

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie
Georg-August-Universität Göttingen



Elektrophysiologische Charakterisierung des mitochondrialen
Porins VDAC1 und des antimikrobiellen Peptids Dermcidin in
lösungsmittelfreien Modellmembranen

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades
„Doctor rerum naturalium“
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Conrad Weichbrodt

aus Lüneburg

Göttingen, 2013

Betreuungsausschuss:

Prof. Dr. Claudia Steinem, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie

Prof. Dr. Jörg Schroeder, Institut für Physikalische Chemie

Mitglieder der Prüfungskommission:

Referentin:

Prof. Dr. Claudia Steinem, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie

Korreferent:

Prof. Dr. Jörg Schroeder, Institut für Physikalische Chemie

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Ulf Diederichsen, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie

Dr. Michael Meinecke, Zentrum für Biochemie und Molekulare Zellbiologie

Prof. Dr. Ralf Ficner, Zentrum für Molekulare Biowissenschaften

Prof. Dr. Kai Tittmann, Zentrum für Molekulare Biowissenschaften

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2013

Meiner Familie

“Yesterday’s weirdness is tomorrow’s reason why.”

Hunter S. Thompson, *The Curse of Lono*

Abstract: Solvent free lipid bilayers were used for the electrophysiological characterization of the most abundant protein of the outer mitochondrial membrane, the isoform 1 of the voltage dependent anion channel (VDAC1), and the antimicrobial peptide Dermcidin. The bilayers were prepared *via* spreading of giant unilamellar vesicles (GUVs) over a single pore in a borosilicate glass surface.

To gain deeper insight in its gating behavior, wild type-VDAC1 as well as two VDAC1 mutants were incorporated into GUVs which then were spread over the aperture. Subsequent analysis of single channels at varying transmembrane potentials U_m revealed the transition between an open conformation with a conductance of $G_o = 4.0$ nS at low potentials and a closed conformation with $G_c = 2.0$ nS in 1 M KCl for $U_m \geq 30$ mV and $U_m \leq -30$ mV for all VDAC1 variants. This gating between the main VDAC1 states with low transition rates of $k_{mg} = 0.1-2$ s⁻¹ did not necessarily occur at high transmembrane potentials as the open probability P_o did not fall below 90 % even at $U_m \geq 30$ mV on a single channel level. Furthermore, a VDAC1 mutant with three additional amino acids at its N-terminal end (RGS-VDAC1) exhibited a previously not characterized second gating that superimposed the main gating of VDAC1. Closer analysis of this fast gating resulted in a lower amplitude of $\Delta G_{fg} = 0.5-1.2$ nS and much higher transition rates of $k_{fg} = 18-911$ s⁻¹ with higher rates at low voltages and *vice versa*. A second mutant (V17C/A205C-VDAC1) contained an artificially introduced disulfide bond that prevented the movement of a certain protein structure as putative molecular basis of the VDAC1 conductance transition. However, V17C/A205C-VDAC1 did not exhibit an altered behavior compared to the wild type-VDAC1.

The antimicrobial activity of Dermcidin (DCD) mainly consists of its ability to perforate lipid bilayers. To elucidate the postulated zinc dependency of the DCD activity, stable membranes were prepared and subsequently incubated with DCD in a zinc free environment or in the presence of Zn²⁺ ions. High DCD activity was detected in the presence of Zn²⁺ ions whereas no activity was found under zinc free conditions or in the presence of Mg²⁺ ions. These findings and the inactivation of DCD *via* the alteration of a zinc binding site in a mutant (H38A-DCD) proved the zinc dependency of the DCD activity.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Biologische Membranen	1
1.2	Membranproteine	3
1.2.1	Selektiver Transport über die Membran	4
1.2.2	Spannungsgesteuerte Ionenkanäle / Porine.....	5
1.3	Das bakterielle Porin OmpF.....	7
1.4	Das mitochondriale Porin VDAC1	9
1.4.1	Struktur	9
1.4.2	Elektrophysiologie des VDAC1	11
1.4.3	Vorkommen und Funktion.....	17
1.4.4	VDAC1 als Mediator der Apoptose.....	18
1.5	Antimikrobielle Peptide	21
1.5.1	Dermcidin (DCD)	24
1.6	Artifizielle Lipidmembranen.....	28
1.6.1	Black Lipid Membranes.....	29
1.6.2	Unilamellare Lipidvesikel.....	31
1.6.3	Porenüberspannende Membranen.....	32
2	Zielsetzung.....	33
2.1	Das mitochondriale Porin VDAC1	33
2.2	Das antimikrobielle Peptid Dermcidin.....	34

3	Materialien und Methoden	35
3.1	Verwendete Lipide.....	35
3.1.1	1,2-Diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DPhPC).....	35
3.1.2	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DOPC)	35
3.1.3	Cholesterol.....	36
3.2	Herstellung poröser Aluminate	37
3.2.1	Theoretische Grundlagen.....	37
3.2.2	Herstellung hochgeordneter Al ₂ O ₃ Substrate	39
3.2.3	Elektropolieren	40
3.2.4	Vorstrukturierung / 1. Anodisierung	40
3.2.5	Hauptstrukturierung / 2. Anodisierung	40
3.2.6	Präparation siebartiger Aluminate	41
3.3	Präparation porenüberspannender Membranen	42
3.3.1	Vorbereitung und Funktionalisierung der Substrate.....	42
3.3.2	Aufbringen der Membran auf die Substrate	43
3.4	Elektrochemische Impedanzspektroskopie	44
3.4.1	Physikalische Grundlagen	44
3.4.2	Elektrische Beschreibung festkörperunterstützter Membranen.....	46
3.5	<i>Patch clamp</i> -Experimente.....	49
3.6	Einzelkanalmessung in artifiziellen Lipidmembranen.....	50
3.6.1	Aufbau und Durchführung eines Einzelkanalexperiments.....	51
3.6.2	Messmodus <i>voltage clamp</i>	53
3.7	Port-a-Patch	55
3.8	Vorbereitung der Messelektroden.....	56
3.8.1	Platinieren von Platindrähten.....	56

3.8.2	Chloridieren von Silberelektroden.....	57
3.9	CD-Spektroskopie.....	58
3.9.1	Theoretische Grundlagen.....	58
3.9.2	Durchführung eines CD-Experiments	60
4	Ergebnisse.....	63
4.1	Strukturelle Integrität des VDAC1.....	63
4.2	Porenüberspannende Membranen auf porösen Aluminiumoxidsubstraten. 65	
4.2.1	Membranpräparation durch Vesikelspreiten.....	65
4.2.2	Präparation von porenüberspannenden Membranen durch <i>painten</i> von Lipiden	71
4.2.3	OmpF in porenüberspannenden Membranen.....	73
4.2.4	VDAC1 in porenüberspannenden Membranen.....	77
4.3	Charakteristik des VDAC1 in Einzelkanalmessungen.....	85
4.3.1	Spannungsrampen.....	87
4.4	Elektrophysiologie des VDAC-Proteins	89
4.4.1	Multikanal Experimente	92
4.4.2	Einzelkanalexperimente am VDAC1.....	94
4.4.3	Automatische Basislinienkorrektur und Auswertung von Stromsignalen	96
4.5	Blockierung des VDAC1 mit tBid	103
4.6	Kinetik des <i>gatings</i> von <i>wt</i> -VDAC1 und einer Mutante.....	107
4.6.1	RGS-VDAC-Mutante	109
4.6.2	Kinetische Analyse des <i>fast gatings</i> der RGS-VDAC-Mutante	115
4.7	V17C/A205C-VDAC-Mutante	119

Inhaltsverzeichnis

4.8	Das antimikrobielle Peptid Dermcidin	124
4.8.1	Elektrophysiologische Messungen in Abwesenheit von Zn^{2+}	125
4.8.2	Elektrophysiologische Messungen in Anwesenheit von 2 mM Zn^{2+}	127
4.8.3	Einfluss von Magnesiumionen auf die Aktivität von DCD.....	131
4.8.4	H38A-DCD-Mutante mit modifizierter Zink-Bindungsstelle	131
5	Diskussion	133
5.1	Präparation porenüberspannender Membranen durch das Spreiten von Lipidvesikeln	133
5.2	Elektrophysiologische Untersuchung von Porinen in nano-BLMs	135
5.2.1	Das bakterielle Porin OmpF	135
5.2.2	Das mitochondriale Porin VDAC1	136
5.3	Spannungsabhängigkeit des VDAC1 auf Einzelkanalebene	137
5.3.1	Ermittlung der Spannungsabhängigkeit des VDAC1 auf Multikanalebene	141
5.4	Kooperative Effekte bei Ionenkanälen.....	145
5.4.1	Physiologische Relevanz von VDAC1-Oligomeren	149
5.5	Einfluss von organischem Lösungsmittel	153
5.6	Charakteristisches <i>fast gating</i> der RGS-VDAC-Mutante.....	154
5.6.1	Molekulare Ursache des <i>fast gatings</i>	154
5.6.2	Kinetische Analyse des VDAC- <i>gatings</i>	158
5.6.3	Hinweise in der Literatur auf ein <i>fast gating</i> des VDAC1	159
5.7	Beteiligung einer Bewegung der N-terminalen Helix am <i>main gating</i> des VDAC1	160
5.8	Asymmetrie des VDAC1- <i>gatings</i>	161

5.8.1	Asymmetrie der Interaktion des proapoptotischen Proteins tBid mit VDAC1	162
5.9	Zinkabhängigkeit der Dermcidin-Aktivität.....	164
6	Zusammenfassung	169
6.1	Das mitochondriale Porin VDAC1	169
6.2	Das antimikrobielle Peptid Dermcidin.....	171
7	Literaturverzeichnis	173
8	Anhang.....	191
8.1	Abbildungsverzeichnis	191
8.2	Tabellenverzeichnis.....	199
8.3	MatLab-Skript zur Auswertung von Stromsignalen basierend auf Spannungsrampen.....	200
8.4	Symbolverzeichnis	201
8.5	Abkürzungsverzeichnis	204
8.6	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	207
8.7	Geräte	208

1 Einleitung

1.1 Biologische Membranen

Membranen stellen einen fundamentalen Bestandteil biologischer Systeme dar, da sie den Aufbau abgeschlossener Kompartimente in wässrigen Medien ermöglichen. Sie bestehen hauptsächlich aus Lipiden, Steroiden und Membranproteinen, welche sich aufgrund ihres amphiphilen Charakters zu Doppelschichten mit stark hydrophobem Inneren zusammenlagern. Die hydrophoben Fettsäuregruppen der Lipide weisen ins Membraninnere und minimieren so den energetischen Aufwand, den eine Exposition ins wässrige Medium bedeuten würde, während die polaren Kopfgruppen der Lipide die Membran jeweils nach außen hin begrenzen.

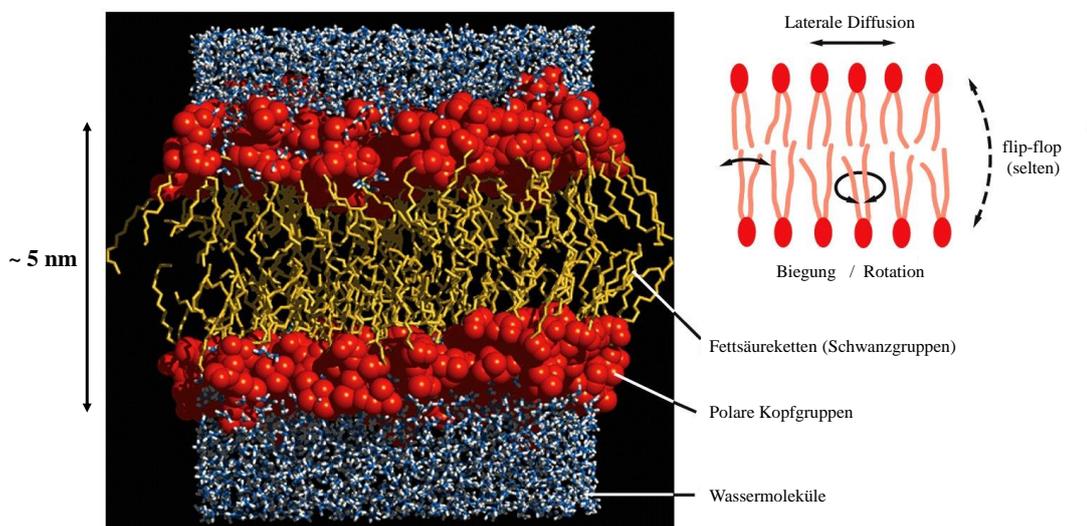


Abb. 1-1: Aufbau einer Lipiddoppelschicht. Links ist eine Computersimulation von 100 Phosphatidylcholin-Molekülen in Wasser gezeigt.^[1] Die Beweglichkeit einzelner Moleküle und ihre Fähigkeit zur lateralen Diffusion innerhalb der Membran wird anhand des Schemas rechts oben verdeutlicht.^[2]

1. Einleitung

In Abb. 1-1 wird dieses Phänomen anhand einer Computersimulation der Anordnung von 100 Molekülen des häufigsten Phospholipids Phosphatidylcholin (PC) in einer wässrigen Umgebung verdeutlicht. Die einzelnen Moleküle sind nichtkovalent assoziiert und zeigen daher ein hohes Maß an individuellem Bewegungsspielraum und lateraler Beweglichkeit innerhalb der Lipidmembran. Ein Austausch einzelner Moleküle zwischen den beiden Schichten (flip-flop) ist hingegen sehr unwahrscheinlich, da bei diesem Vorgang die hydrophile Kopfgruppe eines Lipids durch die Membran treten muss. In der Natur ergibt sich aus diesem Grund mitunter ein hoher Grad an Asymmetrie in der Zusammensetzung der beiden am Membranaufbau beteiligten Lipidmonoschichten (siehe Abschnitt 1.5).

In diese aus Lipiden bestehende 2D-Matrix sind verschiedene Membranproteine eingebettet, wobei ihr Massenanteil an der Gesamtmasse der Membran zwischen 25 % (Myelinmembran) und 75 % (innere Mitochondrienmembran, IMM) variiert (Abb. 1-2).

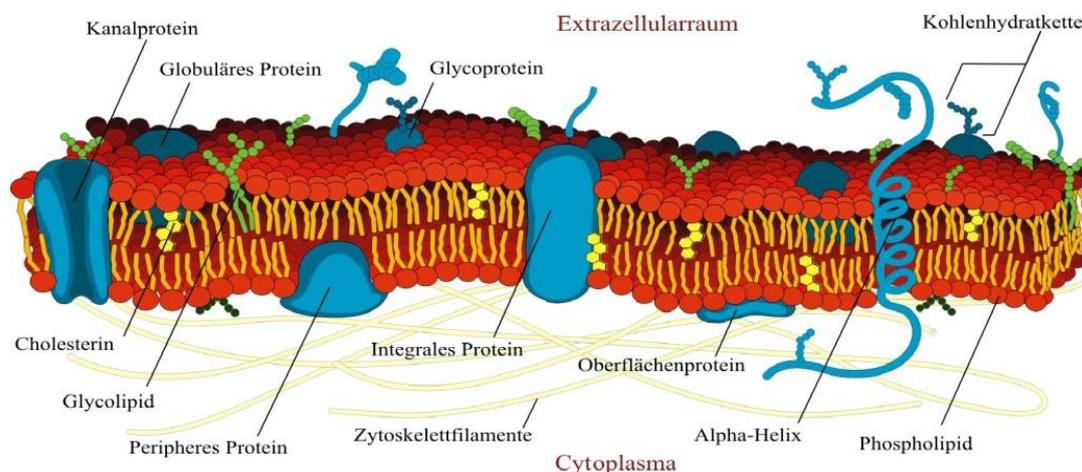


Abb. 1-2: Schematische Darstellung der Zellmembran einer menschlichen Zelle. Eingebettet in eine 2D-Lipidmatrix finden sich zahlreiche Membranproteine unterschiedlicher Funktion.

Durch ihr hydrophobes Inneres bildet die Lipidmembran im Wesentlichen eine Barriere für polare oder geladene Teilchen, welche sich gelöst zu beiden Seiten dieser Schicht befinden. Nur so kann ein Gradient aufgebaut werden, der auf einer

Ungleichverteilung bestimmter Spezies beruht. Für die Produktion des Hauptenergieträgers im menschlichen Körper, ATP, wird beispielsweise über die Atmungskette ein Protonengradient über die IMM aufgebaut, welcher die ATP-Synthese antreibt.

1.2 Membranproteine

Die Hauptaufgabe der Membranproteine liegt im streng kontrollierten Austausch verschiedener Metaboliten, der Weiterleitung bestimmter Signale oder auch der Aufrechterhaltung wichtiger Strukturmerkmale einer Membran. Es wird vermutet, dass es sich bei ca. 30 % aller im Genom einer menschlichen Zelle codierten Proteine um Membranproteine handelt und sie in höheren Organismen wie Säugetieren in etwa 20 % aller Proteine ausmachen. Prinzipiell wird zwischen peripheren, nur auf der Membranoberfläche befindlichen, und integralen, also die Membran durchspannenden Membranproteinen unterschieden. Letztere lassen sich vor allem anhand zweier Strukturmerkmale klassifizieren: die Membran durchspannende α -Helices und größere, Poren formende β -Fässer (*β -barrels*), die aus mehreren β -Faltblatt Strukturen bestehen. Im Falle einer α -Helix werden mehrere (ca. 20 Aminosäuren für eine komplette Membrandurchspannung) in räumlicher Nähe zueinander liegende Aminosäuren der Polypeptidkette eines Proteins mit hydrophoben Seitengruppen in die Membran eingelagert. Die polaren Amidbindungen des Proteinrückgrats weisen vom hydrophoben Kern der Membran weg, was die charakteristische schraubenförmigen Gestalt (Helix) dieser Peptidketten hervorruft. Analog dazu insertieren auch *β -barrels* über hydrophobe Seitenketten in die Membran, nur bilden hier benachbarte Abschnitte des Peptids Wasserstoffbrückenbindungen untereinander aus. Durch bis zu 22 dieser einzelnen β -Faltblatt Abschnitte können sich große Poren in der Membran bilden, die für den kontrollierten Transport ganzer Metabolitmoleküle zuständig sind (vgl. Abschnitt 1.3).

1.2.1 Selektiver Transport über die Membran

Eine wichtige Aufgabe von integralen Membranproteinen stellt die geregelte Kommunikation zwischen den beiden die Membran umgebenden Medien dar. G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermitteln beispielsweise einen Informationsfluss über die Membran, indem eine Stimulation des extrazellulären Teils des Proteins durch spezifische Liganden eine Aktivierung von weiteren, intrazellulär gebundenen Proteinen zur Folge hat.^[3] Ein direkter Austausch von Ionen oder anderen Metaboliten, die aufgrund ihrer Polarität oder Ladung nicht durch die Membran diffundieren können, wird von in der Membran verankerten Transportern und Ionenkanälen vermittelt. Transporter können ein spezifisches Substrat binden und dieses auch gegen einen bestehenden Konzentrations- oder elektrochemischen Gradienten durch die Membran befördern. Die hierfür notwendige Energie wird aus Licht, einer Kopplung an die Hydrolyse von ATP oder über die Membran verlaufende Na^+ - bzw. H^+ -Gradienten gewonnen (Abb. 1-3). Diese Gradienten werden ihrerseits auch von Transportproteinen in der Membran aufrecht erhalten.

