfahren haben.

3. Ergebnisse

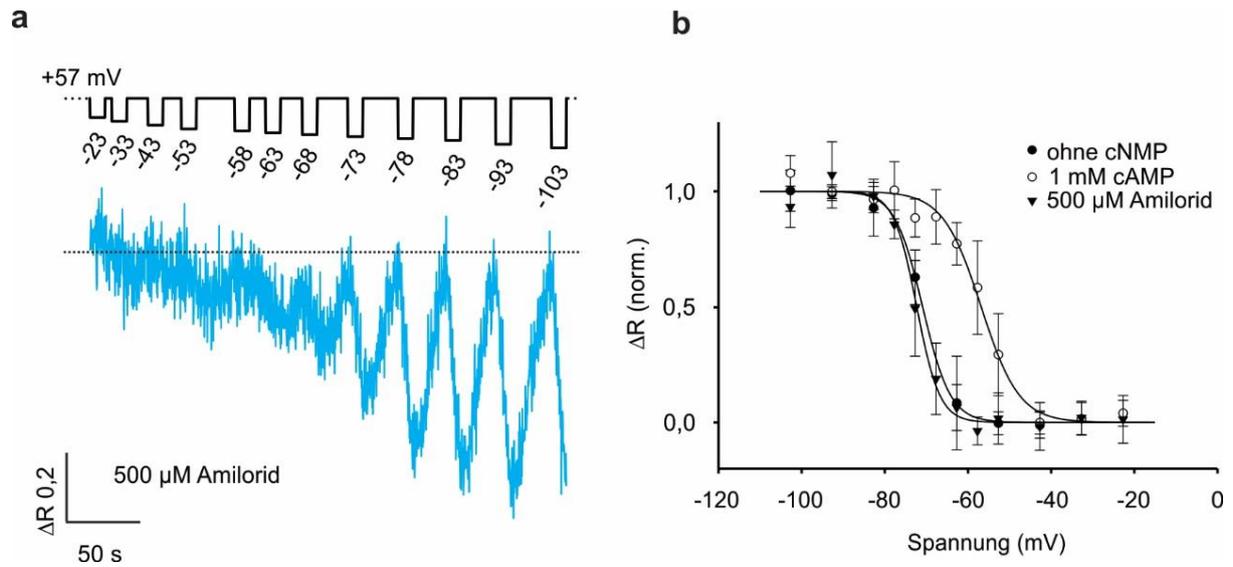


Abbildung 3-25: Endogene Austauscher haben keinen Einfluss auf die Messmethodik: a) Dargestellt sind Spannungsprotokoll und Änderung des Fluoreszenzverhältnisses (ΔR) von BCECF als Indikator für eine Änderung des pH_i über die Zeit. a) Eine repräsentative Messung der Spannungsabhängigkeit in Kombination mit H_v1 in Anwesenheit von 500 μM Amilorid ($V_{1/2} = -72,3 \text{ mV}$, $s = 1,9 \text{ mV}$). b) Vier Messungen ergaben einen Mittelwert ($\pm \text{SD}$) von $-72,3 \pm 2,2 \text{ mV}$ für $V_{1/2}$ und $2,8 \pm 1,1 \text{ mV}$ für s . Zum Vergleich sind Daten des Wildtyps mit 1 mM (offene Kreise) und ohne cAMP mit aufgetragen (schwarze Punkte). Alle Werte sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

	<i>Gating</i> -Ströme				Austauschaktivität		
	$V_{1/2}$ (mV)	s (mV)	q_g (e_0)	n	$V_{1/2}$ (mV)	s (mV)	n
WT - ohne cNMP	$-94,7 \pm 2,9$	$8,5 \pm 0,8$	3,1	6	$-70,9 \pm 2,5$	$3,3 \pm 0,9$	7
WT - cAMP	$-74,4 \pm 6,4$	$8,8 \pm 1,9$	2,9	7	$-56,8 \pm 2,7$	$4,6 \pm 1,5$	7
WT - cGMP	$-86,9 \pm 3,0$	$8,3 \pm 1,0$	3,1	7	$-67,8 \pm 5,4$	$2,8 \pm 1,0$	9
R1053Q - ohne cNMP	$-93,4 \pm 1,7$	$9,4 \pm 2,0$	2,8	6	$-70,8 \pm 4,8$	$3,6 \pm 1,1$	5
R1053Q - cAMP	$-93,9 \pm 4,2$	$1,3 \pm 1,0$	2,5	5	$-69,5 \pm 3,8$	$3,9 \pm 1,2$	6
R803Q - ohne cNMP	$-117,9 \pm 7,1$	$13,0 \pm 1,1$	2,0	7	n.e.	n.e.	
R803Q - cAMP	$-96,8 \pm 6,6$	$13,5 \pm 2,6$	1,9	6	n.e.	n.e.	
R399A - ohne cNMP	$-87,7 \pm 2,8$	$10,4 \pm 1,8$	2,5	3	n.e.	n.e.	
WT - caged cAMP	n.e.	n.e.	n.e.		$-55,3 \pm 5,1$	$5,0 \pm 0,6$	3
WT - 500 μ M Amiloride	n.e.	n.e.	n.e.		$-73,3 \pm 2,2$	$2,8 \pm 1,1$	4

Tabelle 3-1: Zusammenfassung der Analyse von *Gating*-Strömen und Austauschaktivität: $V_{1/2}$ beschreibt das Potential an dem ΔQ für *Gating*-Ströme bzw. ΔR für die Austauschaktivität = $Q_{\max}/2$ bzw. $\Delta R/2$ ist. s repräsentiert die Steigung der Boltzmann-Funktion (mV, siehe Kapitel 2.7.2 und 2.7.5, Seiten 36 und 38). n ist die Anzahl der durchgeführten Experimente und q_g die Anzahl der beteiligten Ladungen (e_0). *Gating*-Ströme für die caged-compounds sowie pH-Fluorimetrie für die R803Q und R399A Mutanten sind nicht erfasst (n.e.). Die Werte sind als Mittelwert (\pm SD) angegeben.

3. Ergebnisse

3.9 *Sp*SLC9C1 ist für den Na⁺/H⁺-Austausch in Spermien verantwortlich

*Sp*SLC9C1 konnte im heterologen System (CHO-Zellen) exprimiert und funktionell charakterisiert werden. Als nächstes soll geprüft werden, ob *Sp*SLC9C1 im chemotaktischen Signalweg von *S. purpuratus*-Spermien aktiv ist.

Dazu wurde zuerst die Expression von SLC9C1 in Spermien aus *S. purpuratus* untersucht. Zu diesem Zweck wurden zwei polyklonale Antikörper gegen den Austauscher generiert (α -SU1 und α -SU2, siehe Kapitel 2.4.3). Im Western Blot von Flagellen- und Kopf-Präparaten der Spermien erkannten beide Antikörper drei *Sp*SLC9C1-Banden mit einer M_w von 132 kDa, 137 kDa und 146 kDa (Abbildung 3-26). Abbildung 3-26a zeigt einen repräsentativen Blot mit dem α SU2-Antikörper zusammen mit einem Blot von CHO-*Sp*SLC9C1-Zellen (siehe Abbildung 3-6a, schwarzer Pfeil). Die Banden stimmen mit dem berechneten M_w von 146,5 kDa überein. Zwei weitere Banden sind auf der Höhe von circa 300 kDa und 600 kDa sichtbar (Abbildung 3-26a, graue Pfeile). Es könnte sich um Dimere bzw. Tetramere handeln.

In der Immunhistochemie erkannten beide Antikörper das Flagellum der Spermien (Abbildung 3-26b). Auch der Kopf wurde von beiden Antikörpern erkannt. Berichte über unspezifische Bindung von Antikörpern im Kopf von Spermien machen eine Interpretation allerdings schwierig (Sardoy *et al.*, 2012). Die Negativkontrolle mit dem Präimmunserum zeigt kein Signal (Abbildung 3-26b, rechte Spalte). Diese Ergebnisse bestätigen die Expression von *Sp*SLC9C1 in Spermien von *S. purpuratus*.

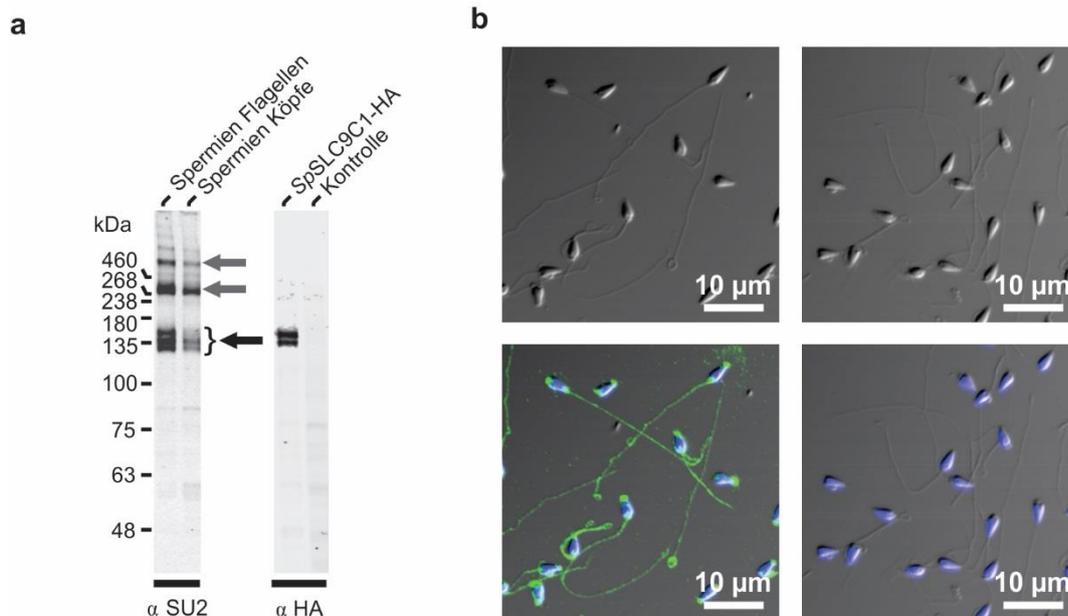


Abbildung 3-26: Western Blot- und immunhistologische Analyse von Seeigelspermien: a) In einem repräsentativen Blot erkennt der polyklonale α SU2-Antikörper 3 Banden mit einer M_w von 132 kDa, 137 kDa und 146 kDa sowohl in Flagellen als auch in Kopf-Präparationen von *S. purpuratus*-Spermien. Diese stimmen mit zwei *SpSLC9C1*-Banden (HA-markiert) aus CHO-*SpSLC9C1*-Zellen (Siehe Kapitel 3.2) überein. b) Immunhistologische Untersuchung von Spermien mit dem α -SU2-Antikörper (links) und dem Präimmunserum (rechts). Die obere Reihe zeigt Durchlichtaufnahmen mit Differentiell-Interferenz-Kontrast (DIC). In der unteren Reihe sind diese mit Fluoreszenzaufnahmen (*SpSLC9C1*: grün, Zellkern: blau) übereinandergelegt. Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

Zunächst sollte untersucht werden, wie sich die Membranspannung in *S. purpuratus*-Spermien bei Stimulation mit dem Lockstoff Speract verhält. Dazu wurden Spermien mit dem spannungssensitiven Farbstoff Di-8-ANEPPS beladen und im kalibrierten System gemessen (siehe Kapitel 2.2.2). Stimuliert wurde mit aufsteigenden Speract-Konzentrationen (5, 50, 500 pM, und 5 nM, Abbildung 3-27). Die Spermien zeigen eine dosisabhängige Änderung von V_m durch CNGK- (Hyperpolarisation, Bönigk *et al.*, 2009), SpIH- und CatSper-Kanäle (Depolarisation, Gauss *et al.*, 1998; Seifert *et al.*, 2014). Die Dosisabhängigkeit macht sich dabei in Amplitude und Latenz bemerkbar. Je stärker die Stimulation, desto stärker und schneller die Änderung in V_m (Abbildung 3-27a). Bei der höchsten Stimulation (5 nM Speract) hyperpolarisieren die Spermien auf bis zu $-92,7$ mV. Die Kalibrierung der Spannungsmessungen ergab ein Ruhemembranpotential (V_{rest}) von $-57,0 \pm 6,3$ mV (Abbildung 3-27b, $n = 3$).

3. Ergebnisse

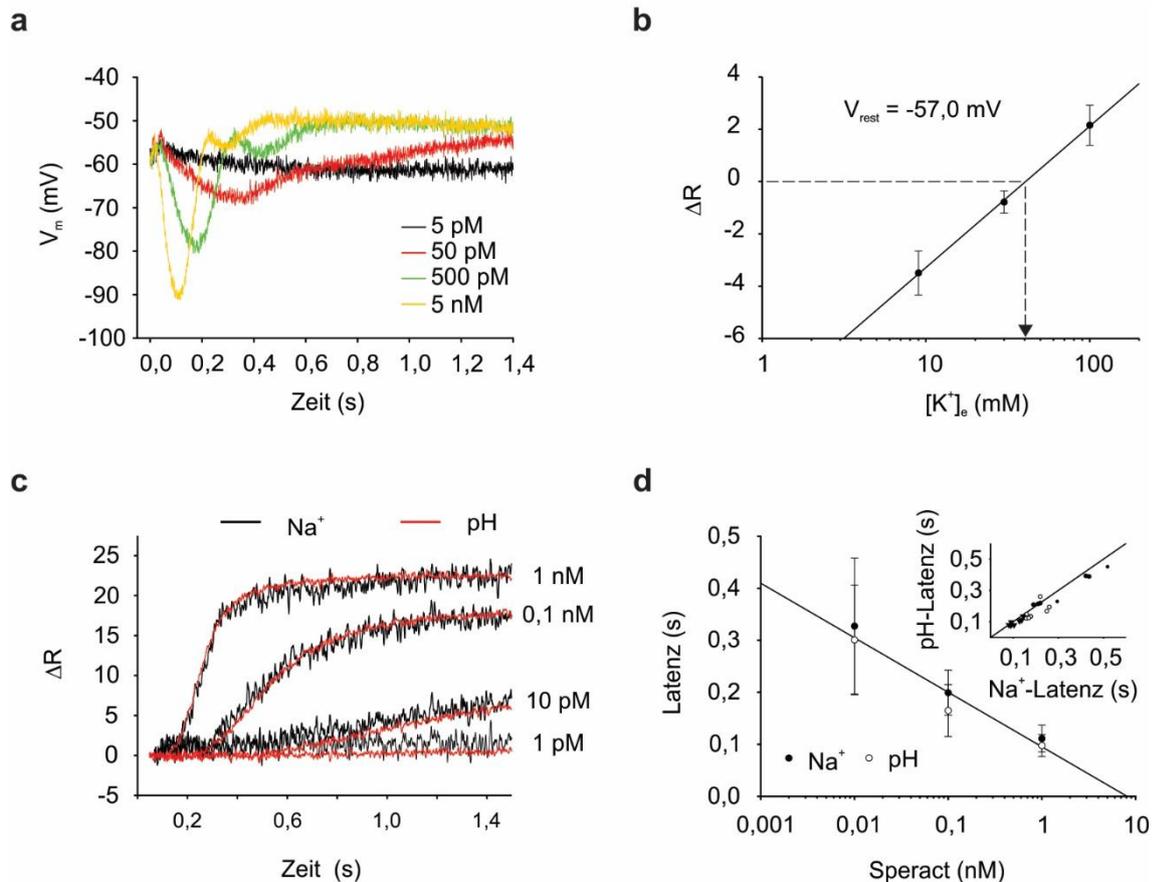


Abbildung 3-27: Ein elektroneutraler Na⁺/H⁺-Austausch folgt der Hyperpolarisation in *S. purpuratus*:
a) Dargestellt sind Speract-induzierte Spannungssignale in *S. purpuratus* Spermien, gemessen im kalibrierten System mit dem spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff Di-8-ANEPPS über die Zeit. Steigende Speract-Konzentrationen zur Stimulation der Spermien erhöhen Amplitude und verringern Latenz der transienten Hyperpolarisation (5 pM: schwarz, 50 pM: rot, 500 pM: grün und 5 nM: gelb). b) Über drei Kalibrierungslösungen (9 mM, 30 mM, 100 mM K⁺) bei 10 nM-Speract-Stimulation konnte das Ruhemembranpotential (V_{rest}) von $-57,0 \pm 6,3$ mV errechnet werden ($n = 3$, siehe Kapitel 2.2.2). c) Speract-induzierte Änderungen im relativen Fluoreszenzverhältnis (ΔR) zeigen einen Na⁺-Einstrom (schwarz) und H⁺-Ausstrom (rot). Die Signale wurden skaliert und übereinandergelegt. Stimuliert wurde mit 1 pM, 10 pM, 0,1 nM und 1 nM Speract. d) Mittelwerte (\pm SD) der Latenzen von Na⁺- (schwarze Kreise) und H⁺-Signalen (offene Kreise) logarithmisch gegen die Speract-Konzentration aufgetragen ($n = 7$). Das *inset* zeigt die Korrelation der Latenzen zwischen den Na⁺- und H⁺-Signalen (1 nM: schwarze Dreiecke, 100 pM: offene Kreise, 10 pM: schwarze Kreise). Abbildung modifiziert nach Windler *et al.*, 2018.

Nun wurden Spermien mit einem Na⁺- und einem H⁺-sensitiven Farbstoff beladen und mit aufsteigenden Speract-Konzentrationen stimuliert (1, 10, 100 pM und 1 nM, Abbildung 3-27c). Eine Zunahme der Fluoreszenz entspricht dabei einer Zunahme in $[Na^+]_i$ und pH_i . Beide Signale wurden übereinandergelegt und zeigten eine ähnliche Kinetik (Abbildung 3-27c). Die

Latenz bis zum Na^+ -Einstrom und H^+ -Ausstrom wurde aus sieben Messungen bestimmt und gegen den Logarithmus der Speract-Konzentration aufgetragen (Na^+ : schwarze Kreise, H^+ : offene Kreise, Abbildung 3-27d). Die Abnahme der Latenz war umgekehrt proportional zur Speract-Konzentration. Das *inset* zeigt die Korrelation der Latenzzeiten zwischen den einzelnen Na^+ - und H^+ -Messungen (1 nM: schwarze Dreiecke, 100 pM: offene Kreise, 10 pM: schwarze Kreise, $x = y$). Die Ergebnisse deuten an, dass der Na^+ -Einstrom und der H^+ -Ausstrom kinetisch gekoppelt sind. Die Alkalisierung im Signalweg der Seeigel-Chemotaxis kann so einem N^+/H^+ -Austauschmechanismus zugeordnet werden.

4. Diskussion

Ionentransporter (*solute carriers*, SLC) spielen eine essentielle Rolle bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse. Sie bilden mit 456 Mitgliedern (aufgeteilt auf 52 Unterfamilien), hinter G-Protein-gekoppelten Rezeptoren die zweitgrößte Familie von membranständigen Proteinen (Höglund *et al.*, 2011; Hediger *et al.*, 2013). César-Razquin und Kollegen deuten 2015 mit einem Artikel im Wissenschaftsmagazin *Cell* darauf hin, dass unser Verständnis über diese Transporter nicht im Verhältnis zu ihrer Menge und Relevanz steht.