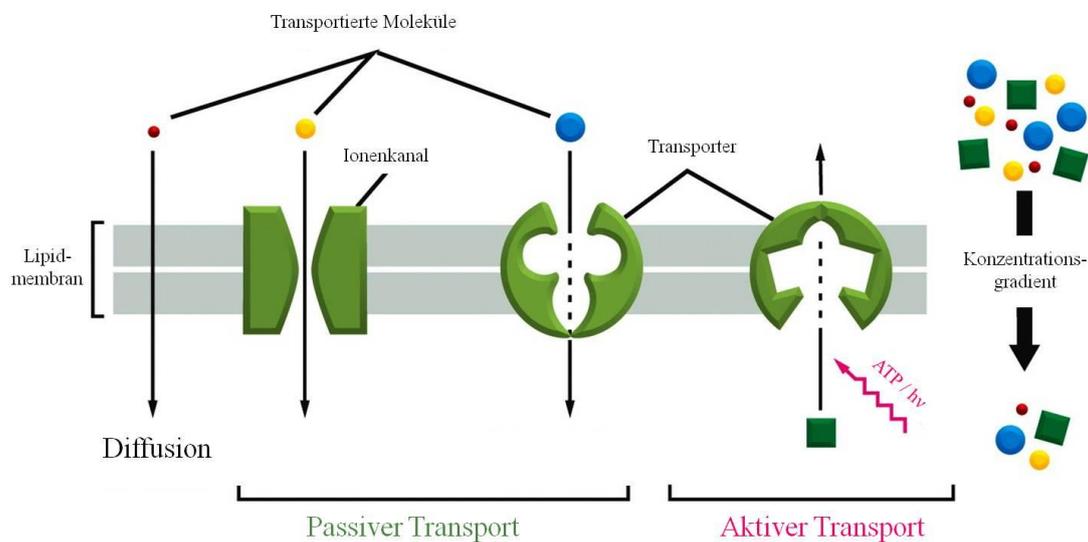


Abb. 1-3: Schematische Darstellung der verschiedenen Arten des Transports von Molekülen über eine Membran. Während kleine apolare Moleküle (roter Kreis) frei entlang ihres Konzentrationsgradienten diffundieren können, müssen größere polare oder geladene Moleküle durch Ionenkanäle oder Transporter über die Membran transportiert werden. Auch ein Transport entgegen eines bestehenden Gradienten ist durch Transporterproteine unter Energieverbrauch (Licht, ATP) möglich.^[2]

Ionenkanäle bilden hingegen hauptsächlich einen hydrophilen (meist wassergefüllten) Pfad durch die Membran, der lediglich einen passiven, also mit einem Gradienten verlaufenden Transport von Ionen und/oder Metaboliten zulässt. Im Gegensatz zu einfachen Poren in der Membran sind sie allerdings selektiv bezüglich der transportierten Ionen. Diese Selektivität wird durch besonders enge Stellen im Kanal (Selektivitätsfilter) hervorgerufen, die durch eine genau definierte Struktur und Ladungsverteilung innerhalb der Proteinoberfläche nur bestimmte Ionen passieren lassen. Ein weiteres charakteristisches Merkmal ist das Auftreten eines Wechsels (*gating*) zwischen einem geschlossenen und einem offenen, leitfähigen Zustand. Dieser Wechsel beruht auf einer räumlichen Umlagerung bestimmter Proteinteile und wird durch spezifische Liganden (beispielsweise Neurotransmitter oder Nucleotide), durch mechanische Impulse oder das Membranpotenzial gesteuert. Die Wahrscheinlichkeit, einen Ionenkanal im offenen Zustand vorzufinden, wird als Öffnungswahrscheinlichkeit (*open probability*, P_o) bezeichnet und ist im Allgemeinen abhängig von den Effektoren, die auch das *gating* steuern.

1.2.2 Spannungsgesteuerte Ionenkanäle / Porine

Ein Ionenkanal wird als spannungsgesteuert bezeichnet, wenn die Öffnungswahrscheinlichkeit P_o von der Transmembranspannung U_m abhängig ist. Über die Zellmembran einer tierischen Zelle liegt ein Ruhepotenzial von ungefähr $U_m = -90$ mV (Zytosol negativ) an, das durch den ATP-abhängigen Aufbau eines Na^+ -Gradienten und dem damit verbundenen Ausströmen von K^+ aus der Zelle hervorgerufen wird. Verändert sich dieses Potential, so reagieren in der Membran befindliche spannungsgesteuerte Ionenkanäle darauf mit einer Veränderung ihrer Permeabilität und „übersetzen“ so ein elektrisches Signal in eine chemische Antwort. Neben der eigentlichen Pore und speziellen Proteinstrukturen, die ein Schließen des Kanals ermöglichen, muss bei diesen Proteinen weiterhin ein Spannungssensor (*voltage sensor*), also eine Struktur, die das Potenzial detektieren kann, vorhanden sein. Dies können beispielsweise Proteinabschnitte mit genau definiertem Ladungsmuster sein, die sich bei einer Veränderung des Transmembranpotenzials räumlich neu anordnen (Abb. 1-4).

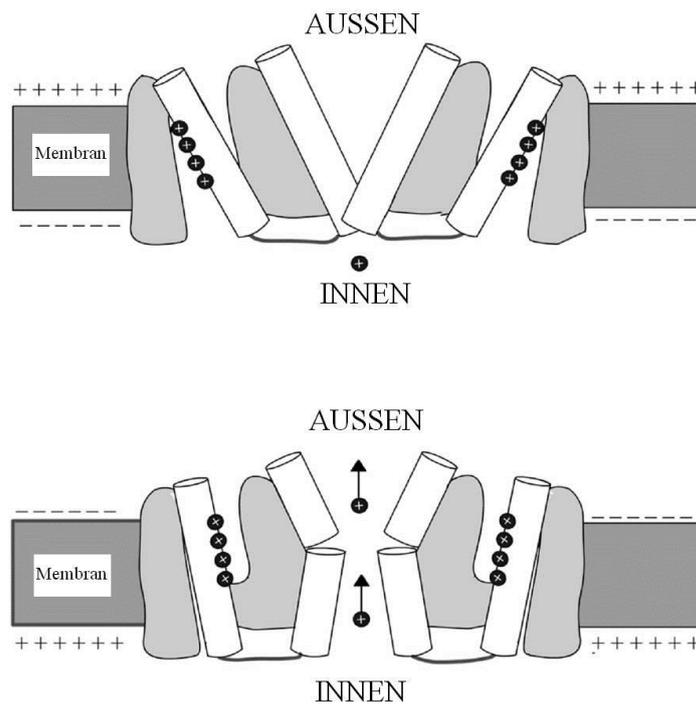


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der möglichen Wirkungsweise des *voltage sensors* eines spannungsgesteuerten Ionenkanals. **Oben:** Bei positiv geladener Membranaußenseite wird der gleichnamig geladene *voltage sensor* abgestoßen und dreht sich von der Oberfläche weg. **Unten:** Eine Umkehr des Potentials bewirkt eine Bewegung des Sensors, damit verbundene strukturelle Veränderungen im Protein und in diesem Fall ein Öffnen des Kanals.^[4]

Eine eigene Gruppe dieser spannungsgesteuerten Ionenkanäle stellen die *Porine* (Abschnitt 1.3) dar, welche sich hauptsächlich in der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien und der äußeren Membran der Mitochondrien bzw. Chloroplasten eukaryontischer Zellen befinden. Diese großen β -barrel Proteine besitzen nur eine mäßige Selektivität und lassen mitunter auch in geschlossenem Zustand noch Ionen und kleine Metaboliten passieren. Für diese Organellen und Bakterien ist es deshalb essentiell, neben der Porin enthaltenden äußeren Membran noch eine innere, hochselektive Membran zu besitzen. Die auffällige Ähnlichkeit im Aufbau und den Eigenschaften dieser doppelten Zellmembran bei Bakterien und Mitochondrien bzw. Chloroplasten ist eine der Grundlagen der Endosymbiontentheorie.^[5]

1.3 Das bakterielle Porin OmpF

Gram-negative Bakterien wie beispielsweise *Escherichia coli* besitzen zwei Zellmembranen, die ihr Zytosol vom umgebenden Medium abtrennen. Während die innere der beiden Membranen auch Ionen und kleine Metaboliten nur selektiv und kontrolliert transportiert, stellt die äußere Membran eine vergleichsweise durchlässige Barriere dar, die vor allem die Aufgabe besitzt, das Bakterium vor schädlichen, relativ großen Molekülen wie Fremd-DNA oder Antibiotika zu schützen. Diese äußere Membran besitzt eine siebartige Struktur, welche durch wassergefüllte Poren hervorgerufen wird, die einen Großteil (70 % und mehr) der Zelloberfläche ausmachen.^[6] Gebildet werden diese Poren von integralen Membranproteinen, die aufgrund ihrer speziellen Struktur hydrophile Kanäle innerhalb einer Membran bilden und deshalb als *Porine* bezeichnet werden.^[7]

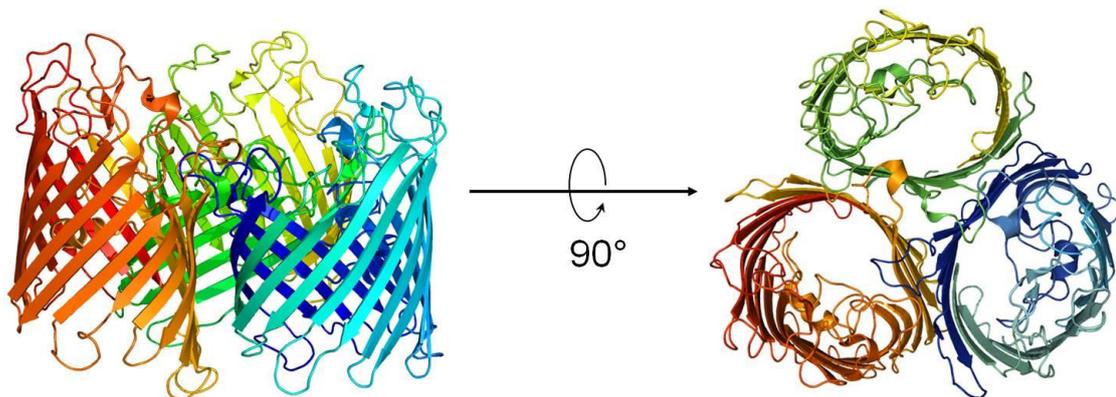


Abb. 1-5: Struktur des Porins OmpF aus der äußeren Zellmembran des Bakteriums *Salmonella typhi*, erhalten durch Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 2,8 Å.^[8] Gezeigt ist das *in vivo* vorliegende Proteintrimer bestehend aus drei Monomeren (rot, blau, grün). Ein Monomer besteht aus 16 β-Faltblättern, welche sich zu einem β-barrel anordnen. Jedes dieser β-barrels wird durch einen Abschnitt (*loop*) des Proteins verengt, welcher zusammen mit den hydrophilen Seitenketten der inneren Porenwand für die Selektivität des Kanals verantwortlich ist (PDB-ID: 3NSG).^[9]

Ein gut charakterisiertes Porin aus der äußeren Membran gram-negativer Bakterien ist das *outer membrane protein F* (OmpF), welches einen passiven und wenig selektiven Transport von Molekülen bis zu einer Größe von ca. 600 Da erlaubt.^[10]

Ein Monomer des in der Membran stets als Trimer vorliegenden Proteins zeigt das

1. Einleitung

für alle Porine charakteristische Hauptmotiv der Tertiärstruktur dieser Proteinklasse: Typischerweise 12 bis 18 β -Faltblatt Sekundärstrukturen bilden ein β -barrel aus (Abb. 1-5).

Innerhalb dieser β -barrel Strukturen zeigen vor allem hydrophobe Seitenketten des Proteins nach außen, was die Einlagerung der Struktur in die Membran ermöglicht. Die vornehmlich hydrophilen Seitenketten der Innenwand des barrels ermöglichen hingegen eine Passage hydrophiler und/oder geladener Metaboliten und Ionen durch die Membran. Die Art und Ladung der beteiligten Aminosäuren, sowie die Verengung der Pore durch nicht zum β -barrel gehörende Proteinabschnitte (*loops*) bewirken eine gewisse Selektivität im Bezug auf die transportierten Spezies.

Elektrophysiologische Untersuchungen am OmpF ergaben eine Leitfähigkeit eines Monomers von $G = 1,5 \text{ nS}$ in 1 M KCl. Weiterhin ist dieses Molekül in der Lage ein über die Membran anliegendes Potenzial zu detektieren und darauf zu reagieren.

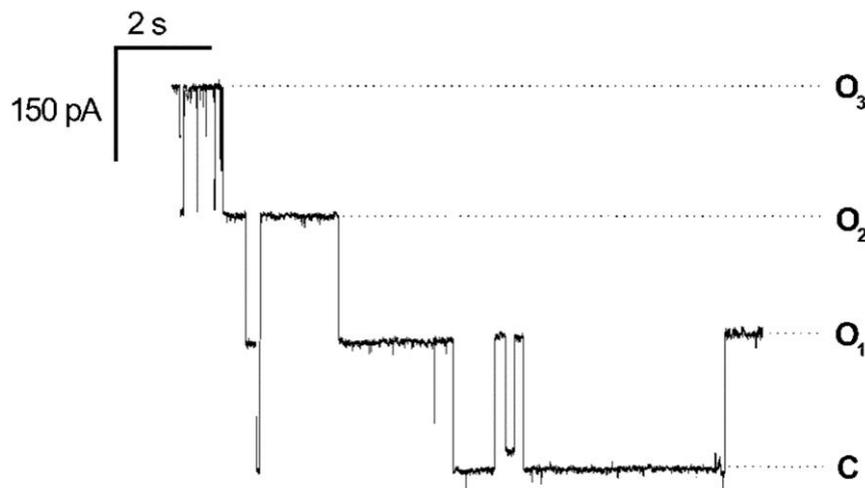


Abb. 1-6: Kanalaktivität eines OmpF- Trimers in einer porenüberspannenden Membran bestehend aus DPhPC, gemessen in 1 M KCl, 1 mM CaCl₂, pH 6,0. Die bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = 100 \text{ mV}$ detektierten Sprünge im Stromsignal entsprechen nach Gleichung (3-7) im Mittel einer Leitfähigkeitsdifferenz von $\Delta G = (1,4 \pm 0,2) \text{ nS}$. Die einzelnen Stromlevel werden einem vollständig geschlossenen Trimer (*closed*, C) bzw. unabhängig voneinander öffnenden Monomeren (*open*, O₁ - O₃) zugeordnet.^[11]

In porenüberspannenden Membranen (siehe Abschnitt 1.6.3) konnte nachgewiesen werden, dass die einzelnen Monomere bei einem applizierten

Transmembranpotenzial von $U_m = 100$ mV schließen, was sich in diskreten Sprüngen im detektierten Stromsignal äußert (Abb. 1-6). Die resultierenden Sprünge im Stromsignal bewegen sich zwischen vier diskreten Stromniveaus, was einem vollständig geschlossenen Trimer bzw. einzelnen, öffnenden und schließenden Monomeren entspricht. Die aus den Differenzen des Transmembranstroms nach Gleichung (3-7) ermittelten Leitfähigkeitsdifferenzen betragen $\Delta G = (1,4 \pm 0,2)$ nS in 1 M KCl.^[11]

1.4 Das mitochondriale Porin VDAC1

Mit circa 10.000 Molekülen pro Mitochondrium ist der *voltage dependent anion channel* (VDAC) das häufigste Protein in dessen äußerer Membran (*outer mitochondrial membrane*, OMM).^[12] Die wesentlichen Eigenschaften des VDACS wurden im Zuge der Evolution offenbar schon sehr früh festgelegt, da zwar die Primärstruktur, nicht jedoch das für die eigentliche Funktion entscheidende Muster von hydrophoben und hydrophilen Bereichen innerhalb der Polypeptidkette in so verschiedenen Organismen wie höheren Pflanzen, Hefen oder Säugetieren variiert.^[13] Aufgrund dieser Tatsache und seiner strukturellen Eignung als Transportkanal wird der häufigsten von drei Isoformen, VDAC1, eine zentrale Rolle z. B. im Metabolismus der Mitochondrien einer Zelle zugeschrieben.

1.4.1 Struktur

Bei VDAC1 handelt es sich um ein integrales Membranprotein, welches aus insgesamt 283 Aminosäuren besteht und eine Masse von etwa $M_{VDAC1} = 31,8$ kDa aufweist.^[12] Mangels hochauflösender Methoden, welche eine genaue 3D-Strukturbestimmung auf atomarer Ebene erlauben, wurden strukturelle Erkenntnisse über den VDAC1 Aufbau, also die genaue räumliche Anordnung der Polypeptidkette, seit seiner Entdeckung Ende der 1970er Jahre aus verschiedenen, hauptsächlich elektrophysiologischen Experimenten indirekt abgeleitet. Im Jahre 2008 wurde die Struktur durch drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander gelöst,

1. Einleitung

wobei eine Bestimmung der Struktur von VDAC1 mit einer Auflösung von bis zu 2,3 Å erreicht werden konnte. Zu diesem Zweck wurden neben Röntgenbeugung an Proteinkristallen^[14] auch *solid state* NMR an VDAC1 solubilisiert in Detergensmizellen^[12] sowie ein Hybrid aus beiden Methoden^[15] zur Strukturaufklärung verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse wiesen ein sehr hohes Maß an Übereinstimmung auf. Demnach bildet eine aus 19 β -Faltblättern bestehende Pore (β -barrel) das Hauptstrukturmotiv, während die ersten ca. 20 Aminosäuren des N-Terminus sich zu einer quer in dieser Pore liegenden α -Helix anordnen (Abb. 1-7).

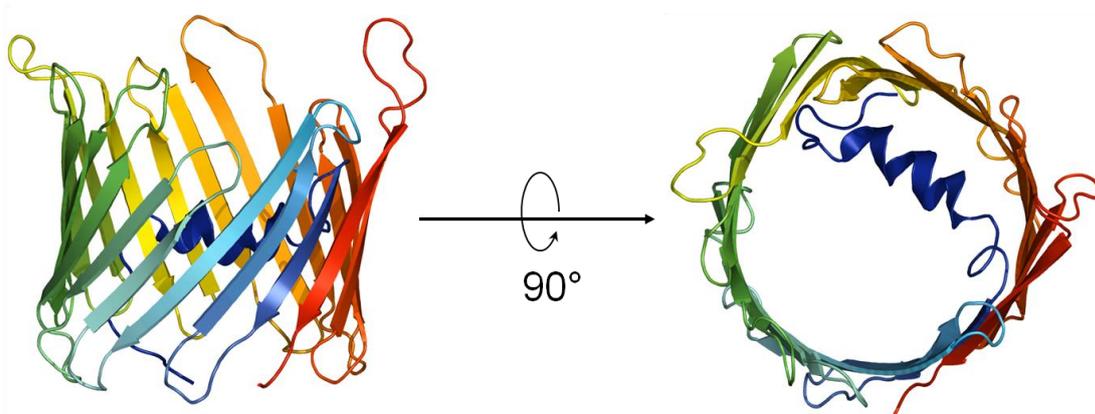


Abb. 1-7: Struktur der Isoform 1 des *voltage dependent anion channels* (VDAC1). Eine Pore der Dimension (3,2 x 4,5 x 4,0) nm³ wird von 19 β -Faltblatt Strukturen gebildet, die ersten 20 Aminosäuren sind zu einer quer in dieser Pore liegenden α -Helix angeordnet. Die spektrale Farbgebung folgt dem Verlauf der Primärsequenz vom N-Terminus (blau) zum C-Terminus (rot) (PDB-ID: 2JK4).

Die Anordnung von mehreren β -Faltblattstrukturen zu β -barrels, welche die Lipidmembran durchspannen, ist ein auch von anderen Porinen bekanntes Motiv^[16] und erlaubt den selektiven Stofftransport zwischen verschiedenen Zellkompartimenten (vgl. Abschnitt 1.3). Die N-terminale Helix, die in etwa auf mittlerer Höhe in der Pore liegt und diese dadurch erheblich verengt, ist hingegen eine Besonderheit der VDAC-Proteine. Auch die *ungerade* Anzahl der beteiligten β -Faltblattstrukturen stellt eine Besonderheit dar. Bei dieser Anordnung müssen zwangsläufig zwei von ihnen parallel verlaufen (in Abb. 1-7 als ein dunkelblaues und ein parallel dazu laufendes rotes Faltblatt dargestellt), was eine instabile Anordnung der β -Faltblätter β 1 und β 19 zur Folge hat.

1.4.2 Elektrophysiologie des VDAC1

Auch das VDAC-Protein ist in der Lage, ein über die Lipidmembran verlaufendes elektrisches Potential zu detektieren und darauf zu reagieren. Die ersten Erkenntnisse über die Eigenschaften von VDAC1 gehen auf elektrophysiologische Untersuchungen äußerer Mitochondrienmembranen zurück.^[17] Verschiedene aus *Paramecium aurelia* erhaltene Membranpräparationen wurden zunächst mit Asolectin (einem aus Sojabohnen extrahierten Lipidgemisch) und Hexan versetzt und anschließend zu vorher präparierten *black lipid membranes* (BLMs, Abschnitt 1.6.1) gegeben. Wurde an die so erzeugten BLMs ein Transmembranpotenzial von $U_m = 40$ mV angelegt (Abb. 1-8 A), so zeigte sich, dass der resultierende Strom von einem höheren Anfangswert über einen Zeitraum im Minutenbereich auf ein zweites, niedrigeres Level abfiel. War ein konstantes Stromlevel erreicht, so konnte die Membran durch kurzes Abschalten des Membranpotenzials auf $U_m = 0$ mV wieder depolarisiert werden. Wurde das Potential nur für eine Millisekunde abgeschaltet (Abb. 1-8 B), so wurde bei anschließendem Zurückschalten auf $U_m = 40$ mV nicht wieder das hohe Anfangslevel erreicht. Nach einer halben Sekunde bei $U_m = 0$ mV und erneutem Anlegen von $U_m = 40$ mV konnte dieses Level wieder erreicht werden (Abb. 1-8 C). Aus diesem Ergebnis wurde zunächst der Schluss gezogen, dass die Membran Proteine enthalten musste, welche die angelegte Spannung detektieren und auf diese mit einer Verminderung ihrer Leitfähigkeit reagieren konnten. Anders als durch solch einen aktiven Prozess innerhalb der Membran war dieser reproduzierbare Abfall des Transmembranstroms nicht erklärlich. Weiterhin wurde nach längerem Depolarisieren der Membran bei erneuter Applikation einer Spannung wieder exakt das anfänglich beobachtete Stromlevel erreicht.

oder andere Lipide bzw. Lipidmischungen gelöst in Alkanen wie Dekan oder Oktan über Öffnungen mit Durchmessern im Mikro- bis Millimeterbereich *gepainted* werden (siehe Abschnitt 1.6.1). Wird ein Membranprotein, welches beispielsweise durch ein Detergens in wässrigem Medium löslich gehalten wird, hinzugegeben, so ergeben sich bei angelegtem Transmembranpotenzial diskrete Sprünge im aufgezeichneten Stromsignal (**Abb. 1-9**).