“SLCs show by far the greatest publication asymmetry of all gene families, i.e., the most uneven distribution of papers over the group members. (...) As for the bottom-ranked 15% of SLC family members, there are more publications in a PubMed search for ‘star wars’ (72 citations) than on these 70 SLCs combined.” (César-Razquin *et al.*, 2015)

Die SLC9-Familie der Ionentransporter beinhaltet die Na⁺/H⁺-Austauscher SLC9A1-9, SLC9B1-2 und SLC9C1-2 (Donowitz, Tse & Fuster, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass SLC9C1 ein funktioneller Na⁺/H⁺-Austauscher ist.

4.1 Frankensteins Molekül

Sequenzanalysen von SLC9C1 ergaben eine für Na⁺/H⁺-Austauscher einmalige Beschaffenheit: das Protein besitzt am C-Terminus Homologie zu einem Spannungssensor sowie zu einer Bindestelle für zyklische Nukleotide (Wang *et al.*, 2003). Spannungssensordomänen sind bis auf eine Ausnahme (*CiVSP*, Murata *et al.*, 2005) ausschließlich in spannungsgesteuerten Ionenkanälen beschrieben worden (Bezanilla, 2008). Bindestellen für zyklische Nukleotide regulieren die Aktivität einer größeren Bandbreite von Proteinen (Shabb & Corbin, 1992). Mary Shelley beschreibt in ihrem Roman „Frankenstein“ die Erschaffung eines Wesens aus Körperteilen von unterschiedlichen Menschen (Shelley, 1818). Bei der Betrachtung von SLC9C1 gewinnt man den Eindruck, als ob die Evolution in Anlehnung an die Romanfigur Viktor Frankenstein gewirkt hat. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass *Sp*SLC9C1 ein funktioneller Na⁺/H⁺-Austauscher ist, der durch Hyperpolarisation über eine VSD aktiviert werden kann. Zyklisches AMP moduliert diesen spannungsabhängigen Regulationsmechanismus durch Bindung an die CNBD. Im ersten Teil

der Diskussion möchte ich auf die Struktur von *SpSLC9C1* eingehen. Der zweite Teil diskutiert *SpSLC9C1* im physiologischen Kontext.

4.1.1 Die Austauscherdomäne

Strukturbiologen konnten bislang die Struktur von vier verschiedenen Na^+/H^+ -Austauschern aufklären: die des *E. coli* NhaA (*EcNhaA*, Hunte *et al.*, 2005), des *T. thermophilus* NapA (*TtNapA*, Lee *et al.*, 2013, beide werden der CPA2-Familie zugeordnet), sowie der Austauscher aus den Archaeen *M. jannaschii* (*MjNhaP1*, Paulino *et al.*, 2014) und *P. abyssi* (*PaNhaP*, Wöhlert *et al.*, 2014, beide gehören zur CPA1-Familie). Alle diese Na^+/H^+ -Austauscher liegen als Dimer vor, wobei jedes Protomer eine funktionelle Einheit bildet. *EcNhaA* besitzt 12 TMDs (I-XII), N- und C-Terminus liegen dabei intrazellulär (Abbildung 3-1a, oben). *TtNapA*, *MjNhaP1* und *PaNhaP* besitzen jeweils 13 TMDs (I-XIII), der N-Terminus liegt extrazellulär (Abbildung 3-1a, *MjNhaP1*). Na^+/H^+ -Austauscher besitzen einen charakteristischen Aufbau, der als *NhaA-fold* bezeichnet wird (Shi, 2013). Das Protomer besteht aus einem 6-Helix Bündel (6-HB) und einer Dimer-Kontaktfläche (dem *Dimer-Interface*). Das 6-HB in *EcNhaA* ist aus TMD III-V und X-XII aufgebaut (Hunte *et al.*, 2005). Bei *TtNapA*, *MjNhaP1* und *PaNhaP* bilden TMD IV-VI und XI-XIII das 6-HB (Lee *et al.*, 2013; Paulino *et al.*, 2014; Wöhlert, Kühlbrandt & Yildiz, 2014). Die übrigen TMDs bilden das *Dimer-Interface*.

Alle bisher bekannten sekundär-aktiven Transporter besitzen zwei gemeinsame strukturelle Merkmale: diskontinuierliche Helices und sogenannte *inverted repeats* (IRs, Shi 2013). Bei ersteren handelt es sich um TMDs, welche die Membran durchspannen, aber in ihrer α -helikalen Struktur unterbrochen sind. In *EcNhaA* sind dies TMD IV und XI, bei *TtNapA*, *MjNhaP1* und *PaNhaP* TMD V und XII. IRs sind strukturell ähnlich aufgebaute Abschnitte im Protein, die topologisch invertiert zueinander liegen. Dabei besteht oft nur eine geringe Sequenzähnlichkeit zwischen den IRs. *EcNhaA* besitzt zwei IRs: die TMDs III-V sowie I + II liegen jeweils topologisch ähnlich aber invertiert zu TMD X-XII und VIII + IX. Die dazwischenliegenden TMDs VI und VII verbinden die beiden IRs. *TtNapA*, *MjNhaP1* und *PaNhaP* besitzen je einen IR; TMD I-V sind IRs zu VII-XII (*TtNapA*), TMD I-VI sind IRs zu VIII-XIII (*MjNhaP1* und *PaNhaP*).

Was sagt uns das über die Struktur von *SpSLC9C1*? Im Gegensatz zu *EcNhaA* und *MjNhaP1* besitzt die Austauscherdomäne von *SpSLC9C1* 14 TMDs (Abbildung 3-2). Sowohl die trigonal-bipyramidale Bindestelle als auch das charakteristische Asn/Asp-Motiv aus dem

4. Diskussion

CPA1- Na^+/H^+ -Austauscher *MjNhaP1* (und *PaNhaP*) sind in *SpSLC9C1* konserviert (Abbildung 3-1b). Die Aminosäuren der Bindestelle liegen in den vorausgesagten TMDs VI (Thr208, Asp209) und VII (Glu231, Ser234, Asp238, Abbildung 3-1a und b, Abbildung 3-2, gelbe Markierung). Die Position der Bindestelle zusammen mit der zusätzlichen TMD am N-Terminus lassen den Schluss zu, dass die vorausgesagten TMDs VI und XIII in *SpSLC9C1* (statt V und XII in *TtNapA*, *MjNhaP1* und *PaNhaP*) diskontinuierliche Helices bilden. Sowohl N- als auch C-Terminus der NHE-Domäne würden intrazellulär liegen (Abbildung 3-1a, unten).

Der Transportmechanismus von sekundär-aktiven Transportern lässt sich durch das *alternating-access*-Modell beschreiben (Jardetzky, 1966). Dabei liegt das Protein in mindestens zwei verschiedenen Konformationen vor, einem nach innen und einem nach außen geöffneten Zustand. Die Region um die Bindestelle (TMD IV+XI in *EcNhaA*, TMD V+XII in *TtNapA*, *MjNhaP1* und *PaNhaP*) hat im Wechsel zwischen diesen beiden Konformationen jeweils Zugang zum intra- und extrazellulären Milieu (Hunte *et al.*, 2005; Rimon, Kozachkov-Magrisso & Padan, 2012; Lee *et al.*, 2013; Paulino & Kühlbrandt, 2014; Wöhlert, Kühlbrandt & Yildiz, 2014). *MjNhaP1* ist der einzige Na^+/H^+ -Austauscher, der sowohl im nach innen- als auch im nach außen geöffneten Zustand strukturell aufgeklärt werden konnte (Paulino *et al.*, 2014). Es wird vermutet, dass ein Na^+ -Ion das Proton aus der Bindestelle verdrängt und den Übergang vom nach außen- in den nach innen geöffneten Zustand ermöglicht (Forrest & Rudnick, 2009). Unterschiede in der Anordnung der TMDs zwischen den beiden Konformationen zeigen die mobilen Segmente im Transportzyklus. Die größten Unterschiede wurden in der Region um die Bindestelle beobachtet (TMD V, VI und XII). Im Gegensatz zum nach außen geöffneten Zustand verschiebt sich diese Region um 5 Å diagonal zur Membranebene und öffnet einen Zugang zum Zytoplasma (Paulino *et al.*, 2014). Ein Austausch der Ionen an der Bindestelle begünstigt den nach außen geöffneten Zustand wieder und startet den Zyklus von vorne. Die konservierten Aminosäuren der Substratbindestelle von *SpSLC9C1* liegen in den vorausgesagten TMDs VI und VII. Die Position der Bindestelle und der konservierten Aminosäuren lässt den Schluss zu, dass die TMDs VI, VII und XIII das mobile Segment in *SpSLC9C1* bilden. Strukturelle Messverfahren wie Röntgenkristallographie und Kryoelektronenmikroskopie könnten die Existenz und Position des 6-HB, des Dimer-*Interface* und der IRs in der NHE-Domäne von *SpSLC9C1* darstellen.

4.1.2 Der Spannungssensor

Spannungsänderungen können von membranständigen Proteinen registriert und in Konformationsänderungen umgesetzt werden. Bezanilla diskutiert 2008 verschiedene Möglichkeiten, die es Membranproteinen ermöglicht, Spannungsänderungen wahrzunehmen (Bezanilla, 2008). Geladene Aminosäuren wie Asp, Glu, Arg, Lys und His können sich im elektrischen Feld umlagern und so die Protein-Konformation beeinflussen. Dieser Mechanismus wurde in spannungsgesteuerten Ionenkanälen beschrieben und bildet das Grundprinzip von VSDs (Armstrong & Bezanilla 1974; Neumann 1978). Auch Aminosäuren mit einem permanenten Dipolmoment wie Tyr können sich im elektrischen Feld umorientieren und ein Protein spannungssensitiv machen (Vasanthi & Krishnaswamy, 2002). Eine weitere Möglichkeit sind Ionen, die an das Protein gebunden sind und sich bei V_m -Änderungen neu ausrichten (beschrieben in Na^+/K^+ -ATPasen, Nakao & Gadsby 1986; Holmgren *et al.*, 2000) oder eine Blockierung aufheben (NMDA-Rezeptoren, Nowak *et al.*, 1984; Mayer *et al.*, 1984).

Spannungssensordomänen sind am besten in spannungsgesteuerten Ionenkanälen untersucht worden, die viele physiologische Prozesse wie das Aktionspotential in Nervenzellen (Purves, Augustine & Fitzpatrick, 2001), die Herzfrequenz (Grant, 2009) oder die Reizwahrnehmung in Sinneszellen (Kaupp & Seifert, 2002; Craven & Zagotta, 2006) steuern. Auch bei der chemotaktischen Navigation von Seeigelspermien sind spannungsgesteuerte Ionenkanäle (HCN- und CatSper-Kanäle) beteiligt (Wachten, Jikeli & Kaupp, 2017). Diese Kanäle bilden eine große Familie, deren Mitglieder alle einen sehr ähnlichen Aufbau besitzen: sie setzen sich aus vier Untereinheiten zusammen (K^+ -Kanäle, Long *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 2013) oder sind aus einem Polypeptid mit vier homologen Domänen aufgebaut (*repeats*, eukaryotische Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle, Shen *et al.*, 2017; Lee & MacKinnon 2017; Li *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2015). Jede Untereinheiten bzw. jeder *repeat* besitzt sechs TMDs (S1-6) und eine Porenregion zwischen S5 und S6 (Abbildung 3-3a, Porenmotiv). Die Poren motive der vier Untereinheiten/*repeats* ordnen sich so an, dass sich eine zentrale Pore bildet, während die jeweiligen Spannungssensordomänen außen angeordnet sind. Der Spannungssensor besteht aus den vier TMDs S1-4 (Abbildung 3-3, rot). In den namensgebenden S4-Segmenten sind positiv geladene Aminosäuren regelmäßig angeordnet, meist Arg, jeweils unterbrochen von zwei meist hydrophoben Aminosäuren. Eine V_m -Änderung richtet die geladenen Aminosäuren in der VSD neu aus und ändert über Konformationsänderungen die Offenwahrscheinlichkeit P_o . Die S4-Ladungen haben spannungsabhängig entweder Zugang zur extra- oder intrazellulären Seite der Membran (Chanda *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2007). Die Bewegung der

4. Diskussion

Ladungen über die Membran ist als *Gating*-Strom messbar (Armstrong & Bezanilla, 1974). In verschiedenen Ionenkanälen werden unterschiedlich viele Ladungen q_g über die Membran verschoben: 12-13 e_0 (K^+ -Kanäle, 3-4 e_0 pro Untereinheit, Bezanilla 2000), 12 e_0 (Na^+ -Kanäle, 3 e_0 pro *repeat*, Hirschberg *et al.*, 1995) und 9 e_0 (Ca^{2+} -Kanäle, 2-3 e_0 pro Untereinheit, Noceti *et al.*, 1996).

SpSLC9C1 wird durch eine VSD mit sieben positiv geladenen Aminosäuren in der S4-TMD reguliert. Hierbei werden 3 e_0 über die Membran transferiert. Ein Arg im vierten TMD der VSD (R803) trägt dabei eine volle Ladung e_0 zu diesem Prozess bei. In dieser Hinsicht ist die Bewegung der *SpSLC9C1*-VSD der von depolarisationsaktivierten K^+ -Kanälen wie dem *Shaker*-Kanal sehr ähnlich. Allerdings ist die funktionelle Kopplung eine andere; *SpSLC9C1* wird durch Hyperpolarisation aktiviert. Wie die Bewegung der VSD an die Austauschdomäne vermittelt wird, ist noch völlig unklar. Auch die Oligomerisierung von *SpSLC9C1* ist noch nicht geklärt. Klassische Na^+/H^+ -Austauscher liegen als Dimer vor (Hunte *et al.*, 2005; Furrer *et al.*, 2007; Paulino *et al.*, 2014; Wöhlert, Kühlbrandt & Yildiz, 2014). Was wissen wir über die Quartärstruktur von *SpSLC9C1*? Zurzeit gibt es nur sehr vorläufige Informationen, beispielsweise läuft *SpSLC9C1* im Westernblot von Seeigelspermien auf der erwarteten Höhe eines Monomers (146 kDa, Abbildung 3-26a), es sind aber auch zwei zusätzliche Banden bei circa 300 und bei 600 kDa zu erkennen. Sie weisen darauf hin, dass *SpSLC9C1* vielleicht Dimere oder Tetramere bildet. Wenn *SpSLC9C1* oligomerisiert, ist die Frage nach der funktionellen Bedeutung wichtig. Zumeist beobachtet man bei Oligomeren eine erhöhte strukturelle Integrität, die aber nicht unbedingt funktionelle Konsequenzen haben muss (Last & Miller 2015; Goswami *et al.*, 2011). Andererseits hat Oligomerisierung in vielen Proteinen auch Kooperativität zwischen Untereinheiten zufolge (Monod, Changeux & Jacob, 1963; Changeux, 2012; Cornish-Bowden, 2014). So stellen zwar in klassischen Na^+/H^+ -Austauschern, die zu Dimeren angeordnet sind, die einzelnen Protomere jeweils funktionelle Einheiten dar (Hunte *et al.*, 2005; Furrer *et al.*, 2007; Paulino *et al.*, 2014; Wöhlert, Kühlbrandt & Yildiz, 2014), allerdings gibt es hier Hinweise auf Kooperativität (Fuster *et al.*, 2008 Otsu *et al.*, 1989; Green *et al.*, 1988). Hinweise auf die Quartärstruktur von *SpSLC9C1* könnte die Spannungsabhängigkeit der *Gating*-Ströme und die der Na^+/H^+ -Austauschaktivität liefern.

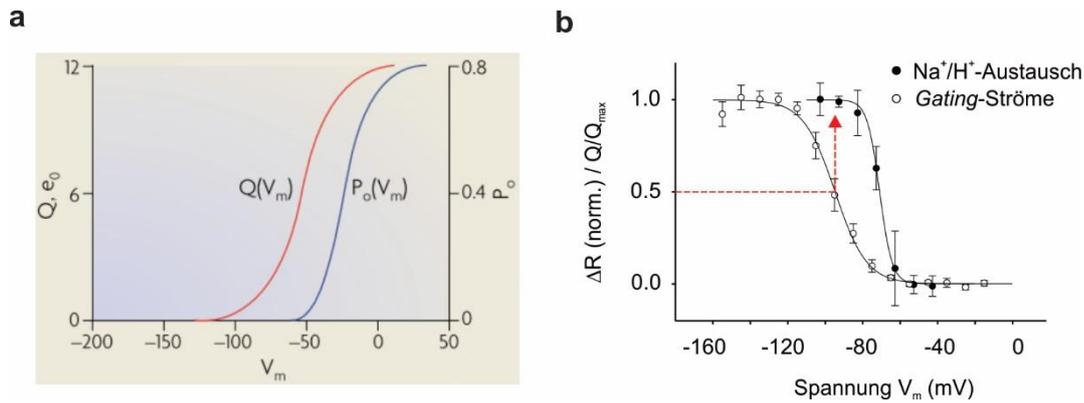


Abbildung 4-1: Gating-Ströme und Offenwahrscheinlichkeit/ Na^+/H^+ -Austauschaktivität: a) Vergleich der Spannungsabhängigkeit von *Gating*-Strömen und Offenwahrscheinlichkeit vom depolarisationsaktivierten *Shaker-K⁺*-Kanal. Aufgetragen sind die Spannung (V_m) gegen jeweils die Anzahl der verschobenen Ladungen der *Gating*-Ströme (Q , e_0 , rot, 12 pro Tetramer) und die Offenwahrscheinlichkeit (P_o) des Kanals. Abbildung aus Bezanilla 2008. b) Spannungsabhängigkeit der *Gating*-Ströme und der Austauschaktivität von *SpSLC9C1* (WT). Aufgetragen ist jeweils die Spannung (V_m) gegen die normalisierten Ladungen Q/Q_{max} der *Gating*-Ströme (weiße Kreise) und gegen die normalisierte Austauschaktivität ΔR in der pH-Fluorimetrie (schwarze Punkte). Am $V_{1/2}$ -Wert der *Gating*-Ströme ($-94,7 \pm 2,9$ mV) erreicht die Austauschaktivität ihr Maximum.

Bei spannungsgesteuerten Ionenkanälen bilden vier Untereinheiten (bzw. *repeats*) eine zentrale Pore. Die Öffnung der Pore ist ein hochkooperativer Prozess, zu dem die VSDs aller vier Untereinheiten beitragen (Hodgkin & Huxley, 1952; Hille, 1978; Llano, Webb & Bezanilla, 1988; Bezanilla, 2000). Diesem Modell zufolge ist P_o abhängig von der Anzahl der aktivierten VSDs. Stellt man die Spannungsabhängigkeit der *Gating*-Ströme (Q/V_m , Abbildung 4-1a, rot) der Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit (P_o/V_m , blau) gegenüber, so liegt der $V_{1/2}$ -Wert der *Gating*-Ströme bei negativeren Werten als der $V_{1/2}$ -Wert der Offenwahrscheinlichkeit P_o . Tatsächlich sind schon die Hälfte der *Gating*-Ladungen verschoben, bevor sich die Offenwahrscheinlichkeit überhaupt ändert. Die Offenwahrscheinlichkeit P_o steigt dann aber steil und kooperativ an (blau). Aus dem Verlauf kann man modellhaft ableiten, dass der Kanal nur dann signifikant öffnet, wenn alle vier VSDs ihre Konformation geändert haben (Bezanilla, Perozo & Stefani, 1994; Bezanilla, 2008).

Ein ähnliches Verhalten beobachtet man bei der Gegenüberstellung der *Gating*-Ströme und Na^+/H^+ -Austauschaktivität von *SpSLC9C1*. Im Gegensatz zum depolarisationsaktivierten *Shaker-K⁺*-Kanal wird *SpSLC9C1* durch Hyperpolarisation aktiviert. Der $V_{1/2}$ -Wert der Austauschaktivität liegt im Vergleich zum $V_{1/2}$ -Wert der *Gating*-Ströme weniger negativ (Abbildung 4-1b). Die maximale Austauschaktivität erreicht *SpSLC9C1* schon bei

4. Diskussion

Membranspannungen, die im Bereich des $V_{1/2}$ -Wertes der *Gating*-Ströme liegen (Abbildung 4-1b, roter Pfeil). Zwei Mechanismen könnten dieses Verhalten erklären. Es ist möglich, dass bereits ein Teil der vollen VSD-Bewegung ausreicht, um die zugehörige NHE-Domäne zu aktivieren. Alternativ könnte auch *SpSLC9C1* kooperativ aktiviert werden; je nach Oligomerisierungszustand könnte es sein, dass nicht jede VSD im Oligomer aktiviert sein muss, um den vollen Na^+/H^+ -Austausch im gesamten Proteinkomplex zu starten. Weitere Experimente sind nötig um die Quartärstruktur von *SpSLC9C1* und ihre funktionelle Bedeutung zu untersuchen.

4.1.3 Die Bindestelle für zyklische Nukleotide

CNBDs regulieren eine Vielzahl von Prozessen und sind sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten beschrieben: dem cAMP-Rezeptor Protein (CRP, auch *catabolite activator protein*, CAP genannt), (McKay & Steitz 1981), der Protein Kinase A (PKA), beide aktiviert durch cAMP (Cook, Lipkin & Markham, 1957; Rall, Berthet & Sutherland, 1957; Sutherland & Rall, 1957; Lipkin, Cook & Markham, 1959; Walsh, Perkins & Krebs, 1968; Lincoln, Dey & Sellak, 2001; Potter, 2011; Yan *et al.*, 2016), der Protein Kinase G (PKG), aktiviert durch cGMP (Takio *et al.*, 1984; Vaandrager & de Jonge, 1996), den zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen, aktiviert durch cAMP oder cGMP (Kaupp & Seifert, 2001, 2002; Craven & Zagotta, 2006; DiFrancesco, 1986, 1991; DiFrancesco *et al.*, 1986; Accili, Redaelli & DiFrancesco, 1997) und den Guanin-Austauschfaktoren Epac, aktiviert durch cAMP (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998; Bos, 2003; Seino & Shibasaki, 2005). Zyklisch Nukleotid-sensitive Ionenkanäle bilden eine eigene Unterfamilie in der großen Familie der spannungsabhängigen Ionenkanäle. Zu ihnen gehören HCN- (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated*-, Craven & Zagotta 2006), CNG- (*cyclic nucleotide gated*, Kaupp & Seifert 2002), EAG- und hERG-Kanäle (*ether-a-gogo* und *human eag-related gene*, Gustina & Trudeau 2012) sowie diverse K^+ -Kanäle aus dem Pflanzenreich (KaT-, AKT- und CNGC-Kanäle, (Anderson *et al.*, 1992; Seifert *et al.*, 1999; Männikkö, Elinder & Larsson, 2002; Latorre *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2005; Schachtman *et al.*, 1992; Schachtmann 2000).

Sowohl pro- als auch eukaryotische CNBDs sind ähnlich aufgebaut (McKay & Steitz, 1981; Aiba, Fujimoto & Ozaki, 1982; Takio *et al.*, 1982, 1984; Cossart & Gicquel-Sanzey, 1982; Titani *et al.*, 1984; Su *et al.*, 1995; Diller *et al.*, 2001; Rehmann, Rueppel, *et al.*, 2003; Zagotta *et al.*, 2003; Clayton *et al.*, 2004, 2008; Kim, Xuong & Taylor, 2005; Rehmann *et al.*, 2006;

Schünke *et al.*, 2011; Kesters *et al.*, 2015; James *et al.*, 2017; Lee & MacKinnon, 2017; Li *et al.*, 2017). Vom N-Terminus ausgehend setzen sich CNBDs aus einer α -Helix (αA), acht β -Faltblättern ($\beta 1-8$) und zwei weiteren α -Helices (αB und αC) zusammen. Die Helices αB und αC sind über ein sogenanntes „Scharnier“ (*hinge*, Tyr/Pro-Motiv, Abbildung 4-2c) miteinander verbunden und werden oft als „Deckel“ (*lid*) bezeichnet. Eine kurze Helix zwischen $\beta 6$ und 7 (P-Helix) bildet zusammen mit einem konservierten Arginin die Phosphatbindekassette (*phosphate-binding cassette*, PBC). Die β -Faltblätter bilden zusammen mit der PBC eine Tasche, in der das cNMP gebunden werden kann. Die Abbildung 4-2a und b zeigen die Struktur der CNBD aus *MmHCN2* und die Interaktionen von Aminosäuren mit dem cNMP (Cukkemane, Seifert & Kaupp, 2011). Val564 und Leu574 in $\beta 4$ und 5 interagieren über hydrophobe Wechselwirkung mit dem Purin. Das Gly/Glu-Motiv in $\beta 6$ (Gly581 & Glu582) bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit der Ribose während Arg591 in der PBC elektrostatisch an das Phosphat bindet (Rehmann, Prakash, *et al.*, 2003; Zagotta *et al.*, 2003; Harzheim *et al.*, 2008). Nach cNMP-Bindung „klappt“ der Deckel um und legt sich über das cNMP der Bindestelle (Rehmann, Prakash, *et al.*, 2003; Rehmann, Rueppel, *et al.*, 2003; Rehmann, Schwede, *et al.*, 2003; Berman *et al.*, 2005). Die Übertragung dieser Bewegung auf die αA -Helix und weiter auf die katalytische Domäne bzw. Pore am N-Terminus der CNBD ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

Beim Blick auf die Sequenz von *SpSLC9C1* zeigt sich eine bona fide CNBD am C-Terminus. Bindung von cAMP moduliert die Spannungsabhängigkeit sowohl von der Na^+/H^+ -Austauschaktivität als auch von den *Gating*-Strömen. Zyklisches GMP zeigte keinen Einfluss. Es stellt sich die Frage, ob wir die Selektivität der *SpSLC9C1*-CNBD für cAMP anhand der Sequenz erklären können. Anschließend soll untersucht werden, wie sich die Bindung von cAMP auf die Austauschdomäne oder die VSD von *SpSLC9C1* übertragen könnte (Kapitel 4.1.4). Abbildung 4-2c zeigt einen Sequenzvergleich der CNBD aus *SpSLC9C1* mit der aus *MmHCN2*, der bovinen PKA (*bPKA1*), SpIH (alle cAMP sensitiv), dem bovinen CNGA1 (*bCNGA1*), dem *A. punctulata* CNGK (*ApCNGK*, dritte CNBD), der bovinen PKG (*bPKG1*), und dem *C. elegans* CNG-Kanal TAX4 (*CeTAX4*, alle cGMP sensitiv). Altenhofen und Weber haben die Hypothese aufgestellt, dass die Selektivität von CNBDs durch die Aminosäure C-terminal vom phosphatbindenden Arg in der PBC vermittelt wird (Weber, Shabb & Corbins, 1989; Altenhofen *et al.*, 1991). In der cGMP-spezifischen PKG (Takio *et al.*, 1984; Vaandrager & de Jonge, 1996) und den cGMP-spezifischen CNG-Kanälen aus Photorezeptoren (Kaupp *et al.*, 1989; Bönigk *et al.*, 1993) befindet sich dort ein

4. Diskussion

Threoninrest. Er bindet über eine Wasserstoffbrücke spezifisch an die Guanosin-Base von cGMP (Altenhofen *et al.*, 1991). Demgegenüber hat die cAMP-gesteuerte PKA an dieser Stelle einen Alaninrest (Takio *et al.*, 1982; Titani *et al.*, 1984). Der für cAMP hochspezifische SpIH-Kanal aus *S. purpuratus* Spermien trägt an dieser Stelle ein Val (Gauss *et al.*, 1998). Man könnte also schließen, dass eine unpolare Aminosäure an dieser Stelle die CNBD cAMP-spezifisch macht. Sowohl SpSLC9C1 als auch MmHCN2 haben an der entsprechenden Position eine polare Aminosäure (Asn1054 in SpSLC9C1, Thr592 in MmHCN2, Abbildung 4-2b und c, roter Pfeil), werden aber besser durch cAMP als durch cGMP aktiviert (Stevens *et al.*, 2001; Zagotta *et al.*, 2003). Die SpSLC9C1-CNBD gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass anhand der Polarität der Aminosäure C-terminal des Argininrests in der PBC kein Rückschluss auf die Selektivität der CNBD gemacht werden kann.

Auch Teile der α C-Helix könnten die Selektivität für ein zyklisches Nukleotid vermitteln (Abbildung 4-2, schwarzer und grauer Pfeil, Varnum *et al.*, 1995; Sunderman & Zagotta 1999). So findet man bei CNG-Kanälen in der α C-Helix einen spezifischen Aspartatrest, der über eine elektrostatische Wechselwirkung die Bindung von cAMP „verdirbt“ und so indirekt cGMP-Spezifität erzeugt (Asp604 in bCNGA1 und Asp620 in CeTAX4, Abbildung 4-2c, grauer Pfeil). Eine hydrophobe Aminosäure an dieser Position führt zu Kanälen, die cAMP bevorzugen (Varnum, Black & Zagotta, 1995; Peng, Rich & Varnum, 2004). Zagotta diskutiert im Zusammenhang mit der 2003 aufgeklärten CNBD-Struktur aus HCN2, dass ein Arg in der α C-Helix mit der Adenosin-Base von cAMP interagiert (Arg632 in MmHCN2, Abbildung 4-2b & c, schwarzer Pfeil, Zagotta *et al.*, 2003; Craven & Zagotta 2006). SpSLC9C1 besitzt sowohl den Arg-Rest (Arg1097), als auch eine hydrophobe Aminosäure (Pro1101) in der α C-Helix. Allerdings ist, wie in der PBC, eine Vorhersage der Ligandenspezifität anhand dieser Aminosäuren auch hier schwierig. Die funktionelle Bindestelle des CNGK-Kanals aus *A. punctulata* (Bönigk *et al.*, 2009) besitzt an dieser Stelle ebenfalls ein Arg, bevorzugt aber cGMP. Das Arg sorgt im CNGK- und im MmHCN2-Kanal für einen deutlichen Anstieg der Ligandenaffinität (Zagotta *et al.*, 2003; Bönigk *et al.*, 2009). Zusammenfassend zeigt die SpSLC9C1-CNBD, dass eine Vorhersage der Ligandenselektivität von CNBDs anhand der Aminosäuresequenz nur bedingt möglich ist.

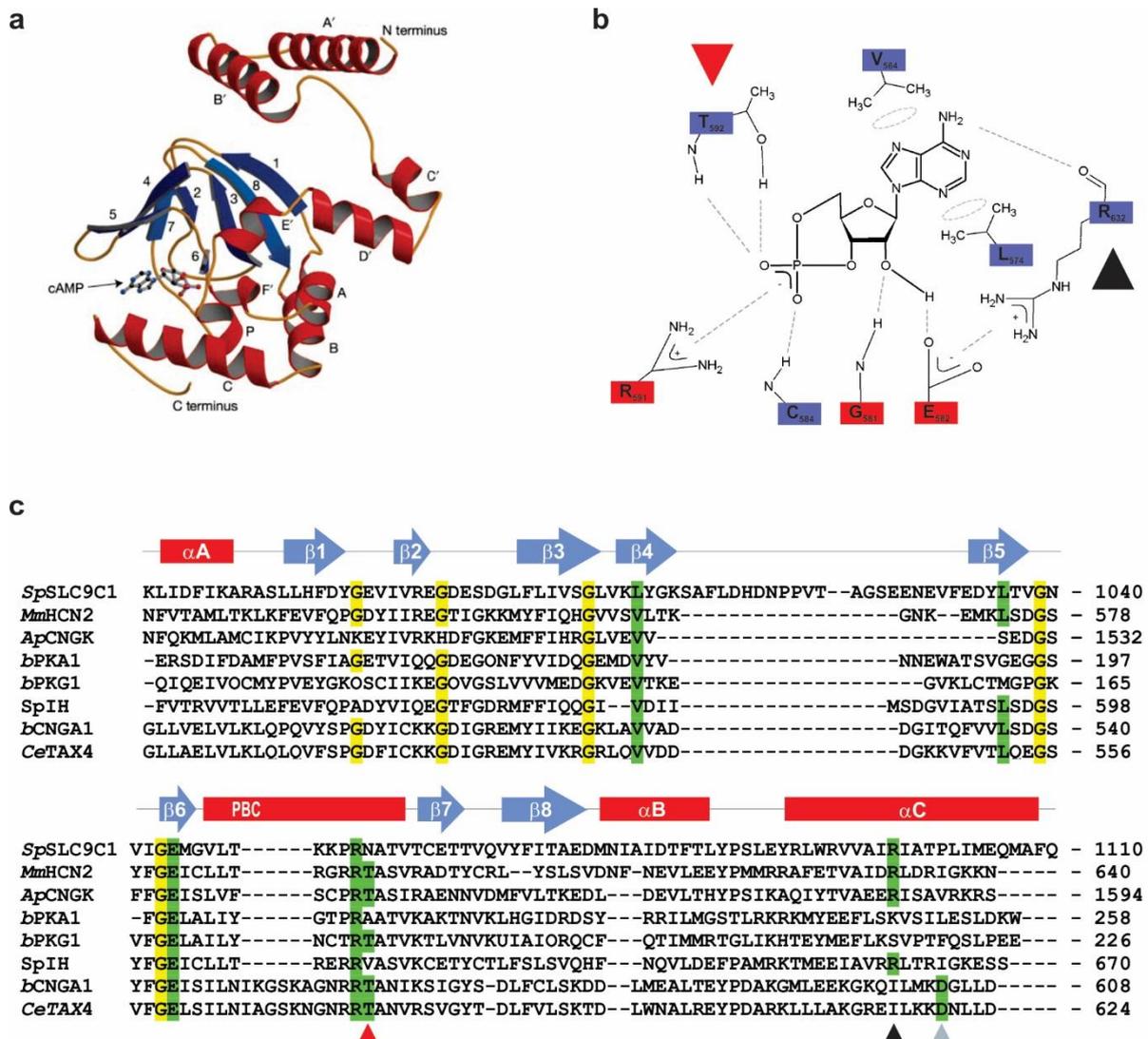


Abbildung 4-2: Vergleich der Bindestelle für zyklische Nucleotide aus *SpSLC9C1* mit der von Ionenkanälen und Proteinkinase: a) Struktur der CNBD mit C-linker aus *MmHCN2* in Anwesenheit von cAMP. b) Interaktionen verschiedener Aminosäuren der CNBD aus *MmHCN2* mit cAMP. Der rote und schwarze Pfeil zeigen jeweils auf das Thr92 in der PBC und auf das Arg632 in der α C-Helix der *MmHCN2*-CNBD. c) Sequenzvergleich zwischen der CNBD aus *SpSLC9C1*, *MmHCN2*, *ApCNGK* (dritte CNBD), *bPKA1*, *bPKG1*, *SpIH*, *bCNGA1* und *CeTAX4*. Markierte Aminosäuren sind strukturelevante Gly-Reste in den β -Faltblättern (gelb), die Purin-bindenden Val- und Leu-Reste in β 4 und 5 (grün), das Ribofuranose-bindende Gly/Glu-Motiv in β 6 (gelb/grün) und Phosphat-bindenden Arg/Thr-Reste in der PBC (grün). Der rote Pfeil zeigt auf das Thr in den Abbildungen b) und c). Die Arg- (schwarzer Pfeil) und Asp-Reste (grauer Pfeil) in der α C-Helix haben möglicherweise Einfluss auf die Substratspezifität der CNBD. Abbildung a) und b) aus Cukkemane *et al.*, 2011.

4. Diskussion

4.1.4 Wie interagieren Austauscherdomäne, VSD und CNBD?

Eine spannende Frage lautet, wie die VSD den Na^+/H^+ -Austausch reguliert und wie die Bindung von cAMP an die CNBD in diesen Prozess eingreift. CNBDs steuern eine Vielzahl von Proteinen, in Verbindung mit einer VSD sind sie allerdings nur in zyklisch Nukleotid-sensitiven Kanälen beschrieben worden. Dabei zeigen sich in den verschiedenen Mitgliedern dieser Familie Unterschiede in der Regulation. CNG-Kanäle besitzen zum Beispiel nur eine sehr geringe Spannungsabhängigkeit (Li *et al.*, 2017). Die Bindung von cNMP reicht aus um die Kanäle zu aktivieren (Kaupp *et al.*, 1989; Dhallan *et al.*, 1990; Bönigk *et al.*, 1993; Körschen *et al.*, 1995; Ruiz & Karpen, 1997; Tibbs, Goulding & Siegelbaum, 1997; Gerstner *et al.*, 2000). Demgegenüber werden HCN-Kanäle durch Hyperpolarisation aktiviert; zyklische Nukleotide verschieben hier die Spannungsabhängigkeit zu weniger negativen Spannungen (DiFrancesco & Tortora, 1991; Ludwig *et al.*, 1998; Wang, Chen & Siegelbaum, 2001; Altomare *et al.*, 2003; Zagotta *et al.*, 2003; Craven & Zagotta, 2004). Schließlich sind die EAG/hERG-Kanäle depolarisationsaktiviert. Zyklische Nukleotide scheinen keinen Einfluss auf die Aktivität zu besitzen (Ludwig *et al.*, 1994; Robertson, Warmke & Ganetzky, 1996; Frings *et al.*, 1998; Brelidze, Carlson & Zagotta, 2009; Brelidze *et al.*, 2012, 2013; Marques-Carvalho & Morais-Cabral, 2012; Marques-Carvalho *et al.*, 2012; Qingxin Li *et al.*, 2014).