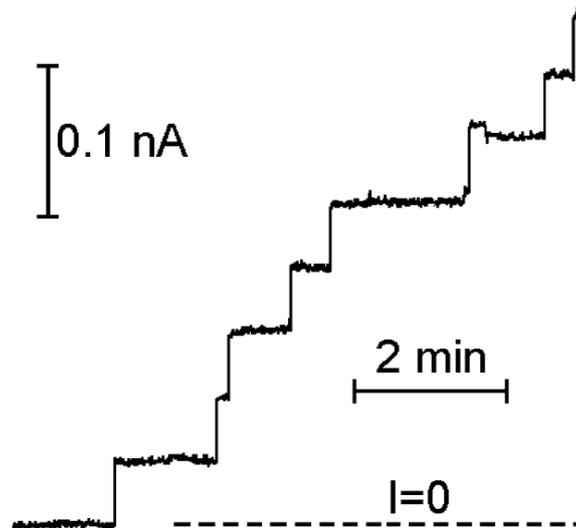


Abb. 1-9: Sprünge im Stromsignal nach Zugabe von VDAC1 zu einer Membran bestehend aus Phosphatidylcholin/Cholesterin im Verhältnis 3:1 (w/w). Das Experiment wurde bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = 10 \text{ mV}$ in 1,15 M KCl, 5 mM HEPES, pH 7,0 durchgeführt.^[19]

Diese Sprünge werden darauf zurückgeführt, dass einzelne Proteine spontan in die BLM insertieren und so einen genau definierten Anstieg des Stroms hervorrufen. Dies ist möglich, da das Detergens, welche die hydrophoben Membranproteine in Lösung hält, bei Proteinzugabe schlagartig verdünnt wird.

In einem zweiten Schritt wird das Stromsignal unter Beachtung des jeweils anliegenden Potenzials nach Gleichung (3-7) in die korrespondierende Leitfähigkeit umgerechnet. Die Amplituden aller beobachteten Sprünge werden in einem Histogramm aufgetragen, welches Aufschluss über alle beteiligten Leitfähigkeitssprünge gibt (**Abb. 1-10**) und im Idealfall eine Bestimmung der

1. Einleitung

mittleren Leitfähigkeit durch die Anpassung einer Normalverteilung nach Gleichung (4-2) zulässt.

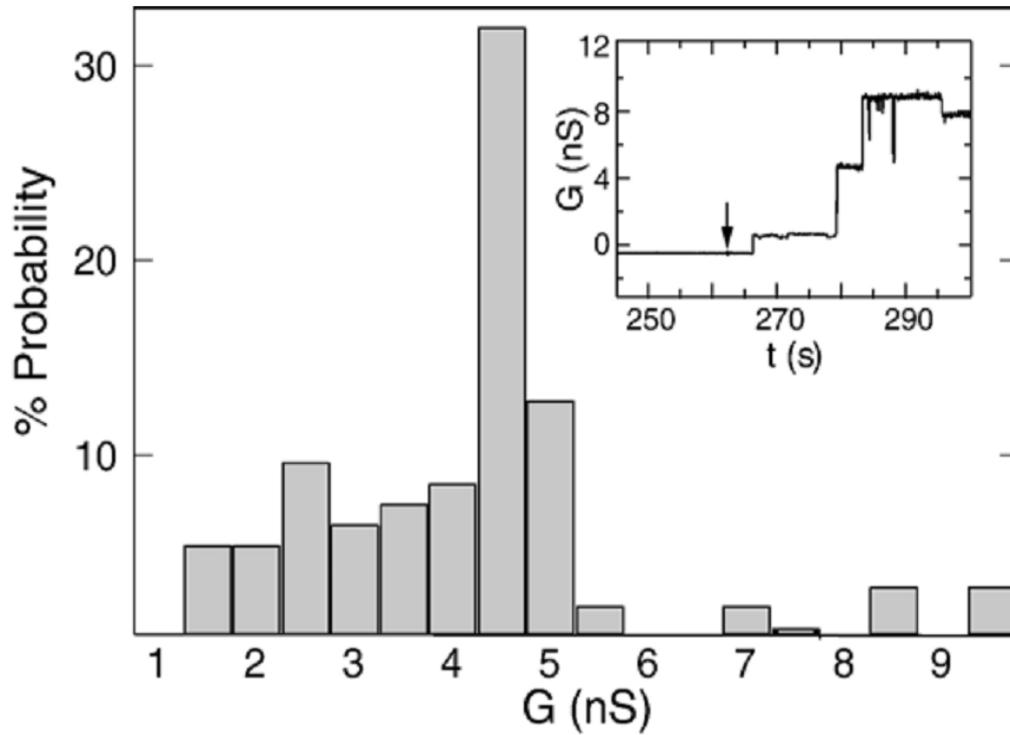


Abb. 1-10: Leitfähigkeitsamplituden der detektierten Sprünge im Signal einer Membran bestehend aus DPhPC nach Zugabe von VDAC1 (Inset, Pfeil) gemessen bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = 10$ mV in 1 M KCl. Aus insgesamt 94 detektierten Ereignissen wurde eine mittlere Leitfähigkeit von $G = 4,5$ nS berechnet.^[20]

Aus einer Vielzahl solcher Experimente unter verschiedenen Bedingungen ergab sich die Leitfähigkeit des offenen Zustands des VDAC1 zu ungefähr $G_o = 4$ nS in 1 M Elektrolytlösung.^[21] Diese Art der Bestimmung wird bei niedrigem Membranpotenzial, typischerweise $U_m = 10$ mV, durchgeführt, um zu gewährleisten, dass sich die insertierenden Kanäle im offenen Zustand befinden.

Sobald der Stromfluss über eine solche BLM einen konstanten Maximalwert der Leitfähigkeit G_{max} erreicht hat, wird ein erhöhtes Potenzial im Bereich von $U_m = 40$ mV über die Membran appliziert. Dies hat nach einem sprunghaften Anstieg aufgrund des erhöhten Potenzials einen Abfall des Stroms in Form diskreter Sprünge im Signal zur Folge (**Abb. 1-11**), welche im Mittel ungefähr die halbe Leitfähigkeit

des offenen Zustands aufweisen. Da diese Phänomen als Schließen des VDAC1-Proteins interpretiert wird, ergibt sich aus der Differenz der Leitfähigkeit dieser Stufen und der bei der Insertion offener Kanäle beobachteten eine Leitfähigkeit des geschlossenen Zustands von circa $G_c = 2$ nS.

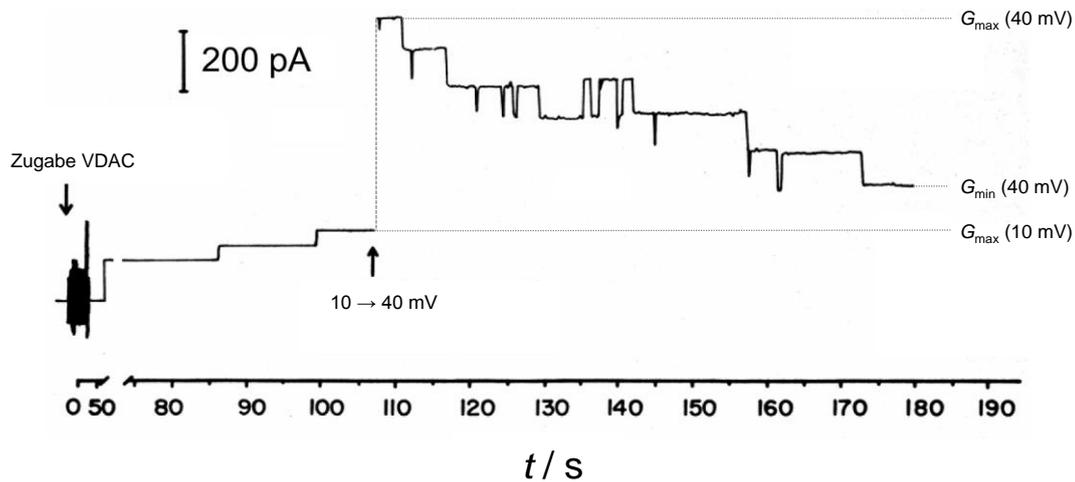


Abb. 1-11: Zu einer Membran wurde bei einem anliegenden Transmembranpotenzial von $U_m = 10$ mV VDAC1 gegeben ($t = 0$ s), was einen Anstieg des Transmembranstroms in mehreren Stufen zu Folge hat. Bei Erreichen eines Maximalwerts I_{max} wurde das Potenzial auf $U_m = 40$ mV erhöht, was einen sprunghaften Anstieg gefolgt von einer stufenweisen Abnahme des Stroms zur Folge hat.^[22]

Auch hier wird das Signal aufgezeichnet, bis nach typischerweise einigen Minuten ein konstantes, niedrigeres Stromlevel erreicht ist.

Zur Ermittlung der Spannungsabhängigkeit des VDAC1-Proteins wird dieses Stromlevel mit minimaler Leitfähigkeit bei verschiedenen Spannungen bestimmt und in Relation zur maximalen Leitfähigkeit (G_{max} , in der Literatur auch als G_0 bezeichnet) der beobachteten Präparation gesetzt, welche standardmäßig bei einem Potenzial von $U_m = 10$ mV ermittelt wird. Die Spannungsabhängigkeit kann nur relativ zu diesen Maximal- bzw. Minimalwerten der Leitfähigkeit ermittelt werden, da jede BLM *per se* einen variablen Widerstand aufweist und daher einen Transmembranstrom unterschiedlicher Höhe bei einem bestimmten Potenzial zulässt. Weiterhin kann bei dieser Versuchsdurchführung nicht ausgeschlossen werden, dass nicht ein Teil des detektierten Stroms durch unbeabsichtigt zusätzlich vorhandene spannungsunabhängige Proteine oder Fehlstellen in der Membran fließt, weswegen

1. Einleitung

nur der spannungsabhängig veränderlichen Teil der Leitfähigkeit isoliert betrachtet wird.

Unklarheit herrscht sowohl über den Mechanismus des *voltage sensings*, also der Fähigkeit des Proteins, ein über eine Membran anliegendes elektrisches Potential überhaupt zu detektieren, als auch über die molekularen Grundlagen der beobachteten Transformation hin zu weniger leitfähigen Zuständen, also des *voltage gatings*.

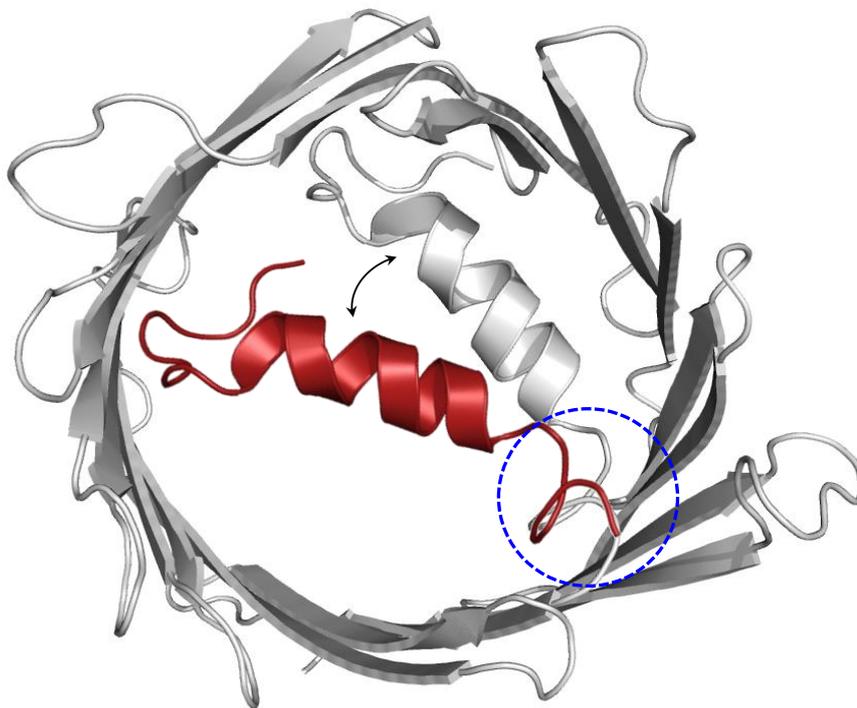


Abb. 1-12: Mögliche Ursache des *voltage gatings* des VDAC1. Die N-terminale Helix (rot) ist über eine Region hoher Beweglichkeit (*hinge region*, blau eingekreist) mit der Wand des β -barrels verbunden. Eine Bewegung innerhalb der Pore könnte den Ionen- und Metabolitenaustausch zwischen Mitochondrium und Zytosol regulieren.

Gegenstand verschiedener Theorien ist es, das Phänomen des *voltage gatings* dieses Kanals anhand der Röntgenstruktur auf molekularer Ebene zu erklären. Ein Ansatz befasst sich mit einer Bewegung der N-terminalen α -Helix (**Abb. 1-12**, rot) innerhalb der Pore.^[14] Da diese Helix auf Grund ihrer zentralen Lage die Pore verengt, könnte eine Lageveränderung den Ionen- und Metabolitentransport limitieren.

Weiterhin ist die Helix über eine Aminosäureabfolge der Primärstruktur mit einer überproportionalen Häufung der kleinen und ungeladenen Aminosäure Glycin (*glycine rich sequence*, GRS) mit dem β -barrel verbunden (**Abb. 1-12**, blau eingekreist).^[23] Dieses auch aus anderen Proteinen bekannte Primärstrukturmotiv zeichnet sich durch eine hohe Beweglichkeit innerhalb der Peptidkette aus, kann als eine Art Scharnier fungieren und somit prinzipiell eine Bewegung der Helix innerhalb der Pore ermöglichen.

1.4.3 Vorkommen und Funktion

Der spannungsgesteuerte Ionenkanal VDAC1 ist das häufigste Protein der äußeren Mitochondrienmembran (*outer mitochondrial membrane*, OMM)^[12] und übernimmt als großer Transportkanal eine zentrale Rolle in der mitochondrialen Atmung. Diese umfasst den Austausch der für die im Mitochondrium stattfindenden Prozesse wie den Citratzyklus und die Atmungskette notwendigen Metaboliten (ATP, ADP, NADH, Citrat, etc.) zwischen mitochondrialer Matrix und dem Zytosol. Transportiert der Kanal im offenen Zustand bevorzugt anionische Metaboliten, so weist der geschlossene Zustand eine leichte Präferenz für Kationen auf.^[24] Aufgrund des anionischen Charakters der wichtigsten über die OMM transportierten Metaboliten (*vide supra*) wird über eine Art Steuerungsfunktion des VDACS für verschiedene Prozesse in der Zelle diskutiert, die auf der Kommunikation zwischen Mitochondrium und Zytosol beruhen.^[25]

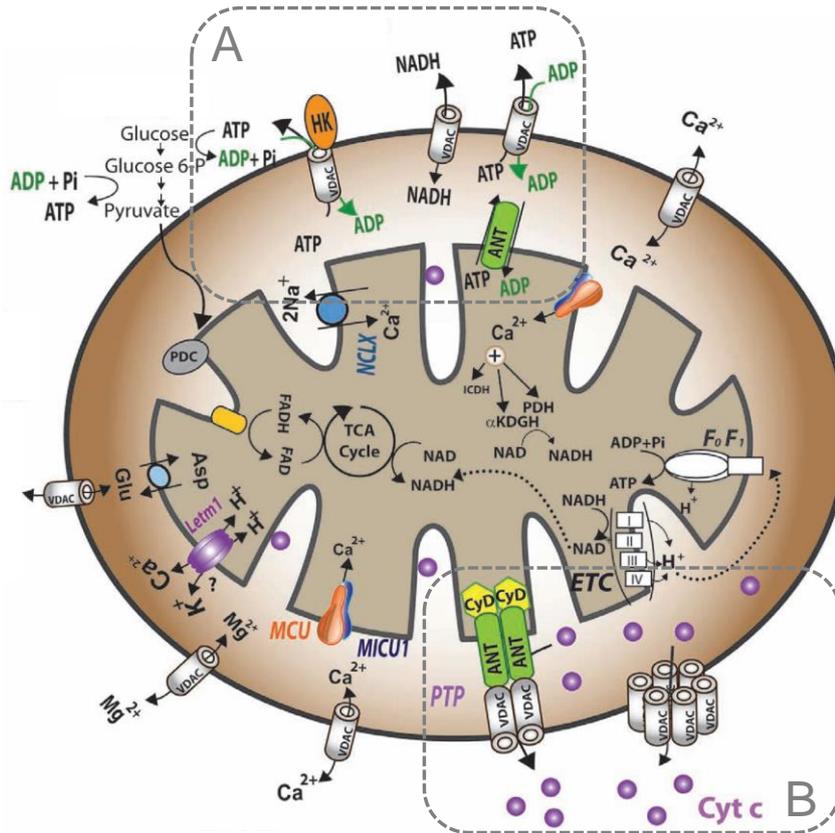


Abb. 1-13: Übersicht der wichtigsten Funktionen, die VDAC1 als zentrales Transportprotein der äußeren Mitochondrienmembran vermutlich übernimmt.^[26] Neben dem Transport von Ionen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} wird über eine zentrale Rolle von VDAC1 vor allem innerhalb der mitochondrialen Atmung (A) und der Ausschüttung von Cytochrom *c* im Zuge der Apoptose (B) spekuliert.

Darüber hinaus wird VDAC1 aufgrund seiner zentralen Position in der Kommunikation zwischen Mitochondrium und Zytosol momentan als eines der entscheidenden Proteine in der Regulation der Apoptose angesehen (Review: ^[27]).

1.4.4 VDAC1 als Mediator der Apoptose

Die Überexpression von VDAC1 in Mäuse- und Rattenzellen^[28] oder auch in Reiszellen^[29] führt auch in Abwesenheit anderer Apoptose auslösender Stimuli zum programmierten Zelltod. Demgegenüber konnte durch die Dämpfung der VDAC1-Expression der für Tumorzellen typische hohe ATP-Gehalt im Zytosol und das Wachstum von Tumorzellen vermindert werden.^[30] Der genaue Mechanismus

dieser Interaktion mit dem komplexen Netzwerk der Apoptose-Steuerung innerhalb einer Zelle ist unklar, allerdings existieren verschiedenen Ansätze, die einen Zusammenhang von VDAC1 und dem programmierten Zelltod diskutieren.^[31] Besondere Aufmerksamkeit wird der Rolle von VDAC1 bei der Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung und der sukzessiven Ausschüttung von Cytochrom *c* (Cyt *c*) aus dem Mitochondrium ins Zytosol gewidmet, da diese Prozesse als zentrale Signale für die Einleitung der Apoptose gelten.^[32] **Abb. 1-14** fasst einige der gängigsten momentan diskutierten Theorien zu diesem Phänomen zusammen.^[26]

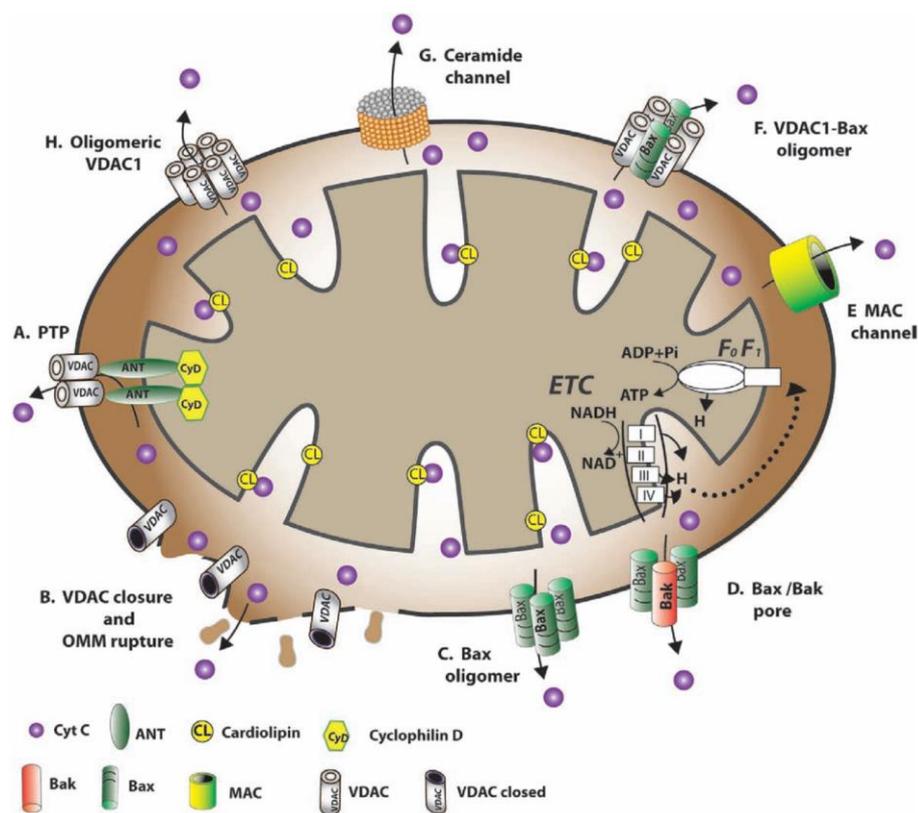


Abb. 1-14: Zusammenfassung der gängigsten Theorien zur Initialisierung der Apoptose infolge der Ausschüttung von Cytochrom *c* (Cyt *c*) aus dem Intermembranraum des Mitochondriums ins Zytosol.^[26] Unter anderem wird das Reißen der OMM als Reaktion auf das Schließen der VDAC1-Proteine (**B.**) oder der Transport von Cyt *c* durch VDAC-Oligomere (**H.**) diskutiert. Auch wird über die Bildung von „Superporen“^[33] unter Beteiligung von VDAC1 und anderen Proteinen spekuliert (**A./F.**).