HCN- und CNG-Kanäle besitzen zwischen CNBD und dem Porenmotiv einen sogenannten *C-linker* (Lee & MacKinnon, 2017; Li *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2017). Der *C-linker* besteht aus den sechs α -Helices $\alpha\text{A}'$ - $\alpha\text{F}'$ (Abbildung 4-2a). Die *C-linker* der vier Untereinheiten liegen am intrazellulären Teil des Kanals ringförmig zusammen (Johnson & Zagotta, 2005). Dabei sitzen $\alpha\text{A}'$ und $\alpha\text{B}'$ gefaltet auf den beiden Helices $\alpha\text{C}'$ und $\alpha\text{D}'$ der benachbarten Untereinheit (*elbow on shoulder*, Zagotta *et al.*, 2003). Vor Kurzem wurde die Struktur des TAX4-CNG-Kanals aus *C. elegans* (*CeTAX4*) in Anwesenheit von cGMP aufgeklärt (Li *et al.*, 2017). Es konnte gezeigt werden, dass $\alpha\text{A}'$ und $\alpha\text{B}'$ über ein Netzwerk aus Ionen- und Wasserstoffbrückenbindungen sowohl mit der S4-TMD der VSD als auch mit der S5-TMD des Porenmotivs verbunden sind. Eine ähnliche Beobachtung wurde im humanen HCN1-Kanal gemacht (*HsHCN1*, Lee & MacKinnon 2017). Obwohl HCN1 kaum durch Bindung von cAMP moduliert wird (2-4 mV zu weniger negativen Potentialen, Wang *et al.*, 2001), zeigt die Struktur einen Unterschied in der Stellung der $\alpha\text{A}'$ -Helix des *C-linkers* zur S4- und S5-TMD in Ab- und Anwesenheit von cAMP (Lee & MacKinnon, 2017). Es wird vermutet, dass die Anwesenheit von cAMP die Bewegung der VSD erleichtert. Möglicherweise agiert ein

C-linker, oder eine *C-linker*-ähnliche Struktur zwischen der CNBD und der VSD bei *SpSLC9C1* ähnlich.

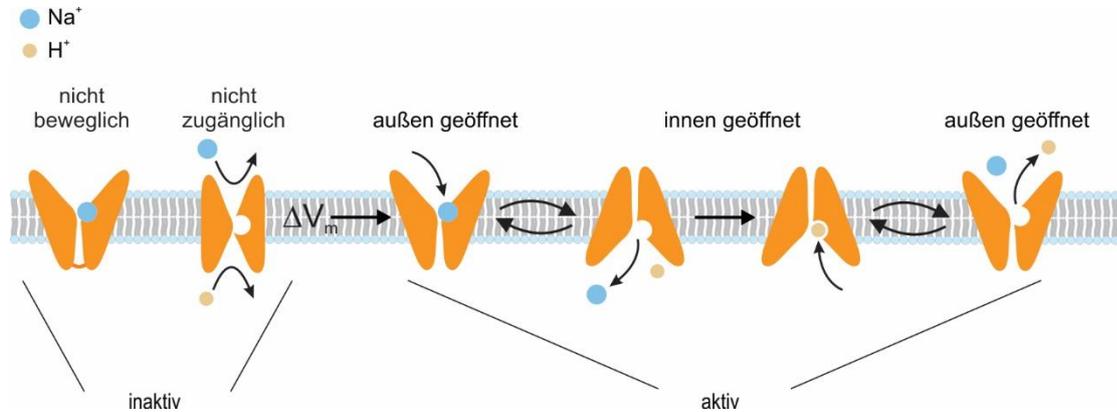


Abbildung 4-3: Schema des *alternating-access*-Modells bei *SpSLC9C1*: Im inaktiven Zustand ist entweder die Bewegung der mobilen Segmente der NHE-Domäne von *SpSLC9C1* nicht möglich, oder die Bindung des Substrats ist blockiert (möglich ist ein physikalisches *gate* oder eine niedrige Substrataffinität). Ein Spannungssprung (ΔV_m) startet den Na^+/H^+ -Austausch (aktiv). Im *alternating-access*-Modell ermöglicht die Substratbindung den Übergang vom „nach außen-“, in den „nach innen geöffneten Zustand“ oder vice versa (Jardetzky, 1966).

In Kapitel 4.1.1 wurden die möglichen mobilen Segmente (TMD VI, VII und XIII) von *SpSLC9C1* besprochen, die im *alternating-access*-Modell den Na^+/H^+ -Austausch ermöglichen. Wie könnte die VSD diesen Na^+/H^+ -Austauschmechanismus regulieren? Eine Möglichkeit ist, dass die VSD im depolarisierten Zustand die Bewegung der mobilen Segmente inhibiert (Abbildung 4-3, „nicht beweglich“). Alternativ kann die Substratbindestelle selbst blockiert sein (Abbildung 4-3, „nicht zugänglich“). Unter anderem kann eine physikalische Barriere (*gate*) oder eine niedrige Substrataffinität diesen Zustand erklären. Ein Spannungssprung zu negativeren Potentialen (ΔV_m) aktiviert den Na^+/H^+ -Austausch durch Entfernung der Barriere bzw. Anstieg der Affinität oder durch Disinhibition des *alternating access*-Mechanismus (Abbildung 4-3, „aktiv“).

Ein hypothetisches Modell beschreibt die einzelnen Zustände im Na^+/H^+ -Transportzyklus (Abbildung 4-4, Calinescu *et al.*, 2014). An diesem Modell kann verdeutlicht werden, in welchem Zustand die VSD den Na^+/H^+ -Austausch regulieren könnte. C_i^{rest} bzw. C_e^{rest} stellen den inaktiven Zustand in der nach innen- bzw. nach außen geöffneten Konformation dar. Dabei

4. Diskussion

liegt kein Ion gebunden vor. In Abbildung 4-3 ist dieser Zeitpunkt als „nicht zugänglich“ dargestellt. Hyperpolarisation entfernt die Barriere oder erhöht die Affinität und versetzt den Na^+/H^+ -Austauscher in den C_i - bzw. den C_e -Zustand. Jetzt ist *SpSLC9C1* in der Lage entweder Na^+ oder H^+ im jeweils nach innen- ($\text{C}_i^{\text{Na}^+}$ bzw. $\text{C}_i^{\text{H}^+}$) oder nach außen geöffneten Zustand ($\text{C}_e^{\text{Na}^+}$ bzw. $\text{C}_e^{\text{H}^+}$) zu binden. Die K_D -Werte für *SpSLC9C1* sind nicht bekannt und könnten in zukünftigen Untersuchungen bestimmt werden. Zum Vergleich: die K_D -Werte für Na^+ -Ionen von *MjNhaP1*, *EcNhaA* und *PaNhaP* liegen bei 0,84, 0,2 und 0,5 mM (Paulino *et al.*, 2014; Taglicht *et al.*, 1991; Wöhlert *et al.*, 2014).

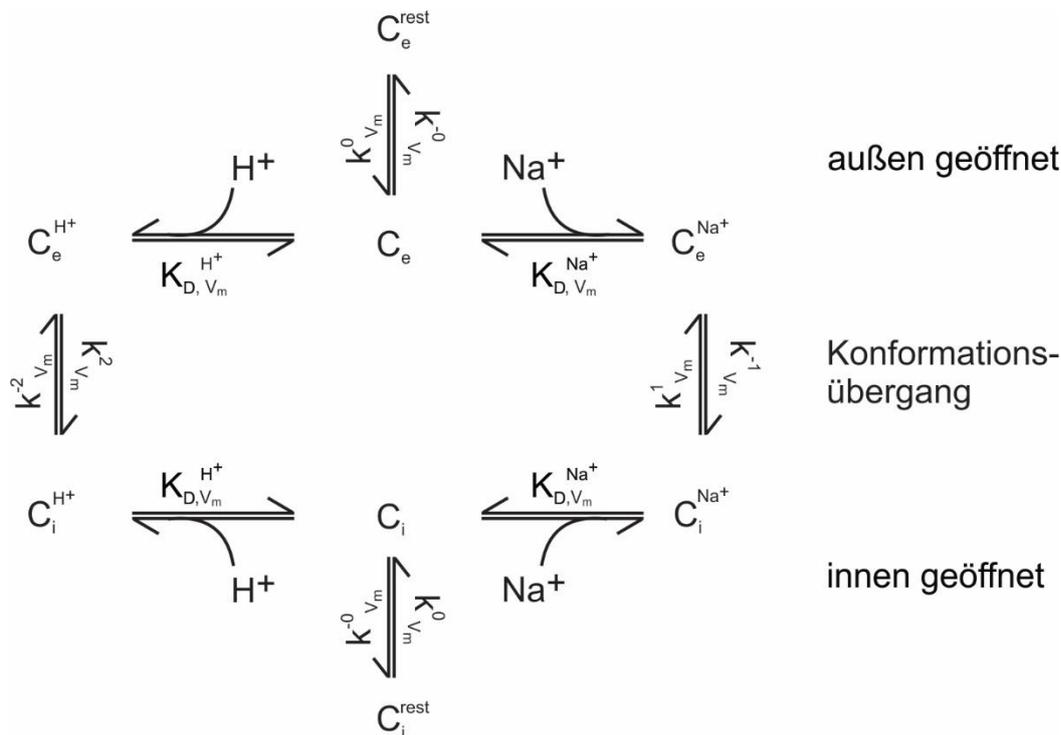


Abbildung 4-4: Kinetisches Modell eines Transportzyklus: Abgeleitet aus Calinescu *et al.*, 2014.

Bei der sterischen Inhibition der mobilen Segmente („nicht beweglich“ in Abbildung 4-3) ist das Ion zwar gebunden, aber es findet kein Übergang von der nach außen- in die nach innen geöffnete Konformation, oder vice versa, statt. Hyperpolarisation entfernt die Inhibition und ermöglicht den Na^+/H^+ -Austausch. Untersuchungen aus *SLC9A1* zeigen, dass eine sterische Blockade den Na^+/H^+ -Austausch regulieren kann. So wird *HsSLC9A1* allosterisch durch das Ca^{2+} -Bindeprotein Calmodulin inhibiert, das bei Ca^{2+} -Bindung dissoziiert und den Na^+/H^+ -Austausch startet (Köster *et al.*, 2011). Die *SpSLC9C1*-VSD könnte hier ähnlich agieren. Zusammenfassend besitzt die Regulation von *SpSLC9C1* große Ähnlichkeit zu der von HCN-Kanälen. Erkenntnisse aus strukturellen Untersuchungen dieser Kanäle geben

Hinweise auf mögliche Interaktionsmechanismen zwischen Austauschdomäne, VSD und CNBD in *SpSLC9C1*.

Ionentransporter und Kanäle werden in der Biologie als unterschiedliche Entitäten betrachtet. Gadsby definiert ein Hauptmerkmal, welches Transporter von Kanälen unterscheidet; im Ionenkanal, aber nicht im Transporter hat das Ion simultan von beiden Seiten der Membran Zugang zur Pore bzw. Bindestelle (Gadsby 2009). Als Konsequenz ist es dem Transporter, aber nicht dem Kanal möglich, Ionen oder Substrate gegen den Konzentrationsgradienten zu transportieren. Diese Definition führte dazu, dass Proteine wie der Harnstofftransporter oder der Furamat-Transporter, die bis dato als Transporter galten, nun als Kanal klassifiziert werden (Levin *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Die Grenze zwischen Ionenkanälen und Transportern verschwimmt bei der Betrachtung von CLC-Proteinen (Miller 2006). Diese Proteinfamilie wird in zwei Klassen unterteilt: Chlorid- (Cl^-) Kanäle und Cl^-/H^+ -Austauscher ($2 \text{Cl}^- : 1 \text{H}^+$, Miller & White 1984; Jentsch *et al.*, 1990; Accardi & Miller 2004; Scheel *et al.*, 2005). Park und Kollegen fanden 2016 heraus, dass eine *loop*-Domäne in den sonst homologen CLC-Proteinen den Unterschied zwischen einem Ionenkanal und einem Austauscher ausmacht (Park *et al.*, 2016). Der Eindruck, dass die Evolution bei *SpSLC9C1* in Anlehnung an Viktor Frankenstein agiert hat, verschwindet dabei. *SpSLC9C1* stellt keine Kuriosität dar, sondern bestärkt die Hypothese, dass Ionenkanäle und Ionentransporter phylogenetisch näher zusammenliegen als bisher angenommen (Accardi & Miller, 2004; Miller, 2006; Levin, Quick & Zhou, 2009; Shi, 2013). Dadurch zeichnet sich eine zusätzliche Rolle von Na^+/H^+ -Austauschern ab. Bisher bekannte Mitglieder der SLC9-Familie dienen hauptsächlich der Zell-Homöostase. Im Gegensatz dazu ermöglicht *SpSLC9C1* über Regulation durch ΔV_m und cAMP eine schnelle Alkalisierung in Folge eines chemotaktischen Stimulus. Es stellt dadurch eher ein Signal- als ein Homöostasemolekül dar. Im zweiten Kapitel dieser Diskussion geht es um die physiologische Rolle von *SpSLC9C1*.

4. Diskussion

4.2 Physiologie

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich den molekularen Mechanismus der Alkalisierung von Seeigelspermien im chemotaktischen Signalweg entschlüsseln. Die chemotaktische Navigation beruht auf der hochkontrollierten Regulation von $[Ca^{2+}]_i$ durch den CatSper- Ca^{2+} -Kanal (Seifert *et al.*, 2014). Rezeptor-GC, CNGK und SpIH übersetzen auf- und absteigende Lockstoffkonzentrationen in ein Spannungssignal, das den CatSper-Kanal in Abhängigkeit der Schwimmbahn im Gradienten öffnet oder schließt (Pichlo *et al.*, 2014; Bönigk *et al.*, 2009; Alvarez *et al.*, 2012; Seifert *et al.*, 2014; Jikeli *et al.*, 2015). Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Navigation ist eine schnelle Alkalisierung, die während der Stimulation mit dem Lockstoff erfolgt. *SpSLC9C1* als Signalmolekül ermöglicht diese Alkalisierung durch die Regulation über ΔV_m und cAMP innerhalb kürzester Zeit (200-300 ms bei 1 nM Speract, Abbildung 3-27c) um etwa 0,2 pH-Einheiten (Seifert *et al.*, 2014). Dieser schnelle pH_i -Anstieg kann unter anderem durch eine hohe Effektivität oder eine große Anzahl von *SpSLC9C1*-Molekülen in der Membran des Spermiums gewährleistet werden. Die Effektivität von Austauschern ist durch ihre Umsatzrate definiert (Transportzyklus/min). Sie konnte für alle strukturell aufgeklärten Na^+/H^+ -Austauscher bestimmt werden: *EcNhaA* = 10^5 /min, *TtNapA* = 100/min, *MjNhaP1* = 100/min und *PaNhaP* = ~ 4 /min (Taglicht, Padan & Schuldiner, 1991; Furrer *et al.*, 2007; Paulino *et al.*, 2014; Wöhlert, Kühlbrandt & Yildiz, 2014). Für *SpSLC9C1* ist die Umsatzrate nicht bekannt. Man könnte die Umsatzrate bestimmen, indem man im heterologen System zunächst die pH-Änderungen über das Zellvolumen und die Pufferkapazität versucht zu quantifizieren (Alekov & Fahlke, 2009), so dass man für die jeweilige Zelle die absolute Zahl an Protonen, die von SLC9C1-Molekülen transportiert werden, kennt. Dann ließe sich über die Größe der *Gating*-Ströme eine Abschätzung über die Anzahl an *SpSLC9C1*-Moleküle in der Zelle treffen und dann die Umsatzrate für ein einzelnes *SpSLC9C1*-Molekül abschätzen. Analog dazu kann die Umsatzrate im Seeigelspermium bestimmt werden. Vor kurzem wurde durch quantitative Massenspektroskopie die Anzahl einiger wichtiger Proteine im Seeigelspermium von *A. punctulata* bestimmt (persönliche Kommunikation R. Seifert & C. Trötschel). Dabei zeigte sich, dass SLC9C1 mit 71.000 Proteinen pro Spermium eine relativ hohe Dichte hat (circa 2000 Austauscher/ μm^2 bei einer Oberfläche von $35 \mu m^2$, Pichlo *et al.*, 2014). Im Vergleich, die Rezeptor-GC, das häufigste Protein im Seeigelspermium, hat eine Dichte von $9500/\mu m^2$ (Pichlo *et al.*, 2014; Dangott *et al.*, 1989). Rhodopsin in Photorezeptoren hat die höchste Dichte mit 26.000-45.000 Molekülen pro μm^2 (Fotiadis *et al.*, 2003; Gunkel *et al.*, 2015). Nach

Ermittlung von Zellvolumen und Pufferkapazität könnte die Umsatzrate nach Stimulation mit dem Lockstoff unter Einsatz der pH_{null} -Methode (Eisner, Kenning & O'Neill, 1989, Kapitel 2.6) bestimmt werden.

4.2.1 Die lösliche Adenylatzyklase

Im Gegensatz zu cGMP ist die Rolle von cAMP in Seeigelspermien weniger gut verstanden. Ein Zielprotein von cAMP ist der *S. purpuratus* SpIH-Kanal. SpIH ist sehr sensitiv für cAMP ($K_{1/2} = 0,74 \mu\text{M}$): es erhöht die Offenwahrscheinlichkeit während der Hyperpolarisation und es beseitigt einen Inaktivierungsmechanismus (Gauss *et al.*, 1998). Der SpIH-Kanal depolarisiert das Seeigelspermium nach der Speract-vermittelten Hyperpolarisation und unterstützt dadurch die Aktivierung des CatSper- Ca^{2+} -Kanals. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich eine weitere Rolle von cAMP im chemotaktischen Signalweg demonstrieren. Die Bindung von cAMP an die CNBD von *SpSLC9C1* verschiebt den $V_{1/2}$ -Wert der Aktivierung um ca. 15 mV zu weniger negativen Werten, was die Aktivität bei physiologischen Membranspannungen erhöht. Beide Zielproteine für cAMP, SpIH und *SpSLC9C1*, kooperieren, um den CatSper-Kanal zu öffnen und die chemotaktische Navigation zu ermöglichen.

Wie wird die cAMP-Konzentration reguliert? Zuständig für die cAMP-Synthese in Spermien ist die lösliche Adenylatcyclase (sAC, Bookbinder *et al.*, 1990). Im Vergleich zur cGMP-Synthese findet die Synthese von cAMP zeitlich verzögert statt (Kaupp *et al.*, 2003). Lösliche ACs sind in fast allen Zellen vertreten und werden normalerweise durch Ca^{2+} -Ionen und Bikarbonat stimuliert (Chen *et al.*, 2000; Jaiswal & Conti, 2003; Steegborn *et al.*, 2005; Kleinboelting *et al.*, 2014). In Seeigelspermien ist die cAMP-Synthese aber möglicherweise unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration (Nomura *et al.*, 2005). Auch Bikarbonat scheint die Aktivität der sAC in Seeigelspermien nicht zu steuern (persönliche Kommunikation H. G. Körschen). Beltrán, sowie Cook und Babcock vermuten, dass die sAC im Seeigel durch Änderungen der Membranspannung aktiviert wird und außerdem pH_i - abhängig ist (Cook & Babcock, 1993; Beltrán, Zapata & Darszon, 1996). Wie kann ein lösliches Protein spannungsabhängig sein? Nomura und Kollegen haben 2006 gezeigt, dass in *S. purpuratus* Spermien die sAC mit *SLC9C1* assoziiert ist (Nomura & Vacquier, 2006). Man könnte sich vorstellen, dass die spannungsabhängige Konformationsänderung der *SpSLC9C1*-VSD auf die assoziierte sAC übertragen wird und so zur Aktivierung führt (Abbildung 4-5, S4-Bewegung,

4. Diskussion

weißer Pfeil). Ebenfalls möglich ist die indirekte Aktivierung der sAC durch *Sp*SLC9C1-vermittelte Alkalisierung (Abbildung 4-5, ΔpH_i , schwarzer Pfeil).

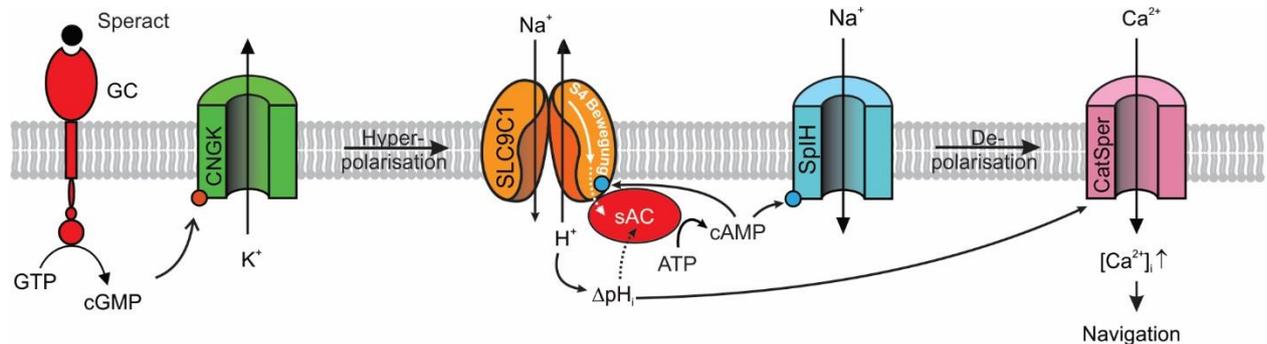


Abbildung 4-5: Mögliche sAC-Regulierung durch *Sp*SLC9C1: Unter depolarisierten Bedingungen sind sowohl *Sp*SLC9C1 als auch sAC inaktiv. Eine Hyperpolarisation aktiviert die sAC entweder durch Übertragung der Konformationsänderungen in der VSD (weiß-gepunkteter Pfeil) oder durch die *Sp*SLC9C1-vermittelte Alkalisierung (ΔpH_i , schwarz-gepunkteter Pfeil).

Beide Mechanismen resultieren in der cAMP-Synthese. Zyklisches AMP bindet, neben der *Sp*IH-CNBD, an die *Sp*SLC9C1-CNBD und erleichtert die Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschs während der Hyperpolarisation durch positive Rückkopplung. Diese Rückkopplung könnte helfen, den Spermien schon bei geringen Lockstoffkonzentrationen die chemotaktische Navigation zu ermöglichen.

Zukünftige Experimente müssen die Frage nach der sAC-Regulation durch den pH_i oder die Membranspannung beantworten. Hier könnte die inaktive *Sp*SLC9C1-R399A-Mutante hilfreich sein. Diese Mutante hatte normale *Gating*-Ströme, transportierte aber keine H^+ -Ionen mehr (Abbildung 3-13). Exprimiert man die sAC zusammen mit *Sp*SLC9C1-R399A sowie einem cAMP-Sensor (Mukherjee, Jansen & Jikeli *et al.*, 2016), könnte in der Einzelzell-Fluorimetrie untersucht werden, ob ein hyperpolarisierender Spannungssprung die cAMP-Synthese startet. Dies wäre ein völlig neuer Aktivierungsmechanismus für die lösliche AC.

4.2.2 SLC9C1 in Säugetieren

Bisherige Versuche SLC9C1 aus Säugetieren funktionell zu exprimieren sind gescheitert. Das mag zum einen daran liegen, dass der SLC9C1-Klon, so wie er von Wang und Kollegen 2003 und 2007 beschrieben wurde, am N-Terminus unvollständig ist; ihm fehlt das erste transmembranale Segment (Abbildung 4-6, Wang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007).

<i>Mm</i> SLC9C1 (1)	MEMEEISENLTASHSIKLTNMWLELLKSVFLSTP	QDLPEIILILSLICTVGAFLN	MHLKD	60
<i>Mm</i> SLC9C1 (2)	-----	-----	MHLKD	5
<i>Mm</i> SLC9C1 (1)	FPIPLPVILFLIGCCFEILSFAS	TQIQIYADAIQWMDPDIFFGI	FTPVIIFNVAFDMDIY	120
<i>Mm</i> SLC9C1 (2)	FPIPLPVILFLIGCCFEILSFAS	TQIQIYADAIQWMDPDIFFGI	FTPVIIFNVAFDMDIY	65

Abbildung 4-6: Der 2003 veröffentlichte SLC9C1 aus der Maus (*Mm*SLC9C1) ist unvollständig: Gegenüberstellung der vollständigen Aminosäuresequenz (1) von *Mm*SLC9C1 (Oduru *et al.*, 2003, NCBI-Referenz NP_932774.3) und *Mm*SLC9C1 aus den Arbeiten von Wang und Kollegen 2003 und 2007 (2, Wang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007, NCBI-Referenz NP_932774.2).

Es könnte aber auch sein, dass in Säugetieren SLC9C1 keinen Na⁺/H⁺-Austausch vermittelt, sondern andere Substrate transportiert. Das wäre nicht überraschend, weil viele Signalmoleküle in Spermien, obwohl sie auf den ersten Blick ähnlich aussehen und charakteristische Sequenzmotive aufweisen, in verschiedenen Spezies ganz unterschiedliche Eigenschaften besitzen oder Funktionen übernehmen (Kaupp & Strünker, 2016). Beispiele hierfür sind der CNGK-Kanal im Zebrafisch (*D. rerio*, *Dr*CNGK) oder die CatSper-Kanäle aus Mensch (*Hs*CatSper) und Maus (*Mm*CatSper). Der Seeigel-CNGK ist extrem sensitiv für cGMP (Bönigk *et al.*, 2009), während *Dr*CNGK trotz voll ausgebildeter CNBDs nicht durch zyklische Nukleotide sondern durch pHi-Änderungen reguliert wird (Fechner *et al.*, 2015). *Hs*CatSper ist ein polymodaler Sensor und kann durch das weibliche Geschlechtshormon Progesteron aktiviert werden (Strünker *et al.*, 2011; Brenker *et al.*, 2012; Lishko *et al.*, 2012), welches möglicherweise als Lockstoff für die Navigation des Spermiums dient. Demgegenüber wird *Mm*CatSper nicht durch Progesteron aktiviert.

4. Diskussion

[MjNhaP1]	AATDPATLIPVFSRVRTNPEVAITLEAESIFNDPLGIVSTSVILGLFGLFSS	180
[Seeigel]	SATDPVAVVALLKDLGASKQLGTIIEGESLLNDGCAIVIFNVFMKMVFFPQL	257
[Maus]	ISSDPMLTSASIRDLGLSRSLTNLINGESLLTSVLSLVIYSGVVHIRFKSKS	218
[Mensch]	VSSDPMLTAAAIIRDGLSLRSLISLINGESLMTSVISLITFTSIMDFDQRLQS	198
[Rind]	VSLDPMLTSSAIKDLGLSRSLVSLINGESLMTSVMSLITFTVIVNIDLSLHK	264
[Katze]	MSSDPMLTAAAIIRDGLSLRSLTNLINGESLMTSIMSLIMFNSIEDINGNLQK	219
[Mausmakis]	ASSDPMLTATAIIRDGLSLRSLNLIIGESLVTSVISLLMFSTIMDKRRQS	218
[Antilope]	VSLDPMLTSSAIKDLGLSRSLVSLINGESLMTSVMSLITFTVIVNIDLSLHK	248
[Delphin]	VSSDPMLTSSSIKDLGLSRGLVNLINGESLMTSIVSLIVFTSIMDINFLQK	217

Abbildung 4-7: Sequenzvergleich der Substratbindestelle zwischen MjNhaP1 und SLC9C1 aus verschiedenen Spezies: In Säugern ist das charakteristische Asn/Asp-Motiv durch ein Thr/Ser ersetzt (grüner Kasten). Maus (*Mus musculus*), Mensch (*Homo sapiens*), Rind (*B. indicus*), Katze (*Felis catus*), Mausmakis (*Microcebus murinus*), Antilope (*Panholops hodgonii*) und Delphin (*Tursiops truncatus*). Rot markierte Aminosäuren sind Bestandteil der Na⁺-Bindestelle.

Sequenzvergleiche zwischen *SpSLC9C1* und seinen Orthologen in Säugetieren zeigen charakteristische Unterschiede in wichtigen Aminosäuren der NHE-Domäne (Abbildung 4-7, rote Aminosäuren). Ein wichtiges Asn/Asp-Motiv in der Substratbindestelle von Austauschern (Paulino *et al.*, 2014; Wöhlert, Kühlbrandt & Yildiz, 2014) ist sowohl in der Maus als auch im Menschen durch ein Thr/Ser ersetzt. Abbildung 4-7 zeigt die Bindestelle von SLC9C1 aus neun verschiedenen Spezies, sowie den MjNhaP1. Das Thr/Ser-Motiv ist in allen gezeigten Säugerspezies konserviert (Abbildung 4-7, grüner Kasten). Eventuell ermöglicht der MmSLC9C1 oder insbesondere das Thr/Ser-Motiv den Transport eines anderen Substrats. Eine Doppelmutante in *SpSLC9C1*, in der das Asn/Asp-Motiv durch ein Thr/Ser ersetzt ist, liegt vor und vorläufige Untersuchungen deuten an, dass eine Spannungänderung keinen Na⁺/H⁺-Austausch in dieser Mutante bewirkt. Künftige Untersuchungen müssen sich dieser spannenden Frage widmen. Auch die regulatorischen Domänen (VSD & CNBD) der Säugetier SLC9C1-Proteine zeigen Unterschiede zum Seeigel-SLC9C1. Auffällig ist die deutlich geringere Zahl an positiven Ladungen im S4 Segment der VSD (Abbildung 4-8) und auch in der CNBD sind einige Schlüsselstellen mit anderen Aminosäuren besetzt (Abbildung 4-9).

	+ + + + + + +	
[Seeigel]	NLSSIKVV KLFRLLRGLRMLRLTK ALIPK	820
[Maus]	NFDLTETVVF FMNVIRLLRILRILKL VTPK	749
[Mensch]	IFNETEVIVF IKVVQFFRILRIFKLI APK	681
[Rind]	IFDLVQIV IIMKIVRFLRILRILKL VTPR	747
[Elefant]	NFTVI KTMVFLKIVRLLRLLRILKL VTPK	748
[Katze]	TFEFIQT VIFFKIVRFFRILRILKL ITPK	748
[Mausmakis]	NIDLIQT LVFIKLVQLRLLRIFKL ITPK	747
[Antilope]	IFDLVQT AIIMKVVRFRLRILRILKL VTPR	879
[Delphin]	TFDLIQT VAFIKVVRFRLRILRILKL VTPK	747
CiVSP	ADGLG RLVVLARLLRVVRLARIF YSHOOM	240

Abbildung 4-8: Sequenzvergleich der VSD-S4-TMD: Dargestellt sind die VSDs aus *SpSLC9C1*, *CiVSP* und verschiedenen Säugerspezies; positiv geladenen Aminosäuren sind blau markiert (Lys und Arg); Maus (*Mus musculus*), Mensch (*Homo sapiens*), Rind (*Bos indicus*), Katze (*Felis catus*), Mausmakis (*Microcebus murinus*), Antilope (*Pantherops hodgsonii*) und Delphin (*Tursiops truncatus*).

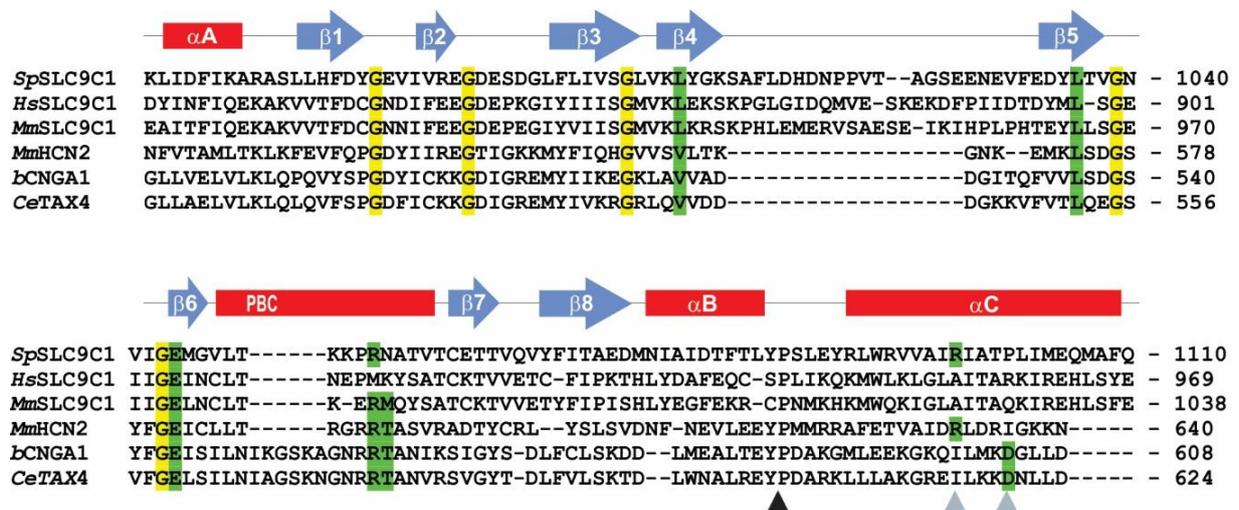


Abbildung 4-9: Sequenzvergleich der CNBD: Gezeigt sind die CNBDs von *SLC9C1* aus *S. purpuratus* (*SpSLC9C1*), Mensch (*HsSLC9C1*), Maus (*MmSLC9C1*) mit der CNBD aus *MmHCN2*, *bCNGA1* und *CeTAX4*. *Hs*- und *MmSLC9C1* fehlt das Tyr/Pro-Scharnier (schwarzer Pfeil) und die in Kapitel 4.1.3 diskutierten Arg- und Asp-Reste (graue Pfeile). Ein wichtiges Arg in der PBC findet sich in *MmSLC9C1*, aber nicht in *HsSLC9C1*.

5. Literaturverzeichnis

- Accardi, A. & Miller, C.** (2004) 'Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl⁻ channels.', *Nature*, 427, 803-807
- Accili, E. A., Redaelli, G. & DiFrancesco, D.** (1997) 'Differential control of the hyperpolarization-activated current (i_h) by cAMP gating and phosphatase inhibition in rabbit sino-atrial node myocytes.', *The Journal of Physiology*, 500, 643-651
- Aggarwal, S. K. & MacKinnon, R.** (1996) 'Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel', *Neuron*, 16, 1169-1177
- Aiba, H., Fujimoto, S. & Ozaki, N.** (1982) 'Molecular cloning and nucleotide sequencing of the gene for E. coli cAMP receptor protein.', *Nucleic Acids Research*, 10, 1345-1361
- Alekov, A. K. & Fahlke, C.** (2009) 'Channel-like slippage modes in the human anion/proton exchanger ClC-4', *The Journal of General Physiology*, 133, 485-496
- Altenhofen, W., Ludwig, J., Eismann, E., Kraus, W., Bönigk, W. & Kaupp, U. B.** (1991) 'Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 9868-72
- Altomare, C., Terragni, B., Brioschi, C., Milanesi, R., Pagliuca, C., Viscomi, C., Moroni, A., Baruscotti, M. & DiFrancesco, D.** (2003) 'Heteromeric HCN1-HCN4 Channels: A Comparison with Native Pacemaker Channels from the Rabbit Sinoatrial Node', *The Journal of Physiology*, 549, 347-359
- Alvarez, L., Dai, L., Friedrich, B. M., Kashikar, N. D., Gregor, I., Pascal, R. & Kaupp, U. B.** (2012) 'The rate of change in Ca²⁺ concentration controls sperm chemotaxis.', *The Journal of Cell Biology*, 196, 198-207
- Alvarez, L., Friedrich, B. M., Gompper, G. & Kaupp, U. B.** (2014) 'The computational sperm cell.', *Trends in Cell Biology*, 24, 653-63
- Amemiya, M., Loffing, J., Lötscher, M., Kaissling, B., Alpern, R. J. & Moe, O. W.** (1995) 'Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb.', *Kidney International*, 48, 1206-1215

Anderson, J. a, Huprikar, S. S., Kochian, L. V, Lucas, W. J. & Gaber, R. F. (1992) 'Functional expression of a probable Arabidopsis thaliana potassium channel in Saccharomyces cerevisiae', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 3736-3740

Arkin, I. T., Xu, H., Jensen, M. O., Arbely, E., Bennett, E. R., Bowers, K. J., Chow, E., Dror, R. O., Eastwood, M. P., Flitman-Tene, R., Gregersen, B. A., Klepeis, J. L., Kolossvary, I., Shan, Y. & Shaw, D. E. (2007) 'Mechanism of Na⁺/H⁺ Antiporting', *Science*, 317, 799-803

Armstrong, C. M. & Bezanilla, F. (1973) 'Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels.', *Nature*, 242, 533-552

Armstrong, C. M. & Bezanilla, F. (1974) 'Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels.', *The Journal of General Physiology*, 63, 459-461

Attaphitaya, S., Park, K. & Melvin, J. E. (1999) 'Molecular cloning and functional expression of a rat Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5) highly expressed in brain.', *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 4383-4388

Baird, N. R., Orłowski, J., Szabo, E. Z., Zaun, H. C., Schultheis, P. J., Menon, A. G. & Shull, G. E. (1999) 'Molecular cloning, genomic organization, and functional expression of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 5 (NHE5) from human brain.', *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 4377-4382

Banerjee, A., Lee, A., Campbell, E. & Mackinnon, R. (2013) 'Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K⁺ channel.', *eLife*, 2

Battaglino, R. A., Pham, L., Morse, L. R., Vokes, M., Sharma, A., Odgren, P. R., Yang, M., Sasaki, H. & Stashenko, P. (2008) 'NHA-oc/NHA2: a mitochondrial cation-proton antiporter selectively expressed in osteoclasts.', *Bone*, 42, 180-192

Baum, M. (1989) 'Axial heterogeneity of rabbit proximal tubule luminal H⁺ and basolateral HCO₃⁻ transport', *American Physiology Socities*, 89

Beltrán, C., Zapata, O. & Darszon, A. (1996) 'Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylylcyclase', *Biochemistry*, 35, 7591-7598