Es wird unter anderem vermutet, dass ein Schließen der VDAC-Proteine in der OMM ein Zusammenbrechen des Metabolitransports zwischen Mitochondrium und Zytosol zu Folge hat, was zum Anschwellen und schließlich Reißen der OMM

1. Einleitung

führt.^[34] Als Auslöser dieses Vorgangs wird ein Anstieg des Ca^{2+} -Gehalts im Zytosol vermutet. Tatsächlich zeigt sich, dass VADC1 im geschlossenen Zustand eine wesentlich höhere Transportkapazität für Ca^{2+} aufweist und dieses daher besser in den Intermembranraum des Mitochondriums transportieren kann.^[35] Die damit verbundene Depolarisation der Mitochondrien scheint dann den Metabolitransport zu unterbinden und in der unkontrollierten Ausschüttung von Cyt *c* zu münden. Dies ist wiederum ein wichtiges Signal für die Einleitung sowohl der Apoptose, als auch der unkontrollierten Form des Zelltods, der Nekrose.^[36]

Einen weiteren Hinweis auf die Relevanz eines Schließens des VDAC1 liefert die Interaktion dieses Ionenkanals mit dem antiapoptotischen Protein Bcl-x_L. Dieses Protein kann die Initialisierung der Apoptose unterdrücken, indem es die Ausschüttung von Cyt *c* ins Zytosol verhindert.^[37] Auch hier ist der genaue Mechanismus unbekannt, es konnte aber nachgewiesen werden, dass Bcl-x_L VDAC1 dauerhaft in seinem offenen, höher leitfähigen Zustand stabilisiert.^[38] Dies könnte das Zusammenbrechen des Metabolitransports und somit die Einleitung der Apoptose verhindern. Für das proapoptotische Oligonukleotid G3139^[39] konnte demgegenüber gezeigt werden, dass es VDAC1 schließt.^[40] Daraufhin wurde der Transport von ADP ins Mitochondrium vermindert, was wiederum die Einleitung der Apoptose induziert.^[41]

Ein charakteristisches Merkmal von Krebszellen ist es, die Apoptose auch in Anwesenheit proapoptotischer Stimuli unterdrücken zu können.^[42] Das gezielte Öffnen bzw. Schließen des VDAC1 könnte also einen Angriffspunkt für neue Medikamente, beispielsweise in der Krebstherapie, darstellen. Aus diesem Grund besteht Interesse daran, das Phänomen des *gatings* von VDAC1 auf molekularer Ebene besser zu verstehen, um ggf. maßgeschneiderte Wirkstoffe für diesen Zweck herstellen zu können. Verschiedene Studien befassen sich daher mit der Aufklärung des *gatings* auf molekularer Ebene anhand der Röntgenstruktur des Kanals.^[14]

So gut wie alle elektrophysiologischen Studien zu diesem Thema wurden bisher an lösungsmittelhaltigen Membranen durchgeführt, die in der Regel eine Vielzahl an VDAC-Proteinen enthielten. Es ist allerdings kaum möglich, aus dem beobachteten

Verhalten eines VDAC-Ensembles auf das Verhalten nur eines einzelnen Kanals zu schließen, da dieser nicht unabhängig von den anderen analysiert werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es daher, das *gating* des VDAC1 auf Einzelkanalebene in lösungsmittelfreien Membranen zu untersuchen und die erhaltenen Ergebnisse mit den bisher in der Literatur beschriebenen Eigenschaften des VDAC1 zu vergleichen. Von besonderem Interesse war die Untersuchung der Möglichkeit, ein einzelnes Protein gezielt über die Variation des Transmembranpotenzials vom offenen in den geschlossenen Zustand zu überführen.

1.5 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMPs) stellen einen Abwehrmechanismus höherer Lebewesen gegen pathogene Pilze und Bakterien dar (Review: ^[43]). Diese relativ kleinen Peptide sind in der Lage, selektiv Erreger wie beispielsweise *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyphimurium* oder *Candida albicans* abzutöten.^[44] Im Gegensatz zu nicht-Peptid Antibiotika wie Methicillin oder Isoniazid sind sie zwar weniger effektiv, es konnten sich allerdings bisher keine Resistenzen gegen diese Peptidklasse ausbilden. Ihre Wirksamkeit gegen multiresistente Keime^[45] und die generelle Möglichkeit, kleinere Peptide beliebiger Aminosäureabfolge großtechnisch herzustellen,^[46] macht die Erforschung der Struktur und Wirkungsweise der AMPs zu einem wichtigen Aspekt in der Herstellung neuer und wirksamerer Antibiotika.^[47]

Das Hauptproblem im Design wirksamer artifizieller Peptid-Antibiotika stellt die Abwesenheit einer Erklärung des genauen Wirkmechanismus auf molekularer Ebene dar.^[48] Bei AMPs handelt es sich um einige hundert bisher identifizierte Peptide, deren einzige Gemeinsamkeit darin zu bestehen scheint, sich in eine Form falten zu können, die dem aktiven AMP amphipathische Eigenschaften verleiht.^[43] Der hydrophile Teil wird von polaren und ansonsten fast ausschließlich positiv geladenen Aminosäuren gebildet, was eine hypothetische Erklärung der Selektivität gegenüber bakteriellen Membranen liefert. Im Gegensatz zu den Zellmembranen höherer Lebewesen, bestehen bakterielle Membranen auch auf ihrer Außenseite unter

1. Einleitung

anderem aus negativ geladenen Lipiden (z. B. Phosphatidylserin, PS) und unterscheiden sich weiterhin in ihrer Zusammensetzung von den Membranen höherer Lebewesen.^[49] So können kationische AMPs aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen bevorzugt bakterielle Membranen angreifen (Abb. 1-15).

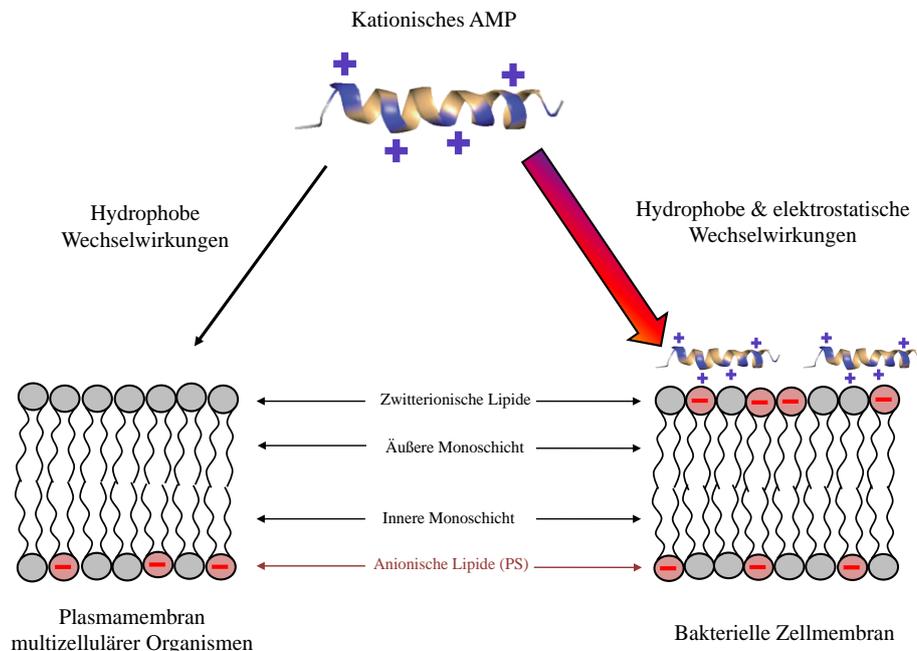


Abb. 1-15: Theorie zur Selektivität von kationischen AMPs gegenüber bakteriellen Membranen (nach: ^[43]). Neben der prinzipiell unterschiedlichen Zusammensetzung der Bakterienmembran gegenüber der Zellmembran höherer Tiere werden vor allem die negativ geladenen Lipide (z. B. Phosphatidylserin, PS) in der äußeren Monoschicht für einen selektiven Angriff bakterieller Membranen durch kationische AMPs verantwortlich gemacht.^[49]

Die antibiotische Wirkung der AMPs wird hauptsächlich auf eine Perforation der bakteriellen Zellmembran und eine damit verbundene effektive Tötung dieser Zellen zurückgeführt. Eine Vielzahl molekulardynamischer Studien und biophysikalischer Experimente haben zum Ziel, diesen Sachverhalt aufzuklären, wobei die genauen Mechanismen dieses Vorgangs bisher noch unbekannt sind.^[50] Abb. 1-16^[46] zeigt eine Simulation der Interaktion des AMPs Spinigerin^[51] mit einer Phosphatidylethanolamin (PE)-Membran, wobei die positiv geladenen Bereiche des α -helicalen Peptids blau markiert sind.

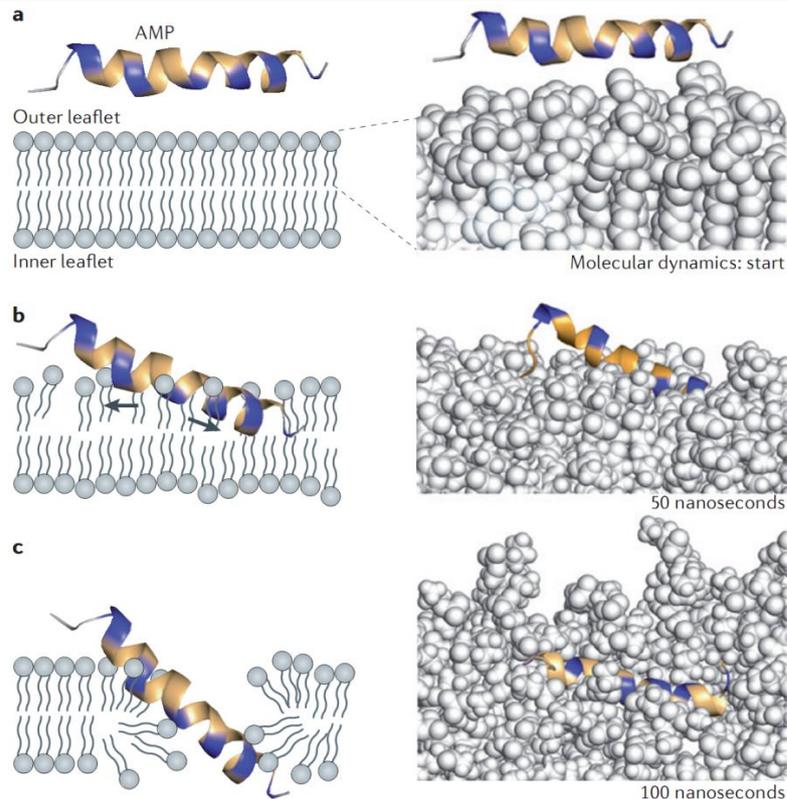


Abb. 1-16: Möglicher Mechanismus der antimikrobiellen Wirkung von AMPs.^[46] **A:** Gezeigt ist eine molekulardynamische Simulation der Interaktion von Spinigerin^[51] mit einer POPE-Membran (rechte Spalte) mit jeweils einer korrespondierenden schematischen Darstellung (linke Spalte). Die positiv geladenen Bereiche des α -helicalen AMPs sind blau dargestellt. **B:** Nach Annäherung an die Membran kann sich das Protein aufgrund seines amphiphilen Charakters in die äußere Schicht der Lipidmembran einlagern und diese dadurch destabilisieren. **C:** Durchdringt das AMP die Membran vollständig, führt dies zum Zusammenbruch elektrischer und chemischer Potentiale an der bakteriellen Membran.

Nach Annäherung an die Membran kann sich das Protein auf Grund seines amphiphilen Charakters in die äußere Schicht der Lipidmembran einlagern. Das damit verbundene Aufspreizen, Umordnen und Ausdünnen der Membran wird bei vielen AMPs, die zu kurz sind, um die Membran vollständig zu durchspannen (z. B. Gramicidin S), als *modus operandi* postuliert. Weiterhin kann es zu einer vollständigen Durchdringung der Membran kommen, wodurch für die Mikroorganismen essenzielle chemischen oder elektrischen Potentiale zusammenbrechen und damit das Absterben des Erregers bewirken.

Ein weitergehender Ansatz postuliert die Ausbildung von Poren aus mehreren AMPs innerhalb der Membranen, wobei ein hohes Maß an Kooperativität zwischen den

1. Einleitung

einzelnen Monomeren des betreffenden AMPs notwendig ist. Demnach lagern sich die AMPs auf der Membranoberfläche zusammen und sind in entsprechender Konzentration in der Lage, Poren in der Membran zu bilden.

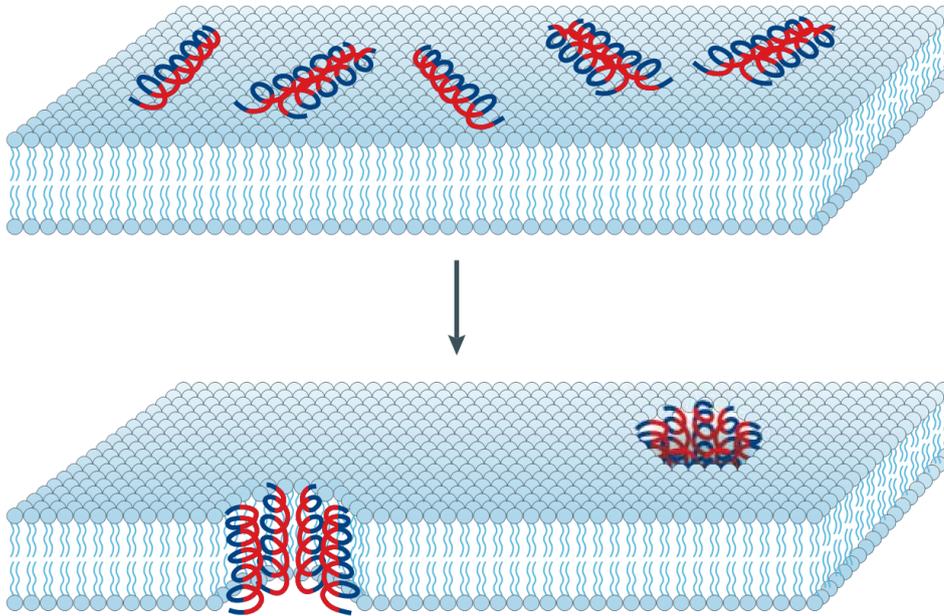


Abb. 1-17: Möglicher Mechanismus der Porenbildung innerhalb einer Lipidmembran nach dem *barrel-stave* Mechanismus.^[50] Die hydrophoben Teile der einzelnen Helices beteiligter AMPs (dunkelblau) zeigen zum hydrophoben Inneren der Membran, während die hydrophilen Bereiche (rot) eine für geladene Metaboliten gut passierbare Pore bilden.^[52]

Bei diesem als *barrel-stave* (engl. Fassdaube) Mechanismus bezeichneten Vorgang^[52] nimmt die amphiphile Beschaffenheit der beteiligten Monomere eine bedeutende Rolle ein. Die hydrophoben Teile der einzelnen Helices (Abb. 1-17, dunkelblau) zeigen zum hydrophoben Inneren der Membran und ermöglichen so den Aufbau eines stabilen Peptidoligomers in der Membran, während die hydrophilen Bereiche (Abb. 1-17, rot) eine für Wasser, gelöste Ionen und andere Metaboliten gut passierbare Pore ausbilden.^[50]

1.5.1 Dermcidin (DCD)

Eine der Haupteintrittspforten für Krankheitserreger beim Menschen bildet die Oberfläche der Haut.^[53] Auf ihr findet sich daher neben anderen AMPs auch das von

den Schweißdrüsen sezernierte antimikrobielle Peptid Dermcidin (DCD).^[54] DCD weist bereits in geringen Konzentrationen von $c_{\text{DCD}} = 1 \mu\text{g/ml}$ eine Aktivität gegen Erreger wie das Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* oder das Rifampicin- und Isoniazid-resistente *Mycobacterium tuberculosis* auf.^[44] Das 48 Aminosäuren lange Peptid (genaue Sequenz unter PDB-ID: 2YMK) bildet eine α -Helix, die unter physiologischen Bedingungen eine negative Gesamtladung von $Q = -2e$ aufweist und somit eine exklusive Stellung unter den hauptsächlich kationischen AMPs einnimmt (vgl. Abschnitt 1.5). Ein hauptsächlich auf elektrostatischer Anziehung zwischen DCD und bakterieller Membran beruhender Mechanismus (vgl. **Abb. 1-15**), kommt für dieses Peptid daher nicht in Frage. Auch die für AMPs ungewöhnliche Aktivität unter den in menschlichem Schweiß vorherrschenden Bedingungen und die Unempfindlichkeit gegenüber Ionenstärke- und pH-Veränderungen sind exklusive Eigenschaften des DCDs. Schweiß besteht hauptsächlich aus Wasser, in welchem bei einem pH-Wert von 4,0-6,8 Ionen wie Natrium (20-60 mM), Chlorid (20-80 mM) Kalium (10 mM), aber auch zweiwertige Ionen wie Magnesium und Zink gelöst sind. Zinkionen kommt eine besondere Bedeutung zu, da sie sich als essentiell für die Wirkung von AMPs gegen einige Mikroorganismen erwiesen haben.^{[55],[56]} Aufgrund der Wirksamkeit gegen multiresistente Keime ist ein tieferes Verständnis der genauen Struktur und der darauf beruhenden Wirkungsweise von DCD auch im Hinblick auf die Entwicklung artifizierender AMPs von großer Bedeutung.

Die Röntgenstruktur von DCD wurde 2012 mit einer Auflösung von $2,5 \text{ \AA}$ bestimmt, wozu es in zinkhaltigem Puffer kristallisiert wurde.^[57] Es wurde eine hexamere Struktur gefunden, bei der drei jeweils antiparallel angeordnete α -Helix Paare eine 8 nm lange und 4 nm breite zylindrische Kanalstruktur ausbilden (**Abb. 1-18**).