- Berg, H. C. & Brown, D. A.** (1972) 'Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking.', *Nature*, 239, 500-504
- Berman, H. M., Ten Eyck, L. F., Goodsell, D. S., Haste, N. M., Kornev, A. & Taylor, S. S.** (2005) 'The cAMP binding domain: an ancient signaling module.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 45-50
- Bezánilla, F.** (2000) 'The voltage sensor in voltage-dependent ion channels.', *Physiological reviews*, 80, 323-32
- Bezánilla, F.** (2008) 'How membrane proteins sense voltage.', *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 9, 555-592
- Bezánilla, F., Perozo, E. & Stefani, E.** (1994) 'Gating of Shaker K⁺ channels: II. The components of gating currents and a model of channel activation', *Biophysical Journal*, 66
- Bezánilla, F. & Villalba-Galea, C. a** (2013) 'The gating charge should not be estimated by fitting a two-state model to a Q-V curve.', *The Journal of General Physiology*, 142, 575-8
- Bianchini, L., Kapus, A., Lukacs, G., Wasan, S., Wakabayashi, S., Pouyssegur, J., Yu, F. H., Orłowski, J. & Grinstein, S.** (1995) 'Responsiveness of mutants of NHE1 isoform of Na⁺/H⁺ antiport to osmotic stress', *The American Journal of Physiology*, 269, 271-279
- Biemesdorfer, D., Reilly, R. F., Ex-, M., Igarashi, P. & Immunocy-, P. S. A.** (1992) 'Immunocytochemical of Na⁺/H⁺ exchanger characterization isoform NHE-1 in rabbit kidney'. *American Physiology Society*, 92,
- Bookbinder, L. H., Moy, G. W., Vacquier, V. D.** (1990) 'Identification of sea urchin sperm adenylate cyclase.', *Journal of Cell Biology*, 111, 1859–1866
- Bönigk, W., Altenhofen, W., Müller, F., Dose, A., Illing, M., Molday, R. S. & Kaupp, U. B.** (1993) 'Rod and cone photoreceptor cells express distinct genes for cGMP-gated channels.', *Neuron*, 10, 865-877
- Bönigk, W., Loogen, A., Seifert, R., Kashikar, N., Klemm, C., Krause, E., Hagen, V., Kremmer, E., Strünker, T. & Kaupp, U. B.** (2009) 'An atypical CNG channel activated by a single cGMP molecule controls sperm chemotaxis.', *Science Signaling*, 2
- Boron, W. F. & De Weer, P.** (1976) 'Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO₂, NH₃, and metabolic inhibitors.', *The Journal of General Physiology*, 67, 91-112

- Bos, J. L.** (2003) 'Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research.', *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 10, 733-738
- Brelidze, T. I., Carlson, A. E., Sankaran, B. & Zagotta, W. N.** (2012) 'Structure of the carboxy-terminal region of a KCNH channel', *Nature*, 481, 11648-53
- Brelidze, T. I., Carlson, A. E. & Zagotta, W. N.** (2009) 'Absence of direct cyclic nucleotide modulation of mEAG1 and hERG1 channels revealed with fluorescence and electrophysiological methods', *Journal of Biological Chemistry*, 284, 530-533
- Brelidze, T. I., Gianulis, E. C., DiMaio, F., Trudeau, M. C. & Zagotta, W. N.** (2013) 'Structure of the C-terminal region of an ERG channel and functional implications.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 27989-27997
- Brenker, C.** (2011) Die Rolle von Ionenkanälen in menschlichen Spermien. Dissertation an der *Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*
- Brenker, C., Goodwin, N., Weyand, I., Kashikar, N. D., Naruse, M., Krähling, M., Müller, A., Benjamin Kaupp, U. & Strünker, T.** (2012) 'The CatSper channel: A polymodal chemosensor in human sperm', *EMBO Journal*, 31, 1654-1665
- Brett, C. L., Donowitz, M. & Rao, R.** (2005) 'Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 288, 223-239
- Brett, C. L., Wei, Y., Donowitz, M. & Rao, R.** (2002) 'Human Na⁺/H⁺ exchanger isoform 6 is found in recycling endosomes of cells, not in mitochondria.', *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 282, 1031-41
- Burckhardt, G., Di Sole, F. & Helmle-Kolb, C.** (2002) 'The Na⁺/H⁺ exchanger gene family', *Journal of Nephrology*
- Calinescu, O., Paulino, C., Kuhlbrandt, W. & Fendler, K.** (2014) 'Keeping it simple, transport mechanism and pH regulation in Na⁺/H⁺ exchangers', *Journal of Biological Chemistry*, 289, 13168-13176
- Carlson, A. E., Westenbroek, R. E., Quill, T., Ren, D., Clapham, D. E., Hille, B., Garbers, D. L. & Babcock, D. F.** (2003) 'CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 14864-14868

César-Razquin, A., Snijder, B., Frappier-Brinton, T., Isserlin, R., Gyimesi, G., Bai, X., Reithmeier, R. A., Hepworth, D., Hediger, M. A., Edwards, A. M. & Superti-Furga, G. (2015) 'A Call for Systematic Research on Solute Carriers', *Cell*, 162, 478-487

Chambrey, R., St John, P. L., Eladari, D., Quentin, F., Warnock, D. G., Abrahamson, D. R., Podevin, R. & Paillard, M. (2001) 'Localization and functional characterization of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE4 in rat thick ascending limbs.', *American journal of physiology. Renal Physiology*, 281, 707-717

Chanda, B., Asamoah, O. K., Blunck, R., Roux, B. & Bezanilla, F. (2005) 'Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement.', *Nature*, 436, 852-856

Changeux, J.-P. (2012) 'Allostery and the Monod-Wyman-Changeux Model After 50 Years', *Annual Reviews of Biophysics*, 41, 103-133

Chanroj, S., Wang, G., Venema, K., Zhang, M. W., Delwiche, C. F. & Sze, H. (2012) 'Conserved and Diversified Gene Families of Monovalent Cation/H⁺ Antiporters from Algae to Flowering Plants', *Frontiers in Plant Science*, 3, 1-18

Chen, S.-R., Chen, M., Deng, S.-L., Hao, X.-X., Wang, X.-X. & Liu, Y.-X. (2016) 'Sodium-hydrogen exchanger NHA1 and NHA2 control sperm motility and male fertility', *Cell Death and Disease*, 7

Chen, Y., Cann, M. J., Litvin, T. N., Iourgenko, V., Sinclair, M. L., Levin, L. R. & Buck, J. (2000) 'Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor.', *Science*, 289, 625-628

Chintapalli, V. R., Wang, J., Herzyk, P., Davies, S. A. & Dow, J. A. T. (2013) 'Data-mining the FlyAtlas online resource to identify core functional motifs across transporting epithelia.', *BMC Genomics*, 14, 518

Chung, J.-J., Navarro, B., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. & Clapham, D. E. (2011) 'A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa.', *Nature Communications*, 2, 153

Chung, J. J., Miki, K., Kim, D., Shim, S. H., Shi, H. F., Hwang, J. Y., Cai, X., Iseri, Y., Zhuang, X. & Clapham, D. E. (2017) 'Catsper γ regulates the structural continuity of sperm Ca²⁺ signaling domains and is required for normal fertility', *eLife*, 6, 1-25

Clayton, G. M., Altieri, S., Heginbotham, L., Unger, V. M. & Morais-Cabral, J. H. (2008) 'Structure of the transmembrane regions of a bacterial cyclic nucleotide-regulated channel', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 615-627

Clayton, G. M., Silverman, W. R., Heginbotham, L. & Morais-Cabral, J. H. (2004) 'Structural basis of ligand activation in a cyclic nucleotide regulated potassium channel', *Cell*, 119, 1511-1515

Cook, S. P. & Babcock, D. F. (1993) 'Activation of Ca^{2+} permeability by cAMP is coordinated through the pH_i increase induced by speract.', *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 585-589

Cook, W. H., Lipkin, D. & Markham, R. (1957) 'The Formation of a cyclic Dianhydrodiadenylic Acid (I) by the Alkaline Degradation of Adenosine-5'-Triphosphoric Acid (II) 1', *Journal of the American Chemical Society*, 79, 22408-22413

Cornish-Bowden, A. (2014) 'Understanding allosteric and cooperative interactions in enzymes', *FEBS Journal*, 281, 621-632

Cossart, P. & Gicquel-Sanzey, B. (1982) 'Cloning and sequence of the crp gene of *Escherichia coli* K12.', *Nucleic acids research*, 10, 1363-1378

Craven, K. B. & Zagotta, W. N. (2004) 'Salt Bridges and Gating in the COOH-terminal Region of HCN2 and CNGA1 Channels', *The Journal of General Physiology*, 124, 375-401

Craven, K. B. & Zagotta, W. N. (2006) 'CNG and HCN Channels: Two Peas, One Pod', *Annual Review of Physiology*, 68, 663-677

Cukkemane, A., Grüter, B., Novak, K., Gensch, T., Bönigk, W., Gerharz, T., Kaupp, U. B. & Seifert, R. (2007) 'Subunits act independently in a cyclic nucleotide-activated K^+ channel', *EMBO Reports*, 8

Cukkemane, A., Seifert, R. & Kaupp, U. B. (2011) 'Cooperative and uncooperative cyclic-nucleotide-gated ion channels', *Trends in Biochemical Sciences*, 36

Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E. C., Tilkins, M. L., Price, P. J. & Ciccarone, V. C. (2004) 'Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications.', *Methods* 33, 95-103

- Dangott, L. J., Jordan, J. E., Bellet, R. A. & Garbers, D. L.** (1989) 'Cloning of the mRNA for the protein that crosslinks to the egg peptide speract', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 2128-2132
- Day, J. P., Wan, S., Allan, A. K., Kean, L., Davies, S. a, Gray, J. V & Dow, J. a T.** (2008) 'Identification of two partners from the bacterial Kef exchanger family for the apical plasma membrane V-ATPase of Metazoa.', *Journal of Cell Science*, 121, 2612-2619
- DeCoursey, T. E. & Cherny, V. V** (1995) 'Voltage-activated proton currents in membrane patches of rat alveolar epithelial cells.', *The Journal of Physiology*, 489, 299-307
- Dhallan, R. S., Yau, K. W., Schrader, K. A. & Reed, R. R.** (1990) 'Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons.', *Nature*, 347, 184-187
- Dibrov, P., Rimon, A., Dzioba, J., Winogrodzki, A., Shalitin, Y. & Padan, E.** (2005) '2-Aminoperimidine, a specific inhibitor of bacterial NhaA Na⁺/H⁺ antiporters.', *FEBS letters*, 579, 373-378
- DiFrancesco, D.** (1986) 'Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells.', *Nature*, 324, 470-473
- DiFrancesco, D.** (1991) 'The contribution of the "pacemaker" current (i_f) to generation of spontaneous activity in rabbit sino-atrial node myocytes.', *The Journal of Physiology*, 434, 470-473
- DiFrancesco, D., Ferroni, A., Mazzanti, M. & Tromba, C.** (1986) 'Properties of the hyperpolarizing-activated current (i_f) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node.', *The Journal of Physiology*, 377, 61-88
- DiFrancesco, D. & Tortora, P.** (1991) 'Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP', *Nature*, 351, 145
- Diller, T. C., Madhusudan, Xuong, N. H. & Taylor, S. S.** (2001) 'Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: crystal structure of the type II beta regulatory subunit.', *Structure*, 9, 73-82
- Donowitz, M., Tse, C. M. & Fuster, D.** (2013) 'SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na⁺/H⁺ exchangers', *Molecular Aspects in Medicine*, 34, 1638-1646

- Ebner, T. J. & Chen, G.** (1995) 'Use of voltage-sensitive dyes and optical recordings in the central nervous system', *Progress in Neurobiology*, 46, 463-506
- Eisner, D., Kenning, N. & O'Neill, S.** (1989) 'A novel method for absolute calibration of intracellular pH indicators', *Pflügers Archiv*, 553-558
- Fechner, S., Alvarez, L., Bönigk, W., Müller, A., Berger, T., Pascal, R., Trötschel, C., Poetsch, A., Stölting, G., Siegfried, K. R., Kremmer, E., Seifert, R. & Kaupp, U. B.** (2015) 'A K⁺ selective CNG channel orchestrates Ca²⁺ signalling in zebrafish sperm', *eLife*, 4, 1-25
- Forrest, L. R. & Rudnick, G.** (2009) 'The Rocking Bundle: A Mechanism for Ion-Coupled Solute Flux by Symmetrical Transporters', *Physiology*, 24, 377-386
- Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D. A., Engel, A. & Palczewski, K.** (2003) 'Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes.', *Nature*, 421, 127-128
- Frings, S., Brüll, N., Dzeja, C., Angele, a, Hagen, V., Kaupp, U. B. & Baumann, A.** (1998) 'Characterization of ether-à-go-go channels present in photoreceptors reveals similarity to IK_x, a K⁺ current in rod inner segments.', *The Journal of General Physiology*, 111, 510-519
- Furrer, E. M., Ronchetti, M. F., Verrey, F. & Pos, K. M.** (2007) 'Functional characterization of a NapA Na⁺/H⁺ antiporter from *Thermus thermophilus*', *FEBS Letters*, 581, 572-578
- Fuster, D., Moe, O. W., Hilgemann, D. W.,** (2008) 'Steady-state function of the ubiquitous mammalian Na/H exchanger (NHE1) in relation to dimer coupling models with 2Na/2H stoichiometry', *The Journal of General Physiology*, 132, 465-480
- Gadsby, D.C.,** (2009). 'Ion channels versus ion pumps : the principal difference, in principle', *Nature Review*, 10, 344–352
- Garlid, K. D., Sun, X., Paucek, P. & Woldegiorgis, G.** (1995) 'Mitochondrial cation transport systems.', *Methods in Enzymology*, 260, 331-348
- Gauss, R., Seifert, R. & Kaupp, U. B.** (1998) 'Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm.', *Nature*, 393, 583-587
- Gerstner, A., Zong, X., Hofmann, F. & Biel, M.** (2000) 'Molecular cloning and functional characterization of a new modulatory cyclic nucleotide-gated channel subunit from mouse retina.', *The Journal of Neuroscience*, 20, 1324-1332

- Goldberg, E. B., Arbel, T., Chen, J. I. E., Karpelt, R. & Mackie, G. A.** (1987) 'Characterization of a Na^+/H^+ antiporter gene of *Escherichia coli*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 2615-2619
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. M.** (1949) 'Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.', *The Journal of Biological Chemistry*, 177, 751-766
- Goswami, P., Paulino, C., Hizlan, D., Vonck, J., Yildiz, O. & Kühlbrandt, W.** (2011) 'Structure of the archaeal Na^+/H^+ antiporter NhaP1 and functional role of transmembrane helix 1.', *EMBO journal*, 30, 439-449
- Goyal, S., Vanden Heuvel, G. & Aronson, P. S.** (2003) 'Renal expression of novel Na^+/H^+ exchanger isoform NHE8.', *American Journal of Physiology. Renal physiology*, 284, 467-473
- Grant, A. O.** (2009) 'Basic Science for the Clinical Electrophysiologist Cardiac Ion Channels', *American Heart Association*, 2, 185-194
- Green, J., Yamaguchi, D.T., Kleeman, C.R. & Muallem S.** (1988) 'Cytosolic pH regulation in osteoblasts. Interaction of Na^+ and H^+ with the extracellular and intracellular faces of the Na^+/H^+ exchanger. *Journal of General Physiology*, 92, 239-261
- Grinstein, S., Rotin, D. & Mason, M. J.** (1989) ' Na^+/H^+ exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes . Role in cellular proliferation', *Biochimica et Biophysica Acta*, 988, 4157
- Gunaratne, H. J., Neill, A. T. & Vacquier, V. D.** (2006) 'Plasma membrane calcium ATPase is concentrated in the head of sea urchin spermatozoa.', *Journal of Cellular Physiology*, 207, 413-419
- Gunaratne, H. J. & Vacquier, V. D.** (2006) 'Cloning of a sea urchin sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase.', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339, 443-449
- Gunkel, M., Schöneberg, J., Alkhaldi, W., Irsen, S., Noé, F., Kaupp, U. B. & Al-Amoudi, A.** (2015) 'Higher-order architecture of rhodopsin in intact photoreceptors and its implication for phototransduction kinetics.', *Structure*, 23, 628-638
- Gustina, A. S. & Trudeau, M. C.** (2012) 'HERG potassium channel regulation by the N-terminal eag domain', *Cellular Signalling*, 24, 1592-1598

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. (1981) 'Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches', *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 391, 85-100

Hansbrough, J. R. & Garbers, D. L. (1981) 'Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa.', *Journal of Biological Chemistry*, 256, 1447-1452

Harzheim, D., Pfeiffer, K. H., Fabritz, L., Kremmer, E., Buch, T., Waisman, A., Kirchhof, P., Kaupp, U. B. & Seifert, R. (2008) 'Cardiac pacemaker function of HCN4 channels in mice is confined to embryonic development and requires cyclic AMP.', *EMBO Journal*, 27, 692-703

Hediger, M. A., Clemençon, B., Burrier, R. E. & Bruford, E. A. (2013) 'The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction.', *Molecular Aspects of Medicine*, 34, 95-107

Hellmer, J., Pätzold, R. & Zeilinger, C. (2002) 'Identification of a pH regulated Na⁺/H⁺ antiporter of *Methanococcus jannaschii*', *FEBS Letters*, 527, 245-249

Hellmer, J., Teubner, A. & Zeilinger, C. (2003) 'Conserved arginine and aspartate residues are critical for function of MjNhaP1, a Na⁺/H⁺ antiporter of *M. jannaschii*', *FEBS Letters*, 542, 32-36

Hildebrandt, J. D., Tash, J. S., Kirchick, H. J., Lipschunits, L., Secra, R. D., & Birnbaumer, L. (1985) *Endocrinology* 116, 1357-1366

Hille, B. (1978) 'Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches.', *Biophysical Journal*, 22, 283-294

Hirschberg, B., Rovner, a, Lieberman, M. & Patlak, J. (1995) 'Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na⁺ channels.', *The Journal of General Physiology*, 106, 1053-1068

Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952) 'A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.', *The Journal of physiology*, 117

Höglund, P. J., Nordström, K. J. V, Schiöth, H. B. & Fredriksson, R. (2011) 'The Solute Carrier Families Have a Remarkably Long Evolutionary History with the Majority of the Human Families Present before Divergence of Bilaterian Species', *Molecular Biology and Evolution*, 28, 1531-1541

Holmgren, M., Wagg, J., Bezanilla, F., Rakowski, R. F., De Weer, P. & Gadsby, D. C. (2000) 'Three distinct and sequential steps in the release of sodium ions by the Na⁺/K⁺-ATPase.', *Nature*, 403, 989-901

Hoogerwerf, W. A., Tsao, S. C., Devuyst, O., Levine, S. A., Yun, C. H., Yip, J. W., Cohen, M. E., Wilson, P. D., Lazenby, A. J., Tse, C. M. & Donowitz, M. (1996) 'NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins.', *The American Journal of Physiology*, 270, 29-41

Hunte, C., Screpanti, E., Venturi, M., Rimon, A., Padan, E. & Michel, H. (2005) 'Structure of a Na⁺/H⁺ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH.', *Nature*, 435, 1197-1202

Hwang, I. K., Yoo, K. Y., An, S. J., Li, H., Lee, C. H., Choi, J. H., Lee, J. Y., Lee, B. H., Kim, Y. M., Kwon, Y. G. & Won, M. H. (2008) 'Late expression of Na⁺/H⁺ exchanger 1 (NHE1) and neuroprotective effects of NHE inhibitor in the gerbil hippocampal CA1 region induced by transient ischemia', *Experimental Neurology*, 212, 314-323

Jacobsen, C., Kragh-hansen, U. & Sheikh, M. I. (1986) 'Na⁺/H⁺ exchange in luminal-membrane vesicles from rabbit proximal convoluted and straight tubules in response to metabolic acidosis', *Biochemical Journal*, 239, 411-416

Jaiswal, B. S. & Conti, M. (2003) 'Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 10676-10681

James, Z. M., Borst, A. J., Haitin, Y., Frenz, B., DiMaio, F., Zagotta, W. N. & Veesler, D. (2017) 'CryoEM structure of a prokaryotic cyclic nucleotide-gated ion channel', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, 4430-4435

Jardetzky, O. (1966) 'Simple allosteric model for membrane pumps.', *Nature*, 211, 969-970

Jentsch, T.J., Steinmeyer, K. & Schwarz, G., (1990) 'Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in Xenopus oocytes', *Nature*, 348, 510-514.

Jikeli, J. F., Alvarez, L., Friedrich, B. M., Wilson, L. G., Pascal, R., Colin, R., Pichlo, M., Rennhack, A., Brenker, C. & Kaupp, U. B. (2015) 'Sperm navigation along helical paths in 3D chemoattractant landscapes', *Nature Communications*, 6, 7985

- Johnson, J. P. & Zagotta, W. N.** (2005) 'The carboxyl-terminal region of cyclic nucleotide-modulated channels is a gating ring, not a permeation path.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 677-705
- Johnson, K. A.** (1986) 'Rapid kinetic analysis of mechanochemical adenosinetriphosphatases', *Methods in Enzymology*, 134, 677-705
- Jones, W. J., Leigh, J. A., Mayer, F., Woese, C. R. & Wolfe, R. S.** (1983) 'Methanococcus jannaschii sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent', *Archives of Microbiology*, 136, 254-261
- Kashikar, N. D., Alvarez, L., Seifert, R., Gregor, I., Jäckle, O., Beyermann, M., Krause, E. & Kaupp, U. B.** (2012) 'Temporal sampling, resetting, and adaptation orchestrate gradient sensing in sperm.', *The Journal of Cell Biology*, 198, 1075-1091
- Kaupp, B. & Seifert, R.** (2001) 'Molecular Diversity of Pacemaker Ion Channels', *Annual Review of Physiology*, 63, 235-257
- Kaupp, U. B. & Alvarez, L.** (2016) 'Sperm as microswimmers - navigation and sensing at the physical limit', *European Physical Journal: Special Topics*, 225
- Kaupp, U. B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bönigk, W., Stuhmer, W., Cook, N. J., Kangawa, K., Matsuo, H. & Hirose, T.** (1989) 'Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel.', *Nature*, 342, 762-766
- Kaupp, U. B. & Seifert, R.** (2002) 'Cyclic nucleotide-gated ion channels.', *Physiological reviews*, 82, 769-824
- Kaupp, U. B., Solzin, J., Hildebrand, E., Brown, J. E., Helbig, A., Hagen, V., Beyermann, M., Pampaloni, F. & Weyand, I.** (2003) 'The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm', *Nature Cell Biology*, 5
- Kaupp, U. B. & Strünker, T.** (2016) 'Signaling in Sperm: More Different than Similar', *Trends in Cell Biology*
- Kawasaki, H., Springett, G. M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D. E. & Graybiel, A. M.** (1998) 'A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1.', *Science*, 282, 2275-2279

Kesters, D., Brams, M., Nys, M., Wijckmans, E., Spurny, R., Voets, T., Tytgat, J., Kusch, J. & Ulens, C. (2015) 'Structure of the SthK carboxy-terminal region reveals a gating mechanism for cyclic nucleotide-modulated ion channels', *PLoS ONE*, 10, 1-12

Kim, C., Xuong, N.-H. & Taylor, S. S. (2005) 'Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RI α) subunits of PKA.', *Science*, 307, 690-696

Kimura, K., Wakamatsu, A., Suzuki, Y., Ota, T., Nishikawa, T., Yamashita, R., Yamamoto, J., Sekine, M., Tsuritani, K., Wakaguri, H., Ishii, S., Sugiyama, T., Saito, K., Isono, Y., Irie, R., Kushida, N., Yoneyama, T., Otsuka, R., Kanda, K., Yokoi, T., Kondo, H., Wagatsuma, M., Murakawa, K., Ishida, S., Ishibashi, T., Takahashi-Fujii, A., Tanase, T., Nagai, K., Kikuchi, H., Nakai, K., Isogai, T. & Sugano, S. (2006) 'Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes.', *Genome Research*, 16, 55-65

Kirichok, Y. & Lishko, P. V. (2011) 'Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique.', *Molecular Human Reproduction*, 17, 487-499

Kleinboelting, S., Diaz, A., Moniot, S., van den Heuvel, J., Weyand, M., Levin, L. R., Buck, J. & Steegborn, C. (2014) 'Crystal structures of human soluble adenylyl cyclase reveal mechanisms of catalysis and of its activation through bicarbonate', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 3727-3732

Kondapalli, K. C., Kallay, L. M., Muszelik, M. & Rao, R. (2012) 'Unconventional chemiosmotic coupling of NHA2, a mammalian Na⁺/H⁺ antiporter, to a plasma membrane H⁺ gradient.', *The Journal of Biological Chemistry*, 287

Körschen, H. G., Illing, M., Seifert, R., Sesti, F., Williams, A., Gotzes, S., Colville, C., Muller, F., Dose, A. & Godde, M. (1995) 'A 240 kDa protein represents the complete beta subunit of the cyclic nucleotide-gated channel from rod photoreceptor.', *Neuron*, 15, 627-636

Köster, S., Pavkov-Keller, T., Kühlbrandt, W. & Yildiz, O. (2011) 'Structure of human Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 regulatory region in complex with calmodulin and Ca²⁺', *Journal of Biological Chemistry*, 286, 40954-40961

Kuwabara, N., Inoue, H., Tsuboi, Y., Nakamura, N. & Kanazawa, H. (2004) 'The fourth transmembrane domain of the *Helicobacter pylori* Na⁺/H⁺ antiporter NhaA faces a water-filled channel required for ion transport', *Journal of Biological Chemistry*, 279, 40567-40575

- Kyte, J. & Doolittle, R. F.** (1982) 'A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.', *Journal of Molecular Biology*, 157, 105-132
- Laemmli, U. K.** (1970): (1970) 'Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4', *Nature*, 227
- Lai, H. C., Grabe, M., Yuh, N. J. & Lily, Y. J.** (2005) 'The S4 voltage sensor packs against the pore domain in the KAT1 voltage-gated potassium channel', *Neuron*, 47, 395-406
- Lamy, C. M. & Chatton, J. Y.** (2011) 'Optical probing of sodium dynamics in neurons and astrocytes', *NeuroImage*, 58, 572-578
- Larsson, H., Baker, O., Dhillon, D. & Isacoff, E.** (1996) 'Transmembrane Movement of the K Channel S4', *Neuron*, 16, 387-397
- Last, N.B. & Miller, C.** (2015) 'Functional Monomerization of a ClC-Type Fluoride Transporter.', *Journal of Molecular Biology*, 427, 3607-3612
- Latorre, R., Olcese, R., Basso, C., Gonzalez, C., Muñoz, F., Cosmelli, D. & Alvarez, O.** (2003) 'Molecular Coupling between Voltage Sensor and Pore Opening in the *Arabidopsis* Inward Rectifier K⁺ Channel KAT1', *The Journal of General Physiology*, 122, 459-469
- Lee, B. L., Sykes, B. D. & Fliegel, L.** (2013) 'Structural and functional insights into the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger.', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 61, 573-577
- Lee, C.-H. & MacKinnon, R.** (2017) 'Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel', *Cell*, 168, 111-120
- Lee, C., Kang, H. J., von Ballmoos, C., Newstead, S., Uzdaviny, P., Dotson, D. L., Iwata, S., Beckstein, O., Cameron, A. D. & Drew, D.** (2013) 'A two-domain elevator mechanism for sodium/proton antiport', *Nature*, 501, 60-67
- Lee, H. C.** (1984a) 'A membrane potential-sensitive Na⁺/H⁺ exchange system in flagella isolated from sea urchin spermatozoa.', *The Journal of Biological Chemistry*, 259, 15315-9
- Lee, H. C.** (1984b) 'Sodium and proton transport in flagella isolated from sea urchin spermatozoa', *Journal of Biological Chemistry*, 259, 4957-4963
- Lee, H. C. & Garbers, D. L.** (1986) 'Modulation of the voltage-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide speract.', *The Journal of biological chemistry*, 261, 16026-32

- Lee, M. G., Ohana, E., Park, H. W., Yang, D. & Muallem, S.** (2012) 'Molecular Mechanism of Pancreatic and Salivary Gland Fluid and HCO₃⁻ Secretion', *Physiological Reviews*, 92, 39-74
- Levin, E. J., Quick, M. & Zhou, M.** (2009) 'Crystal structure of a bacterial homolog of the kidney urea transporter', *Nature*, 462, 757-761
- Levine, S. A., Montrose, M. H., Tse, C. M. & Donowitz, M.** (1993) 'Kinetics and regulation of three cloned mammalian Na⁺/H⁺ exchangers stably expressed in a fibroblast cell line', *Journal of Biological Chemistry*, 268, 25527-25535
- Li, M., Zhou, X., Wang, S., Michailidis, I., Gong, Y., Su, D., Li, H., Li, X. & Yang, J.** (2017) 'Structure of a eukaryotic cyclic-nucleotide-gated channel', *Nature*, 542, 60-65
- Li, Q., Ng, H. Q., Yoon, H. S. & Kang, C.** (2014) 'Insight into the molecular interaction between the cyclic nucleotide-binding homology domain and the eag domain of the hERG channel.', *FEBS letters*, 588, 2782-2788
- Li, Q., Wanderling, S., Paduch, M., Medovoy, D., Singharoy, A., McGreevy, R., Villalba-Galea, C. a, Hulse, R. E., Roux, B., Schulten, K., Kossiakoff, A. & Perozo, E.** (2014) 'Structural mechanism of voltage-dependent gating in an isolated voltage-sensing domain', *Nature Structural & Molecular Biology*
- Lillie, F.** (1912) 'The production of sperm iso-agglutinins by ova', *Science*, 18, 527-530
- Liman, E. R., Hess, P., Weaver, F. & Koren, G.** (1991) 'Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K⁺ channel.', *Nature*, 353, 752-756
- Lincoln, T. M., Dey, N. & Sellak, H.** (2001) 'Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression.', *Journal of Applied Physiology* 91, 1421-1430.
- Lipkin, D., Cook, W. H. & Markham, R.** (1959) 'Adenosine-3': 5'-phosphoric Acid: A Proof of Structure¹', *Journal of the American Chemical Society*, 81, 6198-6103
- Lishko, P. V. & Kirichok, Y.** (2010) 'The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation', *The Journal of Physiology*, 588, 453-475
- Lishko, P. V., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J.-J. & Clapham, D. E.** (2012) 'The Control of Male Fertility by Spermatozoan Ion Channels', *Annual Review of Physiology*,

74, 4667-4672

Liu, J., Xia, J., Cho, K.-H., Clapham, D. E. & Ren, D. (2007) 'CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex.', *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 18945-18952

Llano, I., Webb, C. K. & Bezanilla, F. (1988) 'Potassium Conductance of the Squid Giant Axon Single-Channel Studies', *Journal of General Physiology*, 92

Long, S. B., Campbell, E. B. & Mackinnon, R. (2005) 'Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel', *Science*, 897, 376-382

Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. (2007) 'Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment.', *Nature*, 450, 897-903

Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F. & Biel, M. (1998) 'A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels', *Nature*, 393, 587

Ludwig, J., Terlau, H., Wunder, F., Brüggemann, A., Pardo, L. A., Marquardt, A., Stühmer, W. & Pongs, O. (1994) 'Functional expression of a rat homologue of the voltage gated ether á go-go potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the *Drosophila* channel and its mammalian counterpart', *EMBO Journal*, 13

Maes, M., Rimon, A., Magrisso, L. K.- & Friedler, A. (2012) 'Revealing the Ligand Binding Site of NhaA Na⁺/H⁺ Antiporter and its pH Dependence', *Journal for Biological Chemistry*, 2, 1-18

Männikkö, R., Elinder, F. & Larsson, H. P. (2002) 'Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages.', *Nature*, 419, 837-841

Marques-Carvalho, M. J. & Morais-Cabral, J. H. (2012) 'Crystallization and preliminary X-ray crystallographic characterization of a cyclic nucleotide-binding homology domain from the mouse EAG potassium channel', *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 68, 34-46

Marques-Carvalho, M. J., Sahoo, N., Muskett, F. W., Vieira-Pires, R. S., Gabant, G., Cadene, M., Schönherr, R. & Morais-Cabral, J. H. (2012) 'Structural, biochemical, and functional characterization of the cyclic nucleotide binding homology domain from the mouse EAG1 potassium channel', *Journal of Molecular Biology*, 423, 337-339

- Maser, P.** (2001) 'Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of Arabidopsis', *Plant Physiology*, 126, 1646-1667
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L. & Guthrie, P. B.** (1984) 'Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones.', *Nature*, 309, 261-263
- McKay, D. B. & Steitz, T. A.** (1981) 'Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA.', *Nature*, 290, 744-749
- Mihaila, R. G.** (2015) 'A minireview on NHE1 inhibitors. A rediscovered hope in oncohematology', *Biomedical Papers*, 159, 519-526
- Miller, C.** (2006) 'ClC chloride channels viewed through a transporter lens.', *Nature*, 440, 484-489
- Miller, C. & White, M.M.**, (1984) 'Dimeric structure of single chloride channels from Torpedo electroplax', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 2772-2775
- Miyazaki, E., Sakaguchi, M., Wakabayashi, S., Shigekawa, M. & Mihara, K.** (2001) 'NHE6 protein possesses a signal peptide destined for endoplasmic reticulum membrane and localizes in secretory organelles of the cell.', *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 49221-49227
- Mochizuki-oda, N. & Oosawa, F.** (1985) 'Amiloride-Sensitive Na^+/H^+ Antiporter in *Escherichia coli*', 163
- Monod, J., Changeux, J.-P., & Jacob, F.** (1963) 'Allosteric proteins and cellular control systems', *Journal of Molecular Biology*, 4, 306-329
- Mukherjee, S., Jansen, V., Jikeli, J. F., Hamzeh, H., Alvarez, L., Dombrowski, M., Balbach, M., Strünker, T., Seifert, R., Kaupp, U. B. & Wachten, D.** (2016) 'A novel biosensor to study camp dynamics in cilia and flagella', *eLife*, 5, 1-27
- Murata, Y., Iwasaki, H., Sasaki, M., Inaba, K. & Okamura, Y.** (2005) 'Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor.', *Nature*, 435, 1239-1243
- Murer, B. H., Hopfer, U. & Kinne, R.** (1976) 'Sodium / Proton Antiport in Brush-Border-Membrane Vesicles Isolated from Rat Small Intestine and Kidney', *Biochemical Journal*, 154, 597-604

- Musset, B. & Decoursey, T.** (2012) 'Biophysical properties of the voltage gated proton channel H_v1.', *Wiley interdisciplinary reviews. Membrane transport and signaling*, 1, 605-620
- Nakamura, N., Tanaka, S., Teko, Y., Mitsui, K. & Kanazawa, H.** (2005) 'Four Na⁺/H⁺ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation.', *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 1561-1572
- Nakao, M. & Gadsby, D. C.** (1986) 'Voltage dependence of Na translocation by the Na/K pump.', *Nature*, 323, 628-632
- Navarro, B., Kirichok, Y., Chung, J.-J. & Clapham, D. E.** (2008) 'Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa.', *The International journal of developmental biology*. Spain, 52, 7688-7692
- Neher, E. & Sakmann, B.** (1976) 'Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres.', *Nature*, 260, 799-802
- Neumann, E.** (1978) 'Asymmetric displacement currents in giant axons and macromolecular gating processes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75, 4911-4915
- Noceti, F., Baldelli, P., Wei, X., Qin, N., Toro, L., Birnbaumer, L. & Stefani, E.** (1996) 'Effective gating charges per channel in voltage-dependent K⁺ and Ca²⁺ channels.', *The Journal of general physiology*, 108
- Nomura, M., Beltrán, C., Darszon, A. & Vacquier, V. D.** (2005) 'A soluble adenylyl cyclase from sea urchin spermatozoa.', *Gene*, 353, 231-238
- Nomura, M. & Vacquier, V. D.** (2006) 'Proteins associated with soluble adenylyl cyclase in sea urchin sperm flagella.', *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 63, 582-590
- Nowak, L., Bregestovski, P., Asher, P., Herbet, A. & Prochiantz, A.** (1984) 'Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons', *Nature*, 307, 462-465
- Numata, M. & Orlowski, J.** (2001) 'Molecular cloning and characterization of a novel (Na⁺,K⁺)/H⁺ exchanger localized to the trans-Golgi network.', *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 17387-17394
- Numberger, M. & A. D.** (1996) 'Patch-Clamp-Technik', *Spektrum Akademischer Verlag*.