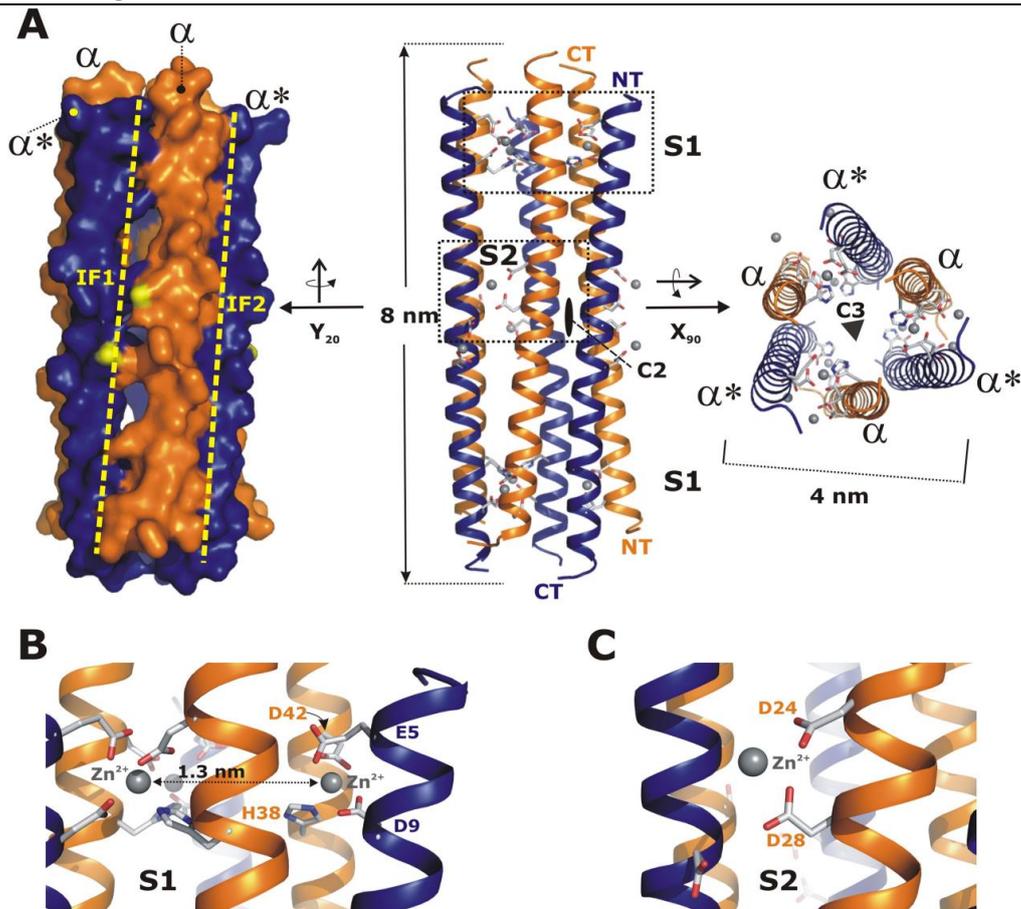


Abb. 1-18: Struktur der aktiven Konformation des AMPs Dermcidin (DCD).^[57] **A:** Je zwei 48 Aminosäuren lange α -helicale DCD-Monomere lagern sich antiparallel zu Dimeren zusammen. Je nach Orientierung von C-Terminus (CT) und N-Terminus (NT) sind die Monomere in blau oder orange dargestellt und mit α bzw. α^* bezeichnet. Drei dieser Dimere bilden ein über zwei unterschiedliche Kontaktflächen (*interface*, IF1 und IF2) verbundenes Hexamer von 8 nm Länge und 4 nm Durchmesser. An der Kontaktfläche IF1 sind die DCD-Dimere über Zinkionen verbunden. **B:** Struktur der Zinkbindungsstellen S1 an den Enden des Hexamers. **C:** Struktur der Zinkbindungsstelle S2 in der Mitte des DCD-Hexamers.

Die einzelnen Helices entsprechen den 48 Aminosäure langen DCD Monomeren. Sie sind in Abb. 1-18 A je nach Orientierung ihrer Termini (N-Terminus/NT bzw. C-Terminus/CT) orange oder blau dargestellt und mit α bzw. α^* benannt. Jedes Monomer interagiert über zwei unterschiedliche Kontaktflächen (*interface*, IF) mit den jeweils benachbarten Monomeren. Während IF2 hauptsächlich von Salzbrücken stabilisiert wird, zeigt sich bei atomarer Auflösung, dass IF1 durch mehrere Zn^{2+} -Ionen stabilisiert wird, die an geeigneten Stellen zwischen den Helices eingelagert sind.

Eine von zwei terminalen Zn^{2+} Bindungsstellen (S1) und die zentrale Bindungsstelle in der Mitte des Kanals (S2) sind in Abb. 1-18 B bzw. C vergrößert dargestellt. Die Zinkionen werden vor allem von den Seitenketten der unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen Asparaginsäure (Einbuchstabencode: D) sowie Histidinen (H) koordiniert, wobei sechs Zn^{2+} Ionen die negative Gesamtladung ($Q = -12e$) dieses Hexamers neutralisieren.

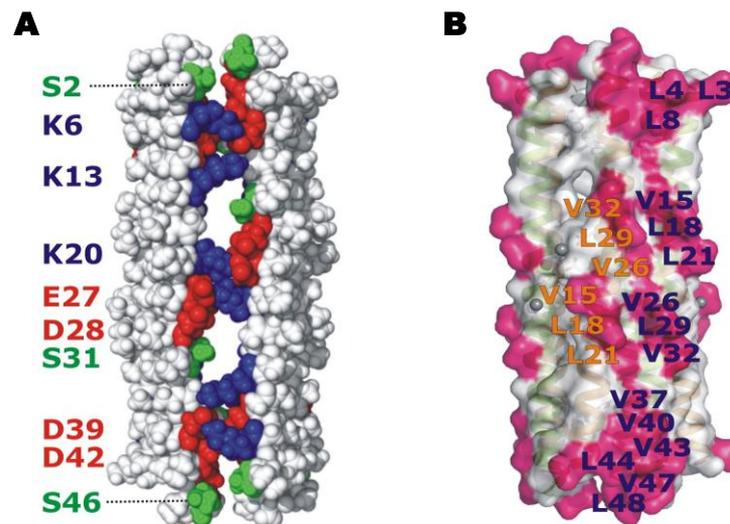


Abb. 1-19: Verteilung von polaren bzw. geladenen Aminosäureseitenketten und hydrophoben Seitenketten im DCD-Hexamer.^[57] **A:** Alle der insgesamt 96 polaren oder geladenen Seitenketten wie Serin (S, grün), Lysin (K, blau), Glutaminsäure (E, rot) und Asparaginsäure (D, rot) der sechs Untereinheiten sind dem Inneren des Hexamers zugewandt. **B:** Die dem hydrophoben Inneren der Lipidmembran zugewandte Außenseite des Hexamers besteht zu großen Teilen aus hydrophoben Seitenketten wie Leucin (L) und Valin (V). Die hydrophoben Bereiche der Proteinoberfläche sind zur Verdeutlichung pink dargestellt.

Weiterhin geht aus der Kristallstruktur hervor, dass alle der 96 insgesamt vorhandenen, ionisierbaren Seitenketten dem Inneren des Hexamers zugewandt sind (Abb. 1-19 A, blau, grün und rot), während die in funktionalem Zustand zum Membraninneren zeigenden Außenseite des Hexamers vor allem aus hydrophoben Aminosäuren besteht (Abb. 1-19 B, pink). Diese Ungleichverteilung von hydrophilen im Gegensatz zu hydrophoben Aminosäuren spricht für die antimikrobielle Wirkung dieses Peptids (vgl. *barrel-stave* Modell, Abb. 1-17). Molekulardynamische (MD)

Simulationen basierend auf diesen strukturellen Daten liefern eine theoretische Ionenleitfähigkeit von $G_{\text{th}} = (108 \pm 11)$ pS in 1 M NaCl.^[57]

1.6 Artificielle Lipidmembranen

In der pharmakologischen Forschung stellen Membranproteine momentan ca. 70 % aller Angriffspunkte (*targets*) der verwendeten Wirkstoffe dar.^[58] So stehen durch in Tumor- oder anderen pathologisch veränderten Zellen überexprimierte Membranproteine hervorragende *targets* z. B. für monoklonale Antikörper mit spezifischer Wirkung gegen diese Veränderungen zur Verfügung.^[59] Diese zentrale Rolle in der Entwicklung neuer Medikamente und verbesserter Therapien schwerer Krankheiten machen integrale Membranproteine zu einem besonders beachteten Gegenstand aktueller Forschung.

Bei Untersuchungen an nativen Membranen ist es durch das gleichzeitige Vorhandensein verschiedener Proteine in der Membran nahezu unmöglich, die spezifischen Eigenschaften nur eines bestimmten Proteins zu studieren. Daher wird *in vitro* die Strategie verfolgt, nur jeweils ein Proteintyp aus biologischem Gewebe zu extrahieren bzw. sie komplett zu synthetisieren und anschließend exklusiv in artifizielle Membransysteme neu einzubringen. Im Gegensatz zu wasserlöslichen Proteinen benötigen Membranproteine eine stark hydrophobe Umgebung, idealerweise jedoch eine Lipidmembran, um sich in ihre funktionelle Struktur falten zu können.^[60] Aufgrund des komplexen Aufbaus biologischer Membranen^[61] besteht eine besondere Herausforderung bei deren Nachahmung darin, eine der natürlichen möglichst genau nachempfundene Zusammensetzung bereitzustellen, da diese die Proteinstruktur und damit auch deren Funktion beeinflussen kann.^[62] So müssen aus ca. 1000 verschiedenen natürlich vorkommenden Lipiden geeignete Kombinationen gefunden werden, um beispielweise eine unterschiedliche Dicke der hydrophoben Bereiche von Lipidumgebung und inkorporiertem Membranprotein (*hydrophobic mismatch*) zu vermeiden (vgl. Abb. 1-20).^[63]

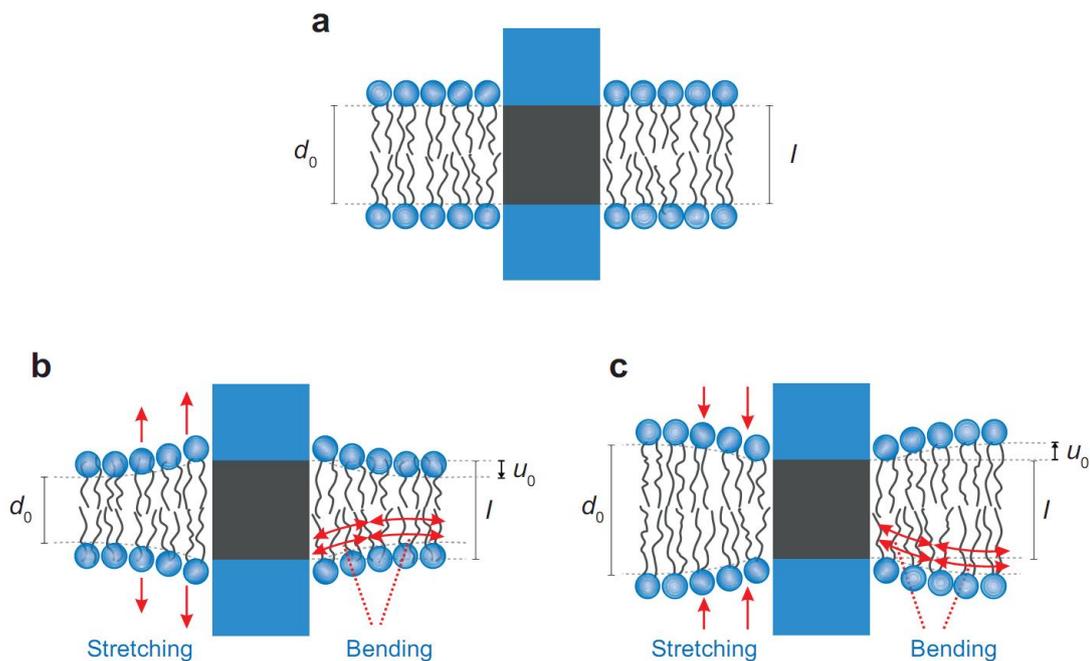


Abb. 1-20: Schematische Darstellung zur Veranschaulichung des Effekts von unterschiedlicher Dicke des hydrophoben Bereichs von Lipidmembran und inkorporiertem Membranprotein (*hydrophobic mismatch*).^[63] Ein integrales Membranprotein (Rechteck) ist schematisch in Lipidschichten mit unterschiedlich langen hydrophoben Alkanketten der beteiligten Lipide eingefügt. **A:** Der hydrophobe Bereich des Proteins (grau) stimmt in seinen Ausmaßen l mit der Dicke d_0 des hydrophoben Inneren der Lipidschicht überein. **B:** $d_0 < l$, Die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide werden vom hydrophoben Bereich des Proteins nach außen gedrängt (*stretching*). **C:** $d_0 > l$, Der hydrophile Bereich des Proteins (hellblau) schiebt die hydrophoben Seitenketten der Lipide zusammen (*stretching*). In beiden letztgenannten Fällen induziert der Dickenunterschied der hydrophoben Bereiche (*hydrophobic mismatch*, u_0) weiterhin eine Krümmung (*bending*) der Membran, beeinflusst so deren Mechanik und damit auch inkorporierte Membranproteine.^[62]

Für integrale Membranproteine, und hier insbesondere Ionenkanäle, muss weiterhin gewährleistet sein, dass sich zu beiden Seiten der Membran ein wässriges Kompartiment befindet. Andernfalls ließen sich keine Aussagen über den Transport bestimmter Moleküle oder eine eventuelle Modulation der Leitfähigkeit treffen. Seit Ende der 1950er Jahre wurden verschiedene Systeme entwickelt, um Membranproteine *in vitro* in artifiziellen Lipidmembranen untersuchen zu können.

1.6.1 Black Lipid Membranes

1963 beschrieben Mueller, Rudin *et al.* die Präparation von sogenannten *black lipid membranes* (BLMs).^[64] Der Name dieser Membranen rührt von ihrer Eigenschaft

1. Einleitung

her, in erfolgreich präpariertem Zustand bei Betrachtung unter dem Lichtmikroskop schwarz zu erscheinen (Abb. 1-21). Bei dieser Methode werden Lipide in organischen Lösungsmitteln wie Dekan oder Oktan gelöst und mit einem dünnen Pinsel (daher: *painten* von Membranen) oder einem Teflonstab über eine Öffnung in dünnen Glas- oder Teflonflächen appliziert. Diese Flächen trennen zwei Pufferreservoirire voneinander und weisen üblicherweise Öffnungen mit Durchmessern im Mikro- bis Millimeterbereich auf. Durch spontane Selbstorganisation der enthaltenen Lipide bilden sich die gewünschten Lipiddoppelschichten aus, wobei das Lösungsmittel vor allem in den Randregionen der Membranen als sog. Plateau-Gibbs-Grenze enthalten bleibt.

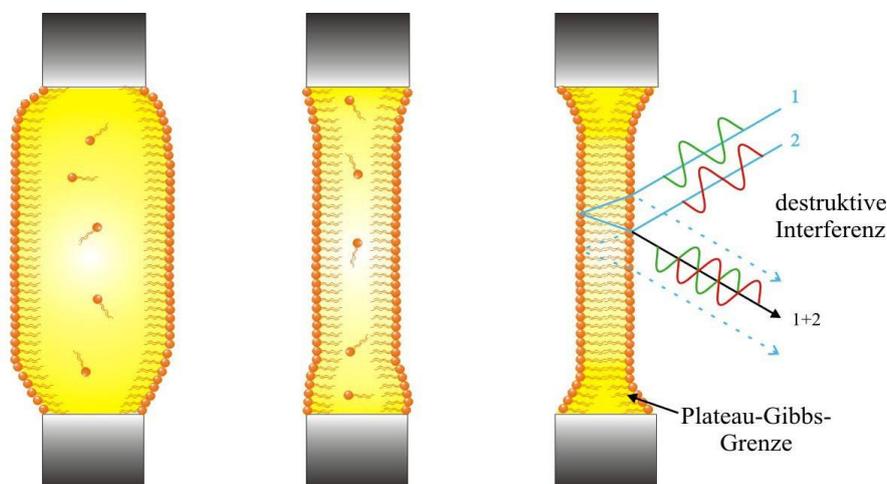


Abb. 1-21: Schematische Darstellung des Ausdünnens einer BLM. Die in organischem Lösungsmittel (gelb) gelösten Lipide (orange) organisieren sich zu einer Lipiddoppelschicht. Die komplett ausgebildete Membran erscheint im optischen Mikroskop aufgrund destruktiver Interferenz schwarz, restliches Lösungsmittel bleibt als Plateau-Gibbs-Grenze erhalten.^[65]

Obwohl die Präparation dieser Membranen unkompliziert ist und sie prinzipiell zur Untersuchung von Membranproteinen geeignet sind, weisen sie doch zwei entscheidende Nachteile auf. Zum einen besitzen sie durch die relativ großen von der Membran überspannten Poren eine geringe mechanische Stabilität, was sie sehr anfällig z. B. gegenüber Erschütterungen macht. Zum anderen beeinflusst das verbleibende Lösungsmittel die Membrandicke,^[66] ihre Mechanik^{[67],[68]} und damit letztlich auch die inkorporierten Membranproteine.^[69]

Eine Weiterentwicklung dieser Art der BLM-Präparation durch Montal und Mueller benutzt daher wesentlich leichter flüchtige Lösungsmittel wie Hexan oder Pentan, in denen Lipide beliebiger Zusammensetzung zunächst auf Puffer in zwei Messkammern gespreitet werden.^[70] Beide Kammern sind hier wieder durch eine dünne Teflonbarriere mit einer kleinen Öffnung getrennt. Befindet sich der Flüssigkeitsstand zu Beginn der Präparation unter dieser Öffnung, so wird er in deren Verlauf langsam auf ein Niveau über der Öffnung angehoben. Die mit ihren hydrophilen Kopfgruppen zur Flüssigkeit hin angeordneten Lipide können dann innerhalb der kleinen Öffnung mit ihren hydrophoben Alkylresten in Kontakt treten und eine Membran ausbilden. Zwar können so asymmetrisch zusammengesetzte Membranen mit geringerem Lösungsmittelanteil hergestellt werden, allerdings sind auch diese relativ instabil und nicht lösungsmittelfrei.

1.6.2 Unilamellare Lipidvesikel

Ein anderes Modellsystem zur *in vitro* Nachahmung von Lipidmembranen sind Lipidvesikel, welche sich auch prinzipiell zur Rekonstitution von Membranproteinen eignen.

Werden Lipide zunächst in geeigneter Weise getrocknet und anschließend rehydratisiert, schieben sich im zweiten Schritt Wassermoleküle des umgebenden Mediums zwischen die einzelnen Lipidschichten und bewirken eine Ablösung kugelförmiger Lipidaggregate. Bei diesem als *natural swelling* (engl. normales Anschwellen) bezeichneten Phänomen bilden sich zunächst vor allem im Falle von Phosphatidylcholin (PC) und anderen zwitterionischen Lipiden multilamellare Vesikel aus, bei denen mehrere Lipidschichten einen wässrigen Innenraum umkleiden.^[71] Um unilamellare Vesikel zu erzeugen, welche eine Lipiddoppelschicht imitieren, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Eine Behandlung mit Ultraschall führt beispielsweise zur Ausbildung von *small unilamellar vesicles* (SUVs) mit Durchmessern von 20-100 nm,^[72] während per Extrusion durch eine poröse Carbonatmembran *large unilamellar vesicles* (LUVs) in der Größenordnung von 100-1000 nm erhalten werden können.^[73] Weiterhin sind noch größere, sog. *giant unilamellar vesicles* (GUVs) über die Methode des *electroswelling* (engl.

1. Einleitung

Elektroformation) zugänglich,^[74] welche sich mit Durchmessern zwischen 1-100 μm im Bereich der Größe durchschnittlicher eukaryontischer Zellen bewegen.^[75] Je nach gewünschter Anwendung stehen also Modellsysteme zur Verfügung, die nicht nur über frei definierbare Zusammensetzungen ohne Lösungsmittel, sondern auch über einheitliche Größen und damit auch über jeweils erforderliche Krümmungen bzw. Oberflächenspannungen verfügen. Allerdings lassen sich elektrophysiologische Messungen nur bedingt durchführen, da der Innenraum einzelner Vesikel nicht (SUVs, LUVs) bzw. nur schlecht (GUVs) mittels Elektroden kontaktiert werden kann.

1.6.3 Porenüberspannende Membranen

Um die oben genannten Nachteile der bisherigen artifiziellen Membransysteme wie geringe Stabilität (BLMs) oder eingeschränkte Eignung für Untersuchungen an Ionenkanälen (GUVs) zu vermeiden, wurden für diese Art der Anwendung porenüberspannende Membranen entwickelt.^[76] Wird eine Lipiddoppelschicht auf einem porösen Substrat (siehe Abschnitt 3.3) aufgebaut, ist über die freitragenden Membranbereiche eine Zugänglichkeit beider Membranseiten zu den Pufferreservoirien gewährleistet, während die festkörperunterstützten Abschnitte der Membran gleichzeitig eine wesentlich höhere Stabilität gegenüber klassischen BLM-Systemen ermöglichen.

2 Zielsetzung

2.1 Das mitochondriale Porin VDAC1

Die Isoform 1 des *voltage dependent anion channel* (VDAC1) stellt mit ca. 10.000 Molekülen pro Mitochondrium das häufigste Protein in dessen äußerer Membran dar. Dieser Ionenkanal kann zwischen einem Zustand hoher Leitfähigkeit bei geringem Transmembranpotenzial U_m und einem Zustand geringer Leitfähigkeit bei $U_m \geq 30$ mV wechseln, was einen Effekt auf fundamentale Abläufe in einer Zelle hat.

Auf Basis der aktuell mit atomarer Auflösung bestimmten Struktur des VDAC1-Moleküls (Abteilung Prof. Griesinger, MPIBPC, Göttingen) ist man daher bestrebt, die molekularen Ursachen des Leitfähigkeitswechsel von VDAC1 zu verstehen.

Ziel dieser Arbeit ist es, elektrophysiologische Experimente am natürlich vorkommenden *wild type*-VDAC1 sowie verschiedenen Mutanten durchzuführen, um Informationen beispielsweise über die Spannungsabhängigkeit der Öffnungswahrscheinlichkeit des VDAC1 zu erhalten. Von besondere Bedeutung sind Experimente auf Einzelkanalebene, da nur bei dieser Art der Versuchsdurchführung die Eigenschaften eines einzelnen VDAC1-Moleküls erfasst und anhand der Struktur diskutiert werden können.

Als Modellsystem dienen zum einen lösungsmittelfreie Membranen, die durch das Spreiten von Lipidvesikeln über einer Pore in einer Borsilikatfläche erhalten werden können. Zum anderen soll hinsichtlich einer Automatisierung der VDAC1-Experimente die Möglichkeit untersucht werden, dieses Molekül in porenüberspannende Membranen einzubringen und es in diesen langzeitstabilen Systemen zu charakterisieren.

2.2 Das antimikrobielle Peptid Dermcidin

Weiterhin soll mithilfe lösungsmittelfreier Modellmembranen der Einfluss von Zn^{2+} -Ionen auf die Aktivität des antimikrobiellen Peptids Dermcidin (DCD) geklärt werden. Die Röntgenstruktur von DCD (Abteilung Prof. Zeth, MPIEB, Tübingen) zeigt ein DCD-Hexamer, welches eine Pore bildet, die von mehreren Zinkionen stabilisiert wird. Darauf basierende molekulardynamische Simulationen (Abteilung Prof. de Groot, MPIBPC, Göttingen) ergeben ohne die Beteiligung von Zn^{2+} eine Dissoziation des DCD-Hexamers.

Die antimikrobielle Aktivität dieser Peptidklasse besteht hauptsächlich in der Perforation ansonsten stabiler Lipidmembranen. Durch elektrophysiologische Experimente unter zinkfreien Bedingungen sowie in Anwesenheit von Zn^{2+} -Ionen soll die Bedeutung dieser Ionen für die Aktivität des DCD-Peptids und die damit verbundenen physiologische Relevanz der Röntgenstruktur geklärt werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Verwendete Lipide

3.1.1 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPhPC)

Das in der Natur lediglich in Archaeen vorkommende Phospholipid 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPhPC, $M = 846,25$ g/mol) besitzt zwei gesättigte Fettsäureketten (C16:0), die jeweils vierfach methyliert sind.^[77] Aufgrund dieser Modifikation zeigen Membranen, die aus DPhPC hergestellt wurden, keine Phasenumwandlung im Temperaturbereich zwischen -120 und $+80$ °C^[78] und zeichnen sich durch eine hervorragende Stabilität^[67] und elektrische Dichtigkeit aus.^[79] Allerdings sind die etwa 4,5 nm dicken Doppelschichten^[80] rigide, was eine Integration von Membranproteinen erschwert.^[81]

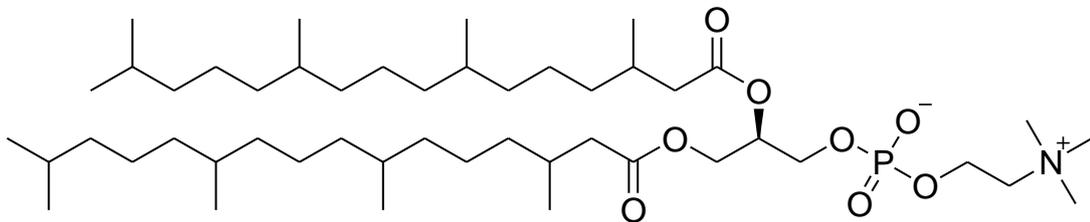


Abb. 3-1: Strukturformel von DPhPC.

3.1.2 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC)

Im Gegensatz zu DPhPC besitzt 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC, $M = 786,11$ g/mol) zwei unverzweigte Fettsäurereste mit je einer *cis*-Doppelbindung (C18:1 Δ^9). Durch diese relativ sperrige Form kann DOPC die Fluidität anderer Lipidmembranen (z. B. aus DPhPC) deutlich erhöhen. Allein bildet es Doppelschichten von ca. 5,5 nm Dicke aus.^[82]

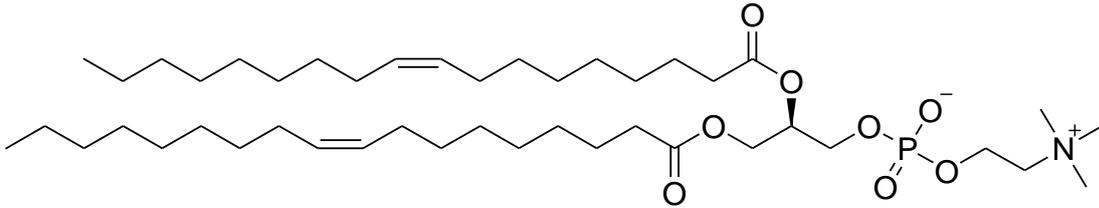


Abb. 3-2: Strukturformel von DOPC.

3.1.3 Cholesterol

Das Steroid Cholesterol ($M = 386,65 \text{ g/mol}$) lagert sich aufgrund seines amphiphilen Charakters in Lipidmembranen ein und beeinflusst deren physikalische und mechanische Eigenschaften stark,^{[67],[83]} wobei tierische Zellmembranen zu 23% aus Cholesterol bestehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde es, analog zu DOPC, verwendet, um die Insertion von Membranproteinen in starre DPhPC-Membranen oder -Vesikel zu erleichtern.

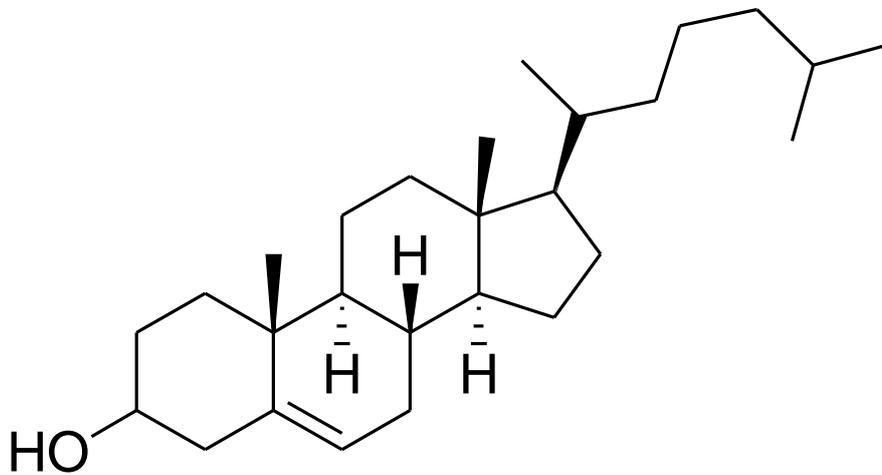


Abb. 3-3: Strukturformel von Cholesterol.

3.2 Herstellung poröser Aluminate

Da klassische, nur eine Pore mit relativ großem Durchmesser überspannende Lipiddoppelschichten (BLMs) erhebliche Nachteile in puncto Stabilität aufweisen, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch festkörperunterstützte Membranen auf porösen Substraten verwendet (Abschnitt 1.6.3).

3.2.1 Theoretische Grundlagen

Zur Präparation porenüberspannender Membranen wurde zunächst als Trägermaterial Aluminiumoxid mit einer hochgeordneten porösen Struktur aus hochreinem Aluminium durch dessen Anodisierung hergestellt.^[84-86] Aluminium lässt sich durch sein niedriges Reduktionspotential von $E = -1,676 \text{ V}$ ($\text{Al}^{3+} + 3 e^- \rightarrow \text{Al}$) leicht oxidieren, wobei es an Luft schnell von einer Aluminiumoxidschicht überzogen und so gegen eine weitere Oxidation passiviert wird. Durch das Anlegen einer hohen Spannung von $U = 40 \text{ V}$ lässt sich dieser Prozess weiter aufrecht erhalten, wobei sich durch die geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen die Eigenschaften des erhaltenen Oxids weitestgehend kontrollieren lassen.^[87] Auf molekularer Ebene findet eine Oxidation von Al zu Al^{3+} an der Metalloxidgrenzfläche statt, welches sich mit zu dieser Flächen diffundiertem O^{2-} zu Al_2O_3 verbindet. Das verwendete Aluminium bildet direkt die Anode, während die korrespondierende Reduktion von Protonen zu molekularem Wasserstoff an der in die Elektrolytlösung getauchte Kathode stattfindet.

Die dabei ablaufenden Prozesse sind in Abb. 3-4 A und B schematisch dargestellt, wobei der Stromverlauf einer solchen Anodisierung in **Abb. 3-4 C** gezeigt ist (nach: ^[88]). Wird an ein entsprechend vorbereitetes und daher fast oxidfreies Aluminiumplättchen (siehe Abschnitt 3.2.3) eine hohe Spannung angelegt, so kommt es sofort zur Ausbildung einer Barriereoxidschicht und damit zu einem rapiden Abfall des detektierten Stroms (C, Phase I).

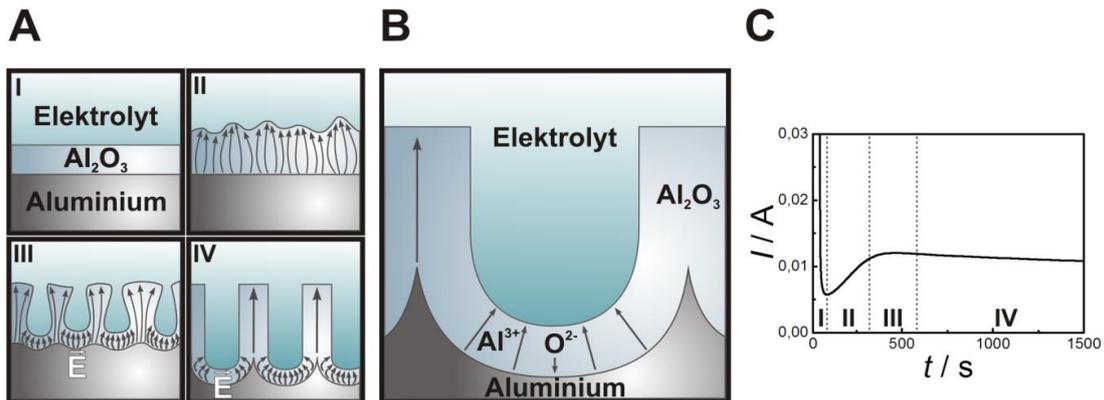


Abb. 3-4: Schematische Darstellung der bei der Herstellung poröser Aluminate auftretenden Prozesse (nach: ^[88]). **A:** Im das Aluminium bedeckenden Barriereoxid (I) entstehen durch geringe Unregelmäßigkeiten der Oberfläche Schwankungen in der Feldstärke E eines angelegten Potentials (II). Im Bereich hoher Feldstärken wird das Porenwachstum beschleunigt (III), wobei es aufgrund gegenseitiger Abstoßung zu einer hexagonalen Anordnung der tiefer werdenden Poren kommt (IV). **B:** Elektrophoretische Mobilität der beteiligten Ionen. Da das Aluminium als Anode geschaltet ist, wandern O^{2-} -Ionen aus der Lösung zum Aluminium und bilden dort das Oxid, während wiederum Al^{3+} in Lösung geht. **C:** Verlauf des vom applizierten Potential hervorgerufenen Stroms. Phasen I-IV entsprechen denen aus A. ^[89]

Auf Grund der Rauheit der Aluminiumoxidoberfläche ist diese Schicht nicht überall gleichmäßig dick. Das über diesen Bereich verlaufende elektrische Feld wird in den lokalen Minima der Schichtdicke fokussiert, wobei die Al-O Bindungen hier besonders stark polarisiert werden, was eine raschere Auflösung dieser Bereiche zur Folge hat. Während sich so zunächst weitgehend ungeordnete Poren bilden, wächst auch der Strom und die generelle Wachstumsrate des Aluminiumoxids an (Phase II). Die entstehenden Poren beeinflussen sich gegenseitig, während das kontinuierlich wachsende Oxid oberhalb für weitere mechanische Spannungen innerhalb des Materials sorgt (Phase III). Um diese Effekte zu minimieren, ordnen sich die wachsenden Poren schließlich annähernd hexagonal, also wabenförmig an, was den Idealfall für die 2D-Verteilung kreisförmiger Spezies darstellt (Phase IV). Der über längere Zeit zu beobachtende leichte Abfall des Stroms ist auf einen kontinuierlichen Verbrauch des Elektrolyten und damit auf die Abnahme seiner Konzentration zurückzuführen.

Prinzipiell lassen sich auf diese Weise poröse Substrate mit unterschiedlichen Eigenschaften herstellen. Der Ordnungsgrad der Poren lässt sich durch

unterschiedliche Wachstumsraten des Oxids steuern,^[84] während Porentiefe und damit auch Gesamtschichtdicke hauptsächlich von der Anodisierungsdauer abhängen. Die Dicke der Porenböden, der Porenabstand und vor allem der Durchmesser der Poren lassen sich durch die verwendete Anodisierungsspannung variieren. Weiterhin hat der verwendete Elektrolyt je nach seiner Fähigkeit, das gebildete Aluminiumoxid wieder auflösen zu können, einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis.^[90] So lassen sich Al₂O₃ Substrate in unterschiedlichen Dicken mit Porendurchmessern zwischen 20-240 nm herstellen.^[91]

3.2.2 Herstellung hochgeordneter Al₂O₃ Substrate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich 200 µm dicke Aluminiumoxidsubstrate verwendet, die Poren mit 60 nm Durchmesser enthielten.

Als Ausgangsmaterial diente hochreines Aluminium (99,999 %, Goodfellow, Bad Nauheim), welches bei einer Dicke von 0,5 cm in quadratische Stücke mit je 2 cm Kantenlänge zugeschnitten wurde. Diese Rohlinge wurden zunächst vor der eigentlichen Bearbeitung der Oberfläche für 3 h bei 500 °C unter Stickstoffatmosphäre getempert, um die Homogenität der Metallstruktur zu erhöhen. Die derart vorbereiteten Plättchen wurden in eine geeignete, säurebeständige Kammer aus Kunststoffen wie Polytetrafluorethylen (Teflon[®]) oder Polyoxymethylen (Delrin[®]) eingebaut. Es musste gewährleistet sein, dass die Oberfläche des Aluminiumsubstrats für die Herstellung poröser Aluminate zugänglich blieb, während die Unterseite mit der Anode des Aufbaus in Kontakt stehen musste. Zu diesem Zweck wurden die Plättchen direkt auf einen als Anode dienenden Kupferblock gelegt und mit einer becherförmigen Kunststoffform abgedeckt, welche Aussparungen definierter Größe in ihrem Boden enthielt. Dieser Aufbau konnte sowohl mittels einer Heizplatte erhitzt als auch über ein passgenaues, unterliegendes Peltierelement gekühlt werden. Als Kathode diente ein netzförmig angeordneter Platindraht, der in die für den jeweiligen Präparationsschritt notwendige Flüssigkeit (*vide infra*) getaucht war.

3.2.3 Elektropolieren

Da diese Aluminiumplättchen anfangs über eine relativ raue Oberfläche verfügten, wurden sie zunächst elektrochemisch poliert. Eine Behandlung mit einem Gemisch aus konzentrierter Schwefelsäure, 85 %iger Phosphorsäure und Reinstwasser im Massenverhältnis 1:1:1 als Polierlösung erreicht eine Verbesserung der Oberflächenrauigkeit vom Mikrometer- in den Nanometerbereich.^[89] Die Kammer wurde mit ca. 25 ml Polierlösung gefüllt und auf 65 °C erhitzt. Über eine Spannungsquelle wurden 24 V Gleichspannung über zunächst 10 min appliziert. Das entstehende Aluminiumoxid wird vom starken Säuregemisch direkt wieder aufgelöst und die Oberfläche so sukzessive geglättet. Die Lösung wurde anschließend erneuert und es wurde weitere 10 min bei 24 V anodisiert. Anschließend wurden die polierten Plättchen mehrfach gründlich, zuerst mit Reinstwasser, dann mit absolutem Ethanol gespült.

3.2.4 Vorstrukturierung / 1. Anodisierung

Zur Vorstrukturierung der Aluminate wurden jeweils vier polierte Aluminiumplättchen in eine oben beschriebene Kammer eingebaut und diese mit 0,3 M Oxalsäure gefüllt. Nach Abkühlung auf 1,5 °C wurde für 12 h eine Gleichspannung von 40 V angelegt, wobei die Elektrolytlösung kontinuierlich gerührt wurde. Der bei diesem Vorgang detektierte Strom musste dem in Abb. 1-7 C gezeigten Verlauf folgen. Die zunächst an der Oberfläche des Aluminats entstehenden, noch ungeordneten Poren weisen mit wachsender Tiefe der Poren einen zunehmenden Ordnungsgrad auf (vgl. Abschnitt 3.2.1).

3.2.5 Hauptstrukturierung / 2. Anodisierung

Die so vorstrukturierten Plättchen wurden mit Reinstwasser gespült und für 5 h in einem auf 65 °C temperierten Säurebad belassen. Die verwendete Chrom(VI)-Oxidlösung (1,8 Gew. % CrO₃ / 7,6 Gew. % H₃PO₄ in Reinstwasser) löst die obere Al₂O₃-Schicht mit ungeordneterer Porenstruktur ab, wobei idealerweise eine Aluminatoberfläche mit geordneten Porenkeimen übrig bleibt. Die so

vorbehandelten Plättchen wurden ein weiteres Mal für 5 d bei in Abschnitt 3.2.4 genannten Bedingungen anodisiert, was schließlich ca. 200 µm tiefe, hochgradig geordnete Poren lieferte.

3.2.6 Präparation siebartiger Aluminate

Um das gebildete Aluminiumoxid aus dem restlichen, nicht oxidierten Aluminium herauszulösen, wurde dieses in gesättigter HgCl_2 -Lösung zu AlCl_3 oxidiert und so in Lösung gebracht, während das Al_2O_3 nicht angegriffen wurde. Die so hergestellten Aluminate besitzen keine durchgängigen Poren, da auf ihrer Unterseite eine einige Mikrometer dicke Barriereoxidschicht verbleibt. Um diese zu entfernen, wurde das Aluminiumoxid der Porenböden, wie in **Abb. 3-5** gezeigt, in Phosphorsäure (10 Gew. % H_3PO_4) aufgelöst, wobei siebartige Strukturen erhalten wurden. Der betreffende Bereich des Aluminats wurde dazu zwischen zwei Teflonkammern mit je einer Öffnung beliebiger Größe (normalerweise im Millimeterbereich) in der Seitenwand platziert, fixiert und 90 min bei 30 °C mit Säure behandelt. Die komplette Auflösung der Porenböden konnte per Impedanzspektroskopie überprüft werden (siehe Abschnitt 4.2.).