- Oduru, S., Campbell, J. L., Karri, S. T., Hendry, W. J., Khan, S. A. & Williams, S. C.** (2003) 'Gene discovery in the hamster: A comparative genomics approach for gene annotation by sequencing of hamster testis cDNAs', *BMC Genomics*, 4
- Orlowski, J.** (1993) 'Heterologous expression and functional properties of amiloride high affinity (NHE-1) and low Affinity (NHE-3) Isoforms of the Rat Na/H Exchanger', *Journal of Biological Chemistry*, 268, 549-565
- Orlowski, J. & Grinstein, S.** (2004) 'Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family.', *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 447, 483-492
- Orlowski, J. & Grinstein, S.** (2007) 'Emerging roles of alkali cation/proton exchangers in organellar homeostasis', *Current Opinion in Cell Biology*, 19, 459-469
- Otsu, K., Kinsella, J., Sacktor, B., & Froehlich J.P.** (1989) 'Transient state kinetic evidence for an oligomer in the mechanism of Na^+ - H^+ exchange', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 4818-4822
- Padan, E.** (2008) 'The enlightening encounter between structure and function in the NhaA Na^+/H^+ antiporter.', *Trends in biochemical sciences*, 33, 435-443
- Padan, E., Maisler, N., Taglicht, D., Karpels, R. & Schuldiner, S.** (1989) 'Deletion of ant in Escherichia coli Reveals Its Function in Adaptation to High Salinity and an Alternative Na^+/H^+ Antiporter System', 264, 20297-20302
- Papazian, D. M., Shao, X. M., Seoh, S., Mock, A. F., Huang, Y. & Wainstock, D. H.** (1995) 'Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K^+ channel', *Neuron*, 14, 1293-1301
- Park, E., Campbell, E.B. & MacKinnon, R.,** (2016). 'Structure of a CLC chloride ion channel by cryo-electron microscopy', *Nature*, 541, 500–505
- Paulino, C. & Kühlbrandt, W.** (2014) 'pH- and sodium-induced changes in a sodium/proton antiporter', *eLife*, 3, 1-13
- Paulino, C., Wöhlert, D., Kapotova, E., Yildiz, Ö. & Kühlbrandt, W.** (2014) 'Structure and transport mechanism of the sodium/proton antiporter MjNhaP1', *eLife*, 3

- Pedersen, S. F., King, S. A., Nygaard, E. B., Rigor, R. R. & Cala, P. M.** (2007) 'NHE1 inhibition by amiloride- and benzoylguanidine-type compounds: Inhibitor binding loci deduced from chimeras of NHE1 homologues with endogenous differences in inhibitor sensitivity', *Journal of Biological Chemistry*, 282, 19716-19727
- Peng, C., Rich, E. D. & Varnum, M. D.** (2004) 'Subunit configuration of heteromeric cone cyclic nucleotide-gated channels', *Neuron*, 42, 401-410
- Perozo, E., Santacruz-Tolosa, L., Stefani, E., Bezanilla, F. & Papazian, D. M.** (1994) 'S4 mutations alter gating currents of Shaker K channels.', *Biophysical Journal*, 66, 345-354
- Peti-Peterdi, J., Chambrey, R., Bebok, Z., Biemesderfer, D., St John, P. L., Abrahamson, D. R., Warnock, D. G. & Bell, P. D.** (2000) 'Macula densa Na^+/H^+ exchange activities mediated by apical NHE2 and basolateral NHE4 isoforms.', *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 278, 452-463
- Pichlo, M., Bungert-plümke, S., Weyand, I., Seifert, R., Bönigk, W., Strünker, T., Kashikar, N. D., Goodwin, N., Müller, A., Pelzer, P., Van, Q., Enderlein, J., Klemm, C., Krause, E., Trötschel, C., Poetsch, A., Kremmer, E. & Kaupp, U. B.** (2014) 'High density and ligand affinity confer ultrasensitive signal detection by a guanylyl cyclase chemoreceptor'. *Journal of Cell Biology*, 206
- Pizzonia, J. H., Biemesderfer, D., Abu-Alfa, A. K., Wu, M. S., Exner, M., Isenring, P., Igarashi, P. & Aronson, P. S.** (1998) 'Immunochemical characterization of Na^+/H^+ exchanger isoform NHE4.', *The American Journal of Physiology*, 275, 510-517
- Potter, L. R.** (2011) 'Guanylyl cyclase structure, function and regulation', *Cell Signal.*, 23, 1921-1926
- Pouysségur, J., Sardet, C., Franchi, A., L'allemain, G. & Paris, S.** (1984) 'A specific mutation abolishing Na^+/H^+ antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH', *Cell Biology*, 81, 4833-4837
- Purves, D., Augustine, G. & Fitzpatrick, D.** (2001) *Ion Channels Underlying Action Potentials - Neuroscience - NCBI Bookshelf, Neuroscience*
- Rall, T. W., Berthet, J. & Sutherland, E. W.** (1957) 'The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates.', *The Journal of Biological Chemistry*, 224, 463-475

Rehmann, H., Das, J., Knipscheer, P., Wittinghofer, A. & Bos, J. L. (2006) 'Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state.', *Nature*, 439, 23508-23514

Rehmann, H., Prakash, B., Wolf, E., Rueppel, A., de Rooij, J., Bos, J. L. & Wittinghofer, A. (2003) 'Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2', *Nature Structural Biology*, 10, 38548-38556

Rehmann, H., Rueppel, A., Bos, J. L. & Wittinghofer, A. (2003) 'Communication between the regulatory and the catalytic region of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac.', *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 625-628

Rehmann, H., Schwede, F., Doskeland, S. O., Wittinghofer, A. & Bos, J. L. (2003) 'Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac.', *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 23548-23557

Rimon, A., Kozachkov-Magrisso, L. & Padan, E. (2012) 'The unwound portion dividing helix iv of nhaa undergoes a conformational change at physiological pH and lines the cation passage', *Biochemistry*, 51, 9560-9569

Robertson, G. A., Warmke, J. M. & Ganetzky, B. (1996) 'Potassium currents expressed from *Drosophila* and mouse eag cDNAs in *Xenopus* oocytes.', *Neuropharmacology*, 35, 841-850

Rocha, M. A., Crockett, D. P., Wong, L.-Y., Richardson, J. R. & Sonsalla, P. K. (2008) 'Na⁺/H⁺ exchanger inhibition modifies dopamine neurotransmission during normal and metabolic stress conditions', *Journal of Neurochemistry*, 106, 231-241

de Rooij, J., Zwartkruis, F. J., Verheijen, M. H., Cool, R. H., Nijman, S. M., Wittinghofer, A. & Bos, J. L. (1998) 'Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP.', *Nature*, 396, 474-477

Ruiz, M. L. & Karpen, J. W. (1997) 'Single cyclic nucleotide-gated channels locked in different ligand-bound states.', *Nature*, 389, 389-392

Saier, M. H., Reddy, V. S., Tamang, D. G. & Västermark, Å. (2014) 'The transporter classification database', *Nucleic Acids Research*, 42, 251-258

Sardet, C., Franchi, A. & Pouyssegur, J. (1989) 'Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter', *Cell*, 56, 271-280

- Sardoy, M. C., Anderson, D. E., George, A., Wilkerson, M. J., Skinner, S. & Ferrer, M. S.** (2012) 'Standardization of a method to detect bovine sperm-bound antisperm antibodies by flow cytometry', *Theriogenology*, 78
- Schachtman, D. P.** (2000) 'Molecular insights into the structure and function of plant K⁺ transport mechanisms', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465, 1654-1658
- Schachtman, D. P., Schroeder, J. I., Lucas, W. J., Anderson, J. A. & Gaber, R. F.** (1992) 'Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA.', *Science*, 258, 127-139
- Scheel, O. et al.**, (2005) 'Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins', *Nature*, 436, 424-427
- Schünke, S., Stoldt, M., Lecher, J., Kaupp, U. B. & Willbold, D.** (2011) 'Structural insights into conformational changes of a cyclic nucleotide-binding domain in solution from *Mesorhizobium loti* K1 channel.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 6121-6126
- Schushan, M., Rimon, A., Haliloglu, T., Forrest, L. R., Padan, E. & Ben-Tal, N.** (2012) 'A model-structure of a periplasm-facing state of the NhaA antiporter suggests the molecular underpinnings of pH-induced conformational changes', *Journal of Biological Chemistry*, 287, 18249-18261
- Seifert, R., Flick, M., Bönigk, W., Alvarez, L., Trötschel, C., Müller, A., Goodwin, N., Pelzer, P., Kashikar, N. D., Jikeli, J., Timmermann, B., Kuhl, H., Fridman, D., Windler, F., Kaupp, U. B. & Strünker, T.** (2014) 'The CatSper channel controls chemosensation in sea urchin sperm', *EMBO Journal*, 1-15
- Seifert, R., Scholten, A., Gauss, R., Mincheva, a, Lichter, P. & Kaupp, U. B.** (1999) 'Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 9391-9396
- Seino, S. & Shibasaki, T.** (2005) 'PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis.', *Physiological Reviews*, 85, 1303-1342

- Seoh, S. A., Sigg, D., Papazian, D. M. & Bezanilla, F.** (1996) 'Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel', *Neuron*, 16, 1159-1167
- Shabb, J. B. & Corbin, J. D.** (1992) 'Cyclic Nucleotide-binding Domains in Proteins Having Diverse Functions', *The Journal of Biological Chemistry*, 267
- Shelley, M.** (1818) *Frankenstein oder Der Moderne Prometheus*.
- Shen, H., Zhou, Q., Pan, X., Li, Z., Wu, J. & Yan, N.** (2017) 'Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution', *Science*, 355, 4326
- Shi, Y.** (2013) 'Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters', *Annual Review of Biophysics*, 42, 51-72
- Singh, S., Lowe, D. G., Thorpe, D. S., Rodriguez, H., Kuang, W. J., Dangott, L. J., Chinkers, M., Goeddel, D. V & Garbers, D. L.** (1988) 'Membrane guanylate cyclase is a cell-surface receptor with homology to protein kinases.', *Nature*, 334, 708-712
- Spring, K.** (1977) 'Kinetics of Na⁺ Transport in Necturus Proximal Tubule', *Journal of General Physiology*, 30, 307-328
- Steggborn, C., Litvin, T. N., Levin, L. R., Buck, J. & Wu, H.** (2005) 'Bicarbonate activation of adenylyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment', *Nature Structural & Molecular Biology*, 12, 32-37
- Stevens, D. R., Seifert, R., Bufe, B., Müller, F., Kremmer, E., Gauss, R., Meyerhof, W., Kaupp, U. B. & Lindemann, B.** (2001) 'Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli.', *Nature*, 413, 631-635
- Stock, C., Ludwig, F. T., Hanley, P. J. & Schwab, A.** (2013) 'Roles of ion transport in control of cell motility.', *Comprehensive Physiology*, 3, 59-119

Strausberg, R. L., Feingold, E. A., Grouse, L. H., Derge, J. G., Klausner, R. D., Collins, F. S., Wagner, L., Shenmen, C. M., Schuler, G. D., Altschul, S. F., Zeeberg, B., Buetow, K. H., Schaefer, C. F., Bhat, N. K., Hopkins, R. F., Jordan, H., Moore, T., Max, S. I., Wang, J., Hsieh, F., Diatchenko, L., Marusina, K., Farmer, A. A., Rubin, G. M., Hong, L., Stapleton, M., Soares, M. B., Bonaldo, M. F., Casavant, T. L., Scheetz, T. E., Brownstein, M. J., Usdin, T. B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Prange, C., Raha, S. S., Loquellano, N. A., Peters, G. J., Abramson, R. D., Mullahy, S. J., Bosak, S. A., McEwan, P. J., McKernan, K. J., Malek, J. A., Gunaratne, P. H., Richards, S., Worley, K. C., Hale, S., Garcia, A. M., Gay, L. J., Hulyk, S. W., Villalon, D. K., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Lu, X., Gibbs, R. A., Fahey, J., Helton, E., Kettelman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A., Whiting, M., Madan, A., Young, A. C., Shevchenko, Y., Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., Touchman, J. W., Green, E. D., Dickson, M. C., Rodriguez, A. C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R. M., Butterfield, Y. S. N., Krzywinski, M. I., Skalska, U., Smailus, D. E., Schnerch, A., Schein, J. E., Jones, S. J. M. & Marra, M. A. (2002) 'Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 16899-16903

Strünker, T., Alvarez, L. & Kaupp, U. B. (2015) 'At the physical limit - chemosensation in sperm', *Current Opinion in Neurobiology*, 110-116

Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R. & Kaupp, U. B. (2011) 'The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm.', *Nature*, 471, 382-386

Strünker, T., Weyand, I., Bönigk, W., Van, Q., Loogen, A., Brown, J. E., Kashikar, N., Hagen, V., Krause, E. & Kaupp, U. B. (2006) 'A K^{+} -selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm.', *Nature cell biology*, 8, 1149-1154

Su, Y.-H. & Vacquier, V. D. (2002) 'A flagellar K^{+} -dependent Na^{+}/Ca^{2+} exchanger keeps Ca^{2+} low in sea urchin spermatozoa.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 6743-6748

Su, Y., Dostmann, W. R., Herberg, F. W., Durick, K., Xuong, N. H., Ten Eyck, L., Taylor, S. S. & Varughese, K. I. (1995) 'Regulatory subunit of protein kinase A: structure of deletion mutant with cAMP binding domains.', *Science*, 269, 807-813.

Sunderman, E. R. & Zagotta, W. N. (1999) 'Sequence of events underlying the allosteric transition of rod cyclic nucleotide-gated channels', *Journal of General Physiology*, 113, 621-640

Sutherland, E. W. & Rall, T. W. (1957) 'The Properties Of An Adenine Ribonucleotide Produced With Cellular Particles, ATP, Mg⁺⁺, And Epinephrine Or Glucagon', *Journal of the American Chemical Society*, 79, 3608

Suzuki, N. & Garbers, D. L. (1984) 'Stimulation of sperm respiration rates by speract and resact at alkaline extracellular pH.', *Biology of reproduction*, 30, 1167-1174

Sze, H., Padmanaban, S., Cellier, F., Honys, D., Cheng, N.- H., Bock, K. W., Conéjéro, G., Li, X., Twell, D., Ward, J. M. & Hirschi, K. D. (2004) 'Expression patterns of a novel AtCHX gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K⁺ homeostasis in pollen development.', *Plant Physiology*, 136, 2532-2547

Taglicht, D., Padan, E. & Schuldiner, S. (1991) 'Overproduction and purification of a functional Na⁺/H⁺ antiporter coded by nhaA from *Escherichia coli*', *Journal of Biological Chemistry*, 266, 11289-11294

Taglicht, D., Padan, E. & Schuldiner, S. (1993) 'Proton-sodium stoichiometry of NhaA, an electrogenic antiporter from *Escherichia coli*', *Journal of Biological Chemistry*, 268, 5382-5387

Takio, K., Smith, S. B., Krebs, E. G., Walsh, K. A. & Titani, K. (1982) 'Primary structure of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 4207-4218

Takio, K., Wade, R. D., Smith, S. B., Krebs, E. G., Walsh, K. A. & Titani, K. (1984) 'Guanosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase, a chimeric protein homologous with two separate protein families.', *Biochemistry*, 23, 2544-2548

Tibbs, G. R., Goulding, E. H. & Siegelbaum, S. A. (1997) 'Allosteric activation and tuning of ligand efficacy in cyclic-nucleotide-gated channels', *Nature*, 386, 612-615

Titani, K., Sasagawa, T., Ericsson, L. H., Kumar, S., Smith, S. B., Krebs, E. G. & Walsh, K. A. (1984) 'Amino acid sequence of the regulatory subunit of bovine type I adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase.', *Biochemistry*, 23, 4193-4199

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) 'Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350-4355

Tse, C. M., Levine, S. A., Yun, C. H., Montrose, M. H., Little, P. J., Pouyssegur, J. & Donowitz, M. (1993) 'Cloning and expression of a rabbit cDNA encoding a serum-activated ethylisopropylamiloride-resistant epithelial Na^+/H^+ exchanger isoform (NHE-2).', *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 11917-11924

Tse, C. M., Levine, S. a, Yun, C. H., Brant, S. R., Pouyssegur, J., Montrose, M. H. & Donowitz, M. (1993) 'Functional characteristics of a cloned epithelial Na^+/H^+ exchanger (NHE3): resistance to amiloride and inhibition by protein kinase C.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 9110-9114

Vaandrager, A. B. & de Jonge, H. R. (1996) 'Signalling by cGMP-dependent protein kinases.', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 157, 23-30.

Varnum, M. D., Black, K. D. & Zagotta, W. N. (1995) 'Molecular mechanism for ligand discrimination of cyclic nucleotide-gated channels', *Neuron*, 15, 619-625

Vasanthi, G. & Krishnaswamy, S. (2002) 'Dipole moment analysis of membrane proteins suggests role in orientation in the membrane', *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 39, 93-100

Wachten, D., Jikeli, J. F. & Kaupp, U. B. (2017) 'Sperm Sensory Signaling', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*

Walsh, D. A., Perkins, J. P. & Krebs, E. G. (1968) 'An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle.', *The Journal of Biological Chemistry*. 243, 3763-3765

Wang, D., Hu, J., Bobulescu, I. A., Quill, T. a, McLeroy, P., Moe, O. W. & Garbers, D. L. (2007) 'A sperm-specific Na^+/H^+ exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC).', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 9325-30

Wang, D., King, S. M., Quill, T. a, Doolittle, L. K. & Garbers, D. L. (2003) 'A new sperm-specific Na^+/H^+ exchanger required for sperm motility and fertility.', *Nature Cell Biology*, 5, 1117-22

- Wang, H., Liu, J., Cho, K.-H. & Ren, D.** (2009) 'A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein.', *Biology of Reproduction*, 81, 539-544
- Wang, Y., Huan, J., Wang, J.** (2009), 'Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel' *Nature*, 462, 467–72
- Wang, J., Chen, S. & Siegelbaum, S. A.** (2001) 'Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions.', *The Journal of General Physiology*, 118, 237-50
- Wang, Z., Orlowski, J. & Shull, G. E.** (1993) 'Primary structure and functional expression of a novel gastrointestinal isoform of the rat Na/H exchanger.', *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 11925–11928
- Ward, G. E., Brokaw, C. J., Garbers, D. L. & Vacquier, V. D.** (1985) 'Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer.', *The Journal of Cell Biology*, 101, 2324–9
- Weber, I. T., Shabb, J. B. & Corbins, J. D.** (1989) 'Predicted Structures of the cGMP Binding Domains of the cGMP-Dependent Protein Kinase : A Key Alanine / Threonine Difference in Evolutionary Divergence of cAMP and cGMP Binding Sites', *Biochemistry*, 6122–6127
- Weber, I. T. & Steitz, T. A.** (1987) 'Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution.', *Journal of Molecular Biology*, 198, 311–326
- West, I.C. & Mitchell, P.** (1974) 'Proton / Sodium Ion Antiport in *Escherichia coli*', *Biochemical Journal*, 144, 87-90
- Windler, F., Bönigk, W., Körschen, H. G., Grahn, E., Strünker, T., Seifert, R., Kaupp, U. B.,** (2018) 'The solute carrier SLC9C1 is a Na⁺/H⁺-exchanger gated by an S4-type voltage sensor and cyclic-nucleotide binding', *Nature Communications*, 9, 2809
- Wöhlert, D., Kühlbrandt, W. & Yildiz, O.** (2014) 'Structure and substrate ion binding in the sodium/proton antiporter PaNhaP.', *eLife*, 3
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Yan, C., Lu, S., Dong, M. & Yan, N.** (2015) 'Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex', *Science*, 350

Xiang, M., Feng, M., Muend, S. & Rao, R. (2007) 'A human Na⁺/H⁺ antiporter sharing evolutionary origins with bacterial NhaA may be a candidate gene for essential hypertension.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 18677-81

Yan, K., Gao, L. N., Cui, Y. L., Zhang, Y. & Zhou, X. (2016) 'The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery (review)', *Molecular Medicine Reports*, 13, 3715-3723

Zagotta, W. N., Hoshi, T. & Aldrich, R. W. (1994) 'Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation.', *The Journal of General Physiology*, 103, 321-362

Zagotta, W. N., Olivier, N. B., Black, K. D., Young, E. C., Olson, R. & Gouaux, E. (2003) 'Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels', *Nature*, 425, 200-205

Zhen, X. G., Xie, C., Yamada, Y., Zhang, Y., Doyle, C. & Yang, J. (2006) 'A single amino acid mutation attenuates rundown of voltage-gated calcium channels', *FEBS Letters*, 580, 5733-5738