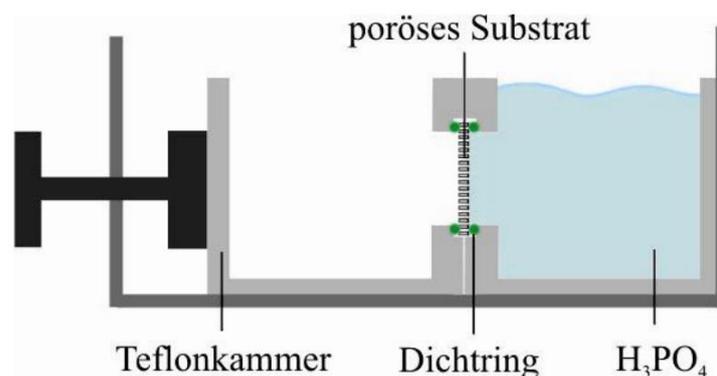


Abb. 3-5: Schematische Darstellung des zum Auflösen verbliebenen Barriereoxids verwendeten Aufbaus. Das Substrat wird zwischen zwei Teflonkammern mit Öffnungen mit Durchmessern im Bereich von 1 mm bis 5 mm gespannt. Das an den Porenböden verbliebene Barriereoxid wird durch Phosphorsäure aufgelöst, wobei siebartige Strukturen frei definierbaren Durchmessers entstehen.^[65]

3.3 Präparation porenüberspannender Membranen

3.3.1 Vorbereitung und Funktionalisierung der Substrate

Die durchgängig porösen Aluminiumoxidsubstrate wurden standardmäßig 10 min in einem Argonplasma (*Plasma Cleaner PDC 32 G-2*, Harrick Scientific Products Inc., Pleasantville, NY, USA) gereinigt^[92] und mit einer 2,5 nm dünnen Schicht Titan als Haftvermittler, gefolgt von einer 25 nm dicken Schicht Gold mittels eines Kathodenzerstäubers (*Sputter Coater 108 auto*, Cressington Scientific Instruments Ltd., Watford, UK) beschichtet. Die Goldoberfläche wurde anschließend 120 s mit Sauerstoffplasma behandelt, um im Folgenden eine ideal saubere Oberfläche zu gewährleisten.^[93] Durch Inkubation in einer 1 mM Tetradekanthiollösung (TDT) in absolutem Ethanol konnte eine hydrophobe Substratoberfläche erzeugt werden. Die Thiolgruppe des TDTs bilden eine stabile quasikovalente Bindung mit der Goldoberfläche aus, wobei die Alkanketten der TDT-Moleküle sich vom Substrat wegzeigend anordnen. Weiterhin wurde zur Funktionalisierung der Substrate das Cholesterolderivat Cholesterylpolyethylenoxythiol (CPEO3) benutzt, welches über seinen Cholesterinrest in eine sich ausbildende Lipiddoppelschicht integrieren kann (**Abb. 3-6**). Durch den hydrophilen Linker zur Thiolgruppe wird die Membran von der Oberfläche entkoppelt, was ihre Beweglichkeit relativ zum Substrat und damit ihre Stabilität z. B. gegenüber Erschütterungen erhöht. Es wurde eine 1 mM CPEO3-Lösung in absolutem *n*-Propanol verwendet, die Funktionalisierung wurde generell bei 4 °C über Nacht durchgeführt.

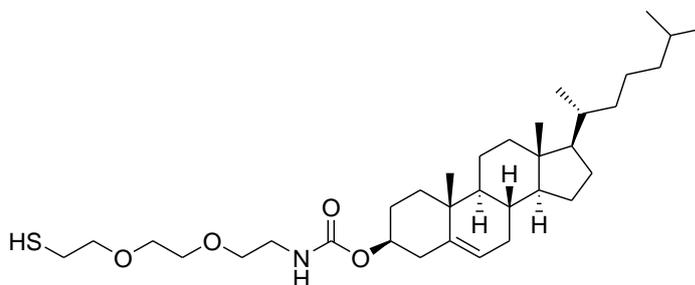


Abb. 3-6: Strukturformel von CPEO3.

3.3.2 Aufbringen der Membran auf die Substrate

Auf den durch Chemisorption funktionalisierten Oberflächen wurden entweder LUVs gespreitet^[94] oder Membranen mit der *painting*-Technik erzeugt.^[76]

Bei der Präparation per *painting*-Technik^[64] wurden 10-20 mM Lösungen des Lipids DPhPC, gelöst in *n*-Dekan, *n*-Oktan oder 1:1 (v/v)-Gemischen dieser beiden Lösungsmittel verwendet. Die mit absolutem Ethanol gründlich abgespülten funktionalisierten Substrate wurden im Stickstoffstrom getrocknet, in eine Messkammer eingebaut und diese mit Elektrolytlösung befüllt. Mit einer Pipette wurden typischerweise 7,5 µl der gewünschten Lipidlösung auf das Substrat „geschossen“ (vgl Abschnitt 1.6.1).

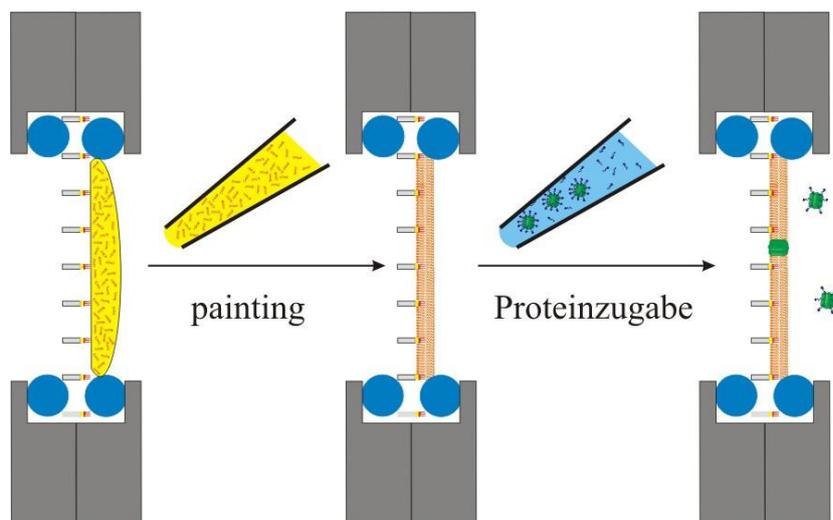


Abb. 3-7: Schematische Darstellung der Präparation porenüberspannender Membranen per *painting*-Technik. Lipid (orange) in organischen Lösungsmitteln (gelb) wie Dekan oder Oktan wird auf die funktionalisierte Oberfläche des Substrats appliziert. Das Substrat ist zwischen zwei Messkammern (in grau angedeutet) mittels Dichtringen (blau) fest eingespannt. Werden in die Nähe der entstandenen Membran solubilisierte Membranproteine gegeben, inserieren einige spontan aufgrund ihres hydrophoben Charakters.^[65]

Um den Auftrag der Lipidlösung und das sukzessive Ausdünnen der Membran impedanzspektroskopisch (Abschnitt 3.4) verfolgen zu können, wurde die Impedanz des Systems bei einer festen Frequenz von 1 MHz gegen die Zeit gemessen. An einem sprunghaften Anstieg des Realteils der Impedanz bei Applikation der Lipidlösung, gefolgt von einem kontinuierlichen Abfall zurück auf den

3. Materialien und Methoden

Ausgangswert konnte so das Ausdünnen (siehe Abschnitt 1.6.1) beobachtet werden. Die entstandene Membran konnte anschließend durch die Aufnahme eines kompletten Spektrums genau charakterisiert werden.

Zu einer erfolgreich präparierten Membran wurden dann geringe Mengen des Membranproteins VDAC1 gegeben, welches durch Detergensmizellen bestehend aus *N*-Lauryl-*N,N*-dimethylamin-*N*-oxid (LDAO) in Lösung gehalten wurde. In diesem Schritt wurde das Detergens schlagartig auf ein Niveau unterhalb seiner kritischen Mizellbildungskonzentration verdünnt und die Mizellen damit aufgelöst, wodurch einige der Ionenkanäle spontan in die Membran integrierten.

3.4 Elektrochemische Impedanzspektroskopie

Da biologische Membranen in ihrer Eigenschaft als natürliche Barriere zwischen einzelnen Zellen bzw. Zellorganellen ein resistives und kapazitives Verhalten aufweisen, ist eine Untersuchung ihrer Qualität und Eigenschaften per elektrochemischer Impedanzspektroskopie (EIS) möglich. Hierbei wird die Membran einem Wechselfeld mit niedriger sinusförmiger Spannungsamplitude ausgesetzt. Durch Variation der verwendeten Frequenz vom Megahertzbereich bis hinunter in die Größenordnung einiger Millihertz erlaubt es, über geeignete Ersatzschaltbilder Informationen über die kapazitiven und resistiven Eigenschaften der untersuchten Membran zu erhalten.

3.4.1 Physikalische Grundlagen

Wird in Abhängigkeit von der Zeit t und der Kreisfrequenz ω eine Wechselspannung $U(\omega, t)$ über eine Membran appliziert, so kann ein frequenz- und zeitabhängiger Strom $I(\omega, t)$ detektiert werden.

Diese Größen lassen sich sinnvoll in der Gaußschen Zahlenebene als:

$$U(\omega, t) = U_0 \cdot e^{i\omega t}, \quad (3-1)$$

bzw.

$$I(\omega, t) = I_0 \cdot e^{i(\omega t - \varphi(\omega))} \quad (3-2)$$

darstellen. Der Phasenwinkel $\varphi(\omega)$ definiert die Verschiebung zwischen Wechselfspannung und Wechselstrom. Analog zum für den Gleichstromfall geltenden Ohmschen Gesetz, welches den Widerstand R als Quotient der Spannung U und des Stroms I definiert ($R = U / I$), ergibt sich auch die für den Wechselstromfall auftretende Impedanz Z nach:

$$Z(\omega) = \frac{U(\omega, t)}{I(\omega, t)} = \frac{U_0 \cdot e^{i\omega t}}{I_0 \cdot e^{i(\omega t - \varphi(\omega))}} = |Z(\omega)| \cdot e^{i\varphi(\omega)}. \quad (3-3)$$

Ein Nyquist-Diagramm (**Abb. 3-8**) zeigt den Realteil Z^{re} (Wirkwiderstand) und den Imaginärteil Z^{im} (Blindwiderstand) der Impedanz Z :

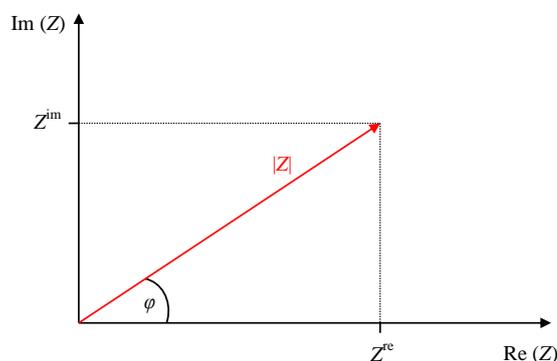


Abb. 3-8: Nyquist-Diagramm zur Veranschaulichung des Zusammenhangs zwischen dem Wirkwiderstand (Z^{re}), dem Blindwiderstand (Z^{im}), dem Phasenwinkel φ und dem Betrag der Impedanz $|Z|$.

3. Materialien und Methoden

Nach Pythagoras ergibt sich der Betrag der Impedanz $|Z(\omega)|$ zu:

$$|Z(\omega)| = \sqrt{(Z^{re}(\omega))^2 + (Z^{im}(\omega))^2} \quad (3-4)$$

Auch der Phasenwinkel φ ist so aus der geometrischen Beziehung von Z^{re} und Z^{im} zugänglich:

$$\varphi(\omega) = \arctan\left(\frac{Z^{im}(\omega)}{Z^{re}(\omega)}\right) \quad (3-5)$$

Wird eine Wechselspannung U_{AC} an ein System angelegt, so weisen verschiedene beteiligte Elemente unterschiedliche charakteristische Merkmale auf. Der kapazitive Widerstand eines Kondensators ergibt sich frequenzabhängig nach $Z(\omega) = (i\omega C)^{-1}$, während sich der Phasenwinkel zwischen Strom und Spannung idealerweise um $-\pi/2$ verschiebt, also $\varphi = -90^\circ$ gilt. Ein Ohmscher Widerstand hingegen zeigt frequenzunabhängig stets eine Impedanz von $Z = R_{ohm}$ bei einem Phasenwinkel von $\varphi = 0^\circ$.

3.4.2 Elektrische Beschreibung festkörperunterstützter Membranen

Um die Parameter der untersuchten Membran quantifizieren zu können, müssen geeignete Ersatzschaltbilder aus Komponenten bekannten Verhaltens an die erhaltenen Daten angeglichen werden. Neben ihrer Funktion als ohmscher Widerstand besitzt eine biologische Membran auf Grund ihres spezifischen Aufbaus auch kapazitive Eigenschaften. Die Kapazität einer Membran C_m lässt sich analog zu der eines Kondensators nach:

$$C_m = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r A}{d} \quad (3-6)$$

abschätzen. Die betrachtete Fläche A und Dicke d der Membran werden im Wesentlichen vom Versuchsaufbau determiniert, während die Permittivität des Vakuums ε_0 eine Konstante ist. Die Permittivität ε_r der relativ apolaren Alkanketten der Lipide unterscheidet sich mit Werten von $\varepsilon_r \approx 2,4$ stark von denjenigen der polaren Kopfgruppen, welche sich je nach Hydratisierungsgrad im Bereich von $\varepsilon_r = 25-60$ bewegen. Da sich in Reihenschaltung jeweils die Kehrwerte mehrerer beteiligter Kapazitäten zum Kehrwert der Gesamtkapazität addieren und weiterhin die Ausdehnung des apolaren Inneren der Lipiddoppelschicht mit ca. 3-4 nm deutlich größer ist, als die der hydrophilen Kopfgruppen ($d = 0,6 - 1$ nm), dominieren die hydrophoben Seitenketten der Lipide die kapazitiven Eigenschaften einer Membran.^[95]

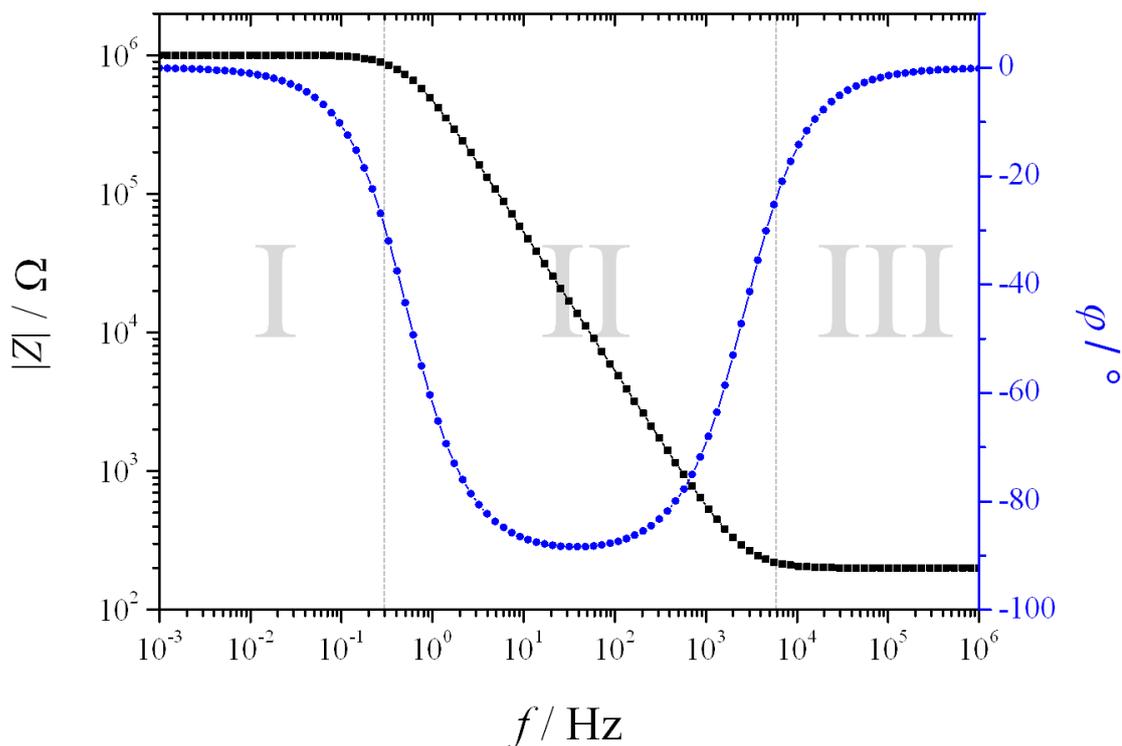


Abb. 3-9: Ideales Bode-Diagramm der elektrischen Eigenschaften einer Membran mit $R_m = 1 \text{ M}\Omega$ und $C_m = 0,3 \text{ }\mu\text{F}$. Es lassen sich zwei Bereiche nahezu ideal resistiven (I + III) und ein Bereich kapazitiven Verhaltens (II) unterscheiden. Für ohmsche Widerstände beträgt der Phasenwinkel $\varphi(\omega) = 0^\circ$, während der Betrag der Impedanz $|Z|$ frequenzunabhängig ist. Ein frequenzabhängiges Verhalten von $|Z|(f)$ sowie ein Phasenwinkel von $\varphi(f) = -90^\circ$ kennzeichnen eine Kapazität.

3. Materialien und Methoden

Abb. 3-9 zeigt das Ergebnis der Simulation einer Membran mit einem Widerstand von $R_m = 1 \text{ M}\Omega$ und einer Kapazität von $C_m = 0,3 \text{ }\mu\text{F}$, aufgetragen als Bode-Diagramm. Bei dieser Art der Darstellung wird der Verlauf des Betrags der Impedanz $|Z|(f)$ und der korrespondierende Phasenwinkel $\varphi(f)$ gegen die Frequenz f aufgetragen, welche bei diesem Aufbau typischerweise im Bereich von 1 MHz bis 1 mHz variiert wird. Die resultierenden Graphen der Impedanz und des Phasenwinkels lassen sich in drei charakteristische Bereiche (I-III) unterteilen. In den Bereichen I und III lassen sowohl der vollkommen frequenzunabhängige Verlauf der Impedanz als auch der nahe bei 0° verlaufende Phasenwinkel den Schluss zu, dass es sich um Frequenzbereiche handelt, die sich durch einen ohmschen Widerstand beschreiben lassen. Der Impedanzbetrag bei niedrigen Frequenzen zeigt die Summe aus Membranwiderstand R_m und Elektrolytwiderstand R_{el} an, während für hohe Frequenzen nur der Widerstand des zur Messung verwendeten Elektrolyten R_{el} detektiert wird. Im Bereich mittlerer Frequenzen sinkt $\varphi(\omega)$ auf bis zu -90° , was charakteristisch für kapazitives Verhalten ist. Der stark frequenzabhängige Verlauf der Impedanz in Bereich II unterstützt dies, da sich der kapazitive Widerstand im Wechselstromfall nach $Z = (i\omega C)^{-1}$ berechnet. Auf Basis dieser drei Elemente ergibt sich ein Ersatzschaltbild, welches die beiden Membranparameter R_m und C_m parallel angeordnet enthält, während der Widerstand des Elektrolyts R_{el} dazu in Reihe geschaltet ist (Abb. 3-10).

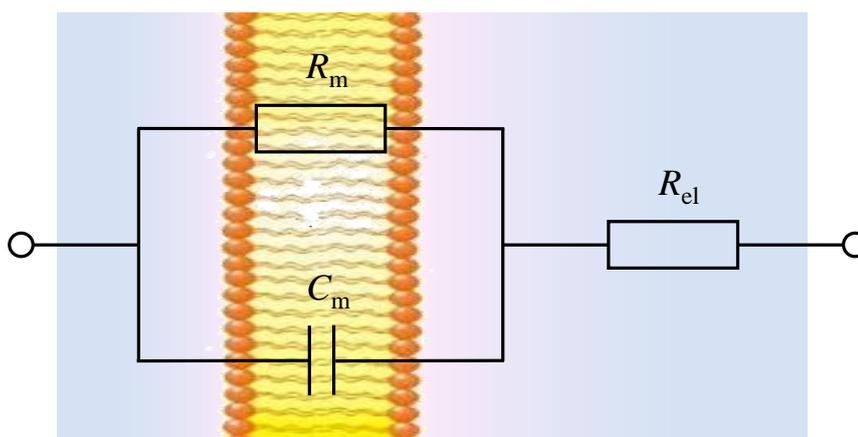


Abb. 3-10: Ersatzschaltbild einer Membran. Der Membranwiderstand R_m und die Membrankapazität C_m sind parallel geschaltet, der Widerstand des Elektrolyten R_{el} steht hierzu in Serie.

Zusammenfassend wird diese Anordnung als $R(RC)$ -Schaltbild abgekürzt, während eine Reihenschaltung eines Kondensators und eines Ohmschen Widerstands analog hierzu als CR -Schaltbild bezeichnet wird. Die ebenfalls vorhandenen Kapazitäten der Elektroden sind vergleichsweise groß und können daher nicht detektiert werden.

Über die Anpassung der Parameter des Ersatzschaltbilds an die Daten mittels eines *nonlinear least square fit* lassen sich intrinsische Parameter der untersuchten Membran quantitativ bestimmen. Es wurden Spektren im Frequenzbereich von 1 mHz bis 1 MHz bei einer Wechselspannung der Amplitude $U_m = 30$ mV und einer Auflösung von fünf Datenpunkten pro Dekade aufgenommen.

3.5 Patch clamp-Experimente

Während erste Untersuchungen elektrischer erregbarer Körperzellen bereits im 19. Jahrhundert durchgeführt wurden,^[96] gehen genauere Beschreibungen der auftretenden Ströme und Effekte auf Arbeiten aus der Mitte des 20. Jahrhunderts zurück.^[97] Eine zentrale Rolle nahmen dabei Ionenkanäle ein, welche zunächst hauptsächlich mit der von Sakmann und Neher entwickelten *patch clamp*-Technik (Nobelpreis 1991) charakterisiert wurden. Bei dieser Technik werden kleine Membranbereiche (*patches*) durch Ansaugen mittels einer dünnen Glaspipette elektrisch von der restlichen Membran isoliert, was eine Untersuchung der Ströme durch enthaltene Kanalproteine ermöglicht. Hierbei wird zwischen einer Messung aller in der Zellmembran enthaltenen Spezies (*whole-cell mode*) und der Messung nur der Proteine in diesem *patch* (*inside-out*) unterschieden (Abb. 3-11).

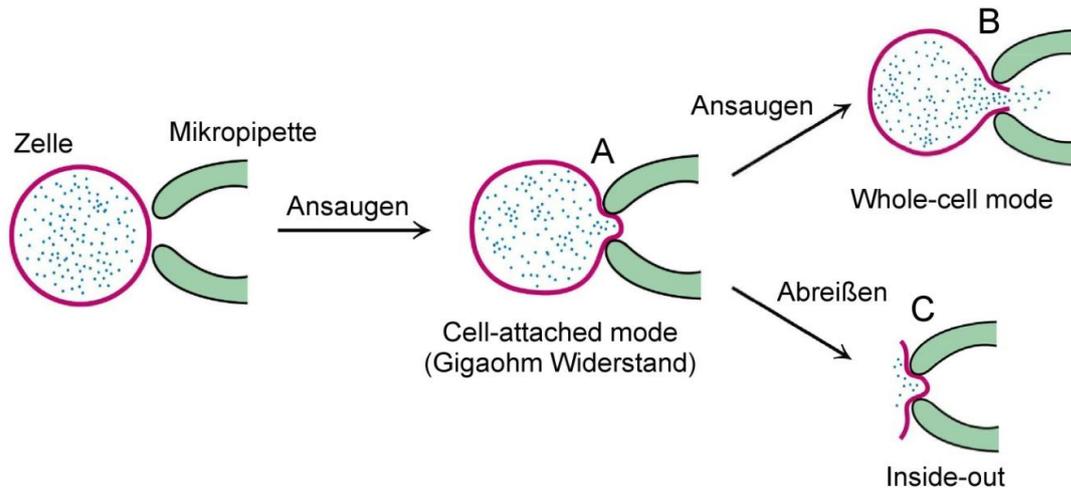


Abb. 3-11: Schematische Darstellung des Ablaufs eines *patch clamp*-Experiments.^[98]

Da dieser Versuchsaufbau relativ anfällig und kompliziert zu handhaben ist, wurde das Grundprinzip für Messungen an artifiziellen Lipidmembranen weiterentwickelt.

3.6 Einzelkanalmessung in artifiziellen Lipidmembranen

Integrale Membranproteine benötigen im Gegensatz zu wasserlöslichen Proteinen eine hydrophobe Umgebung, um in ihrer natürlichen und damit auch funktionellen Form vorliegen zu können (Abschnitt 1.6).^[60] Für Untersuchungsmethoden wie NMR oder CD (Abschnitt 3.9) werden die Proteine beispielsweise in Detergenzmizellen eingelagert, um die Proteine in wässrigen Medien löslich zu machen und gleichzeitig ihre Struktur zu stabilisieren.^[99] Ein weitergehender Ansatz bedient sich sogenannter *Nanodiscs*, also Bizellen aus Phospholipiden und stabilisierenden Proteinstrukturen mit Größen im Nanometerbereich zur Rekonstitution der Membranproteine, um ihrer natürlichen Umgebung näher zu kommen.^[100]

Obwohl mit diesen Vorgehensweisen eine Untersuchung der Struktur und anderer Parameter möglich ist, eignen sie sich nicht für elektrophysiologische Experimente. Für Messungen eines Stroms durch einen Ionenkanal ist es von fundamentaler

Bedeutung, dieses Protein in eine ansonsten elektrisch isolierende Umgebung einzubetten.

3.6.1 Aufbau und Durchführung eines Einzelkanalexperiments

Das Grundprinzip eines Einzelkanalexperiments besteht in der Applikation einer Spannung U über eine Membran und darin enthaltenen Membranproteinen. Der aus dieser Transmembranspannung U_m resultierende Strom I wird kontinuierlich aufgezeichnet und liefert so Informationen über die untersuchten Kanalproteine. Die Transmembranspannung $U_{m,soll}$ wird von einem Signalgenerator ausgegeben und über Haupt- und Vorverstärker über die Membran appliziert (Axopatch 200B setup, Axon Instruments, USA). Fließt ein Strom über die Membran, wird die tatsächlich anliegende Spannung U_m verringert, was detektiert und wiederum durch eine Rückkopplungsschleife kompensiert wird. Dieses Signal wird kontinuierlich ausgelesen, durch einen A/D-Wandler digitalisiert und schließlich mit frei wählbarer zeitlicher Auflösung (*sampling rate*) gespeichert (Abb. 3-12). Die Skalierung des Signals kann durch verschiedene Verstärker (*gains*) optimal auf die 16-Bit Auflösung des Detektors angepasst werden und jeweils in geeigneter Weise gefiltert werden, um ein für jedes Experiment ideales Signal- zu Rauschverhältnis (*signal-to-noise ratio*) zu gewährleisten.

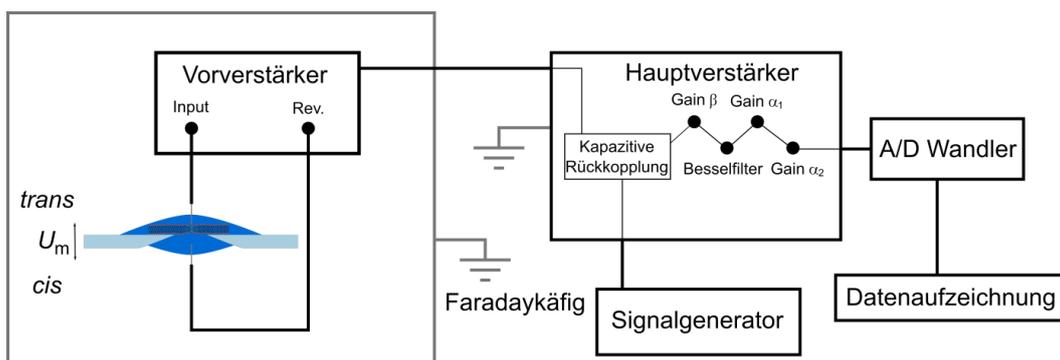


Abb. 3-12: Schematischer Aufbau eines *patch clamp*-Experiments an einer artifiziellen Lipidmembran.

Die Detektion des Signals erfolgt durch einen hochohmigen, aktiv durch ein Peltierelement gekühlten elektrischen Vorverstärker, welcher direkt mit den

3. Materialien und Methoden

Messelektroden verbunden ist. Die Elektroden befinden sich auf beiden Seiten der Membran und sind üblicherweise als Ag/AgCl-Elektroden ausgeführt (Abschnitt 3.8.2). Diese Bauteile sind durch einen Faradaykäfig gegen äußere Einflüsse weitgehend abgeschirmt und ermöglicht so die Detektion von Strömen im Pikoamperebereich.

Im Falle poröser Aluminate wurden die Messungen durchgeführt, indem die Messelektroden in zwei Pufferlösung enthaltende Teflonkammern zu beiden Seiten der Substrate platziert wurden (**Abb. 3-13**). Diese Kammer sowie der Vorverstärker der Messapparatur mit den Elektroden wurden in einem Faraday-Käfig platziert und gegen Erschütterungen abgeschirmt.

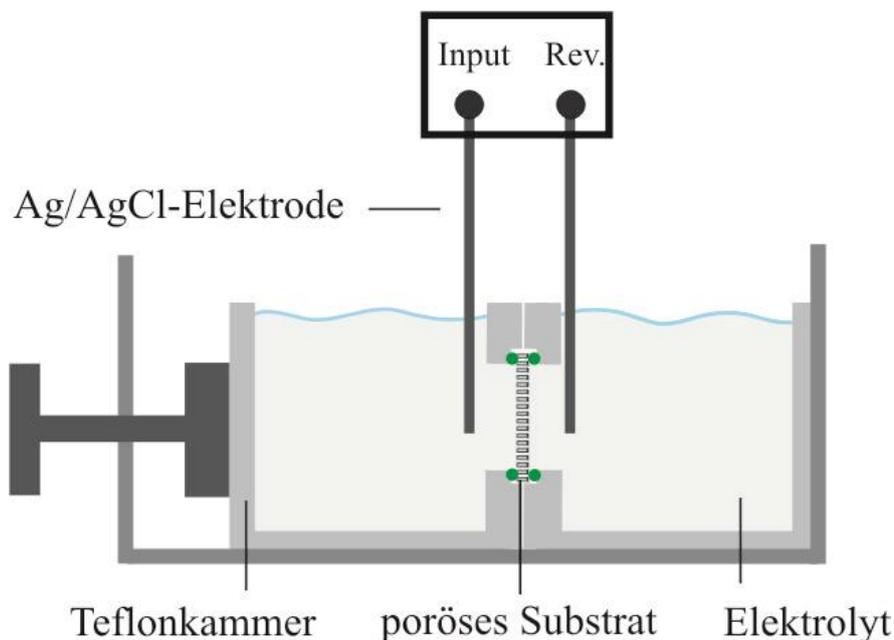


Abb. 3-13: Aufbau eines Einzelkanalexperiments im Falle poröser Aluminate als Substrat für die Membranpräparation. Das Substrat ist vertikal zwischen zwei Teflonkammern platziert, wobei Dichtringe (grün) zu beiden Seiten des Substrats und das Zusammendrücken der Kammer über eine Stellschraube (dunkelgrau) das Auftreten von Leckströmen verhindern.^[65]

3.6.2 Messmodus *voltage clamp*

Um einen Stromfluss durch eine Membran bzw. einen Ionenkanal untersuchen zu können, muss (bei identischem Puffermedium zu beiden Seiten der Membran) prinzipiell ein Transmembranpotenzial U_m vorhanden sein, welches einen Strom I hervorruft (*vide supra*). Ist diese Spannung während der Messung konstant, so handelt es sich um ein *voltage clamp*-Experiment.

Zeigt ein in der Membran enthaltener Ionenkanal Aktivität, so äußert sich dies typischerweise in sprunghaften Veränderungen im detektierten Stromsignal, was in **Abb. 3-14** exemplarisch dargestellt ist.



Abb. 3-14: Sprünge im detektierten Stromsignal, aufgenommen bei einer Transmembranspannung von $U_m = -50$ mV.

Es treten zwei konstante Stromniveaus unterschiedlichen Betrags auf, zwischen denen das Protein kontinuierlich wechselt. Obwohl in diesem Beispiel eine *sampling rate* von 50 kHz benutzt wurde, erscheinen diese Wechsel als senkrechte Stufen im Signal, da die zugrundeliegenden molekularen Veränderungen des Proteins extrem schnell ablaufen und daher in einem 200 μ s-Intervall nicht aufgelöst werden können.

Aufnahmen dieser Art wurden mithilfe des *single channel searches* der Software Clampfit (Version 10.2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) ausgewertet, wobei zunächst manuell verschiedene Stromniveaus vorgegeben werden mussten. In **Abb. 3-15** ist dies durch eine blaue Linie auf dem Niveau des offenen (o) und eine rote Linie auf dem Niveau des geschlossenen Zustands (c) angedeutet. Der offene Zustand befindet sich in diesem Fall „unter“ dem geschlossenen, da dieser Datensatz bei einem negativen Potential von $U_m = -50$ mV aufgenommen wurde.

3. Materialien und Methoden

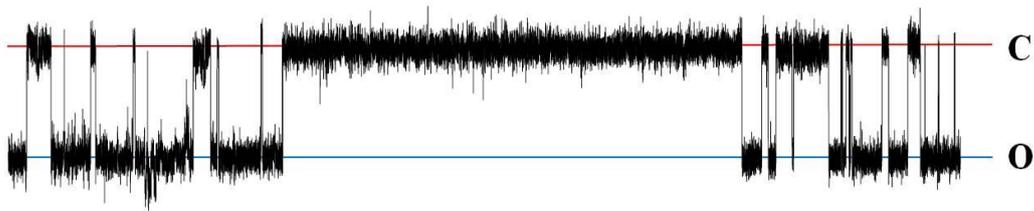


Abb. 3-15: Manuelle Vorgabe zweier Niveaus zur anschließenden automatischen Auswertung der Sprünge im Signal. Das Stromniveau des geschlossenen Zustands (*closed, c*) ist durch eine rote Linie angegeben, das des offenen Zustands (*open, o*) durch eine blaue. Das Niveau des offenen Zustands befindet sich „unter“ dem des geschlossenen Zustands, da der Datensatz bei einem negativen Transmembranpotenzial von $U_m = -50$ mV aufgenommen wurde.

Sprünge zwischen diesen Niveaus wurden von der Software innerhalb gewisser Toleranzen automatisch detektiert, wobei Parameter wie Sprungamplitude, Verweildauer im jeweiligen Zustand und Gesamtanzahl der Sprünge kontinuierlich aufgezeichnet wurden.

Die Leitfähigkeit G anwesender Ionenkanäle ist als der Kehrwert des resultierenden Membranwiderstands R_m definiert und lässt sich analog zum Ohmschen Gesetz nach:

$$G = \frac{1}{R_m} = \frac{\Delta I}{U_m} \quad (3-7)$$

aus der Differenz der gemittelten Stromwerte des jeweiligen Sprunges ΔI und der konstant gehaltenen Transmembranspannung U_m bestimmen. Im Bereich physiologisch relevanter Transmembranpotenziale in der Größenordnung von $U_m = 0-100$ mV sind daher Membranwiderstände im Gigaohmbereich notwendig, um die auftretenden Ströme im Pikoamperebereich überhaupt erfassen zu können.

Neben den Leitfähigkeiten verschiedener Zustände lassen sich aus solchen Aufnahmen weiterhin die genauen Zeiten bestimmen, die sich der Kanal im jeweiligen Zustand befindet, was eine Bestimmung der Öffnungswahrscheinlichkeit P_o ermöglicht. Auch die Differenz der Leitfähigkeiten ΔG zwischen zwei Zuständen ist direkt zugänglich. Stehen eine statistisch sinnvolle Anzahl an

Übergangsereignissen zur Verfügung, lassen sich weiterhin Aussagen bezüglich der Übergangsraten k zwischen verschiedenen Zuständen machen.

3.7 Port-a-Patch

Eine Weiterentwicklung der klassischen *patch clamp*-Technik (Abschnitt 3.5) wird als *planar patch clamp* bezeichnet^[101] und im Port-a-Patch Aufbau der Firma Nanion (München) angewandt.^[102] In diesem Gerät befindet sich ein horizontal liegender Borsilikatchip zwischen zwei wässrigen Kompartimenten. Der Chip enthält eine Pore mit einem Durchmesser von 1-5 μm , über welche mittels einer computergesteuerten Pumpe von der *trans*-Seite her ein Unterdruck von 10-50 mbar angelegt werden kann. Werden GUVs in den Puffer auf der Oberseite des Chips gegeben, so werden sie in Richtung der Pore gezogen. Bei Berührung mit der Borsilikatoberfläche spreiten die Vesikel und formen so eine lösungsmittelfreie Lipiddoppelschicht über der Pore.

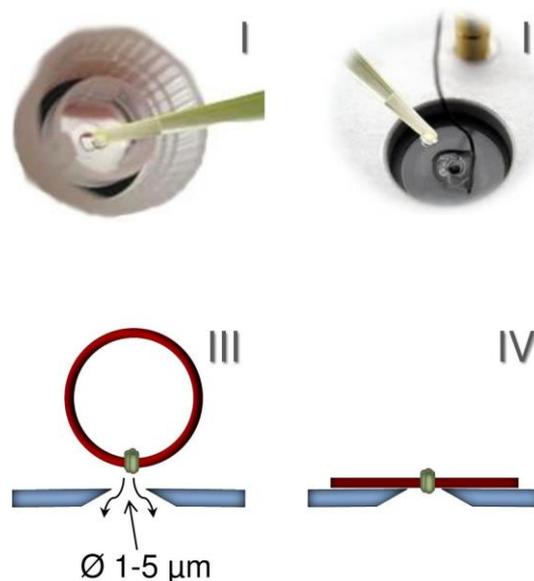


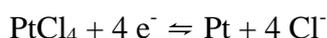
Abb. 3-16: Präparation einer Membran mithilfe des Port-a-Patch Aufbaus. Sowohl auf die Unterseite des Borsilikatchips (*trans*-Seite, **I**) als auch auf die Oberseite (*cis*-Seite, **II**) wird Puffer beliebiger Zusammensetzung gegeben. Im Zweiten Schritt werden proteinhaltige GUVs zur *cis*-Seite gegeben und von der *trans*-Seite her angesaugt (**III**). Bei Berührung mit der Oberfläche spreiten sie und bilden Lipidmembranen mit enthaltenen Membranproteinen über der Pore im Chip aus (**IV**).

3.8 Vorbereitung der Messelektroden

3.8.1 Platinieren von Platindrähten

Bei impedanzspektroskopischen Untersuchungen ist es zweckmäßig, Elektroden mit einer möglichst hohen Kapazität zu verwenden, da diese in den für die Untersuchung von Membransystemen verwendeten Frequenzbereichen nicht detektiert werden und somit bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden müssen. Nach Gleichung (3-6) führt eine Vergrößerung der Elektrodenoberfläche zu einer Erhöhung der Kapazität, weshalb auf den verwendeten Platinelektroden weiteres feines Platinpulver mit großer Oberfläche (Platinmohr) abgeschieden wurde. Für frisch präparierte Elektroden wurden impedanzspektroskopisch Kapazitäten von einigen Millifarad ermittelt, während die eigentlich beobachteten Membranen aufgrund ihrer kleinen Flächen typischerweise Werte im Nanofaradbereich aufwiesen.

Die Platindrähte (typischerweise mit einem Durchmesser von 1 mm) wurden zunächst mit groben Schmirgelpapier aufgeraut und anschließend mit Reinstwasser und Mucosal[®] gefolgt von absolutem Ethanol für jeweils 15 min im Ultraschallbad von organischen Verunreinigungen befreit. Anschließend wurden zwei Elektroden ca. 1 cm tief in eine frisch angesetzte Platinierlösung (3 % (w/v) PtCl₄, 0,025 % (w/v) Pb(OOCCH₃)₄, 25 mM HCl in Reinstwasser) getaucht und mit einer Spannungsquelle (DC Power Supply PS 280, Textonics, Wilmington, USA) verbunden. Anschließend wurden 1,5 V für 90 s angelegt, die Elektroden umgepolt und weitere 1,5 V für 90 s angelegt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, im vierten Durchgang wurden 3,5 V für je 90 s angelegt. An beiden Elektroden schied sich abwechselnd nach:

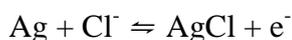


elementares Platin jeweils an der als Kathode geschalteten Elektrode ab, wobei das Bleiacetat die Effizienz dieses Prozesses steigerte.^[103] Anschließend wurden die Elektroden in Reinstwasser im Ultraschallbad gesäubert. Das abgeschiedene Platin

war als schwarze, durchgängige Schicht an der Elektrodenspitze zu erkennen. War diese Schicht fehlerhaft oder nicht tief schwarz, so wurde die gesamte Prozedur mehrmals wiederholt.

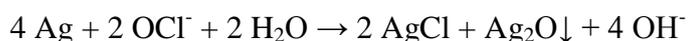
3.8.2 Chloridieren von Silberelektroden

Da Ag/AgCl-Elektroden nicht polarisierbar sind, wurden sie für Experimente, bei denen eine Gleichspannung für längere Zeit angelegt werden musste (*voltage clamp*-Experimente, Abschnitt 3.6.2) benutzt. Die Silberdrähte wurden gründlich gereinigt (siehe oben), in einer 0,5 M KCl-Lösung platziert und mit einer Spannungsquelle (DC Power Supply PS 280, Textonics, Wilmington, USA) verbunden. Die Spannung wurde auf 1-2 V erhöht, bis an einer der Elektroden Blasenbildung (elementarer Wasserstoff) zu erkennen war. Diese Spannung wurde für ca. 10 s Sekunden gehalten, die Elektroden anschließend umgepolt und erneut behandelt. Silberchlorid scheidet sich an der jeweils als Anode geschalteten Elektrode nach:



ab. Diese Prozedur wurde wiederholt, bis das entstandene Silberchlorid die Elektrode als homogene, tief schwarze Schicht überzog.

Wurden sehr dünne Silberdrähte als Elektroden benutzt, so konnten diese auch chloridiert werden, indem sie mit wässriger Natriumhypochloridlösung behandelt wurden. Hierzu wurden die Drähte zunächst mit absolutem Ethanol gereinigt, mit Schmirgelpapier aufgeraut und erneut mit Reinstwasser gespült. Anschließend wurden sie mindestens 30 min in Natriumhypochloridlösung (12 % Chlor in H₂O) belassen, nach



chloridiert und erneut gründlich mit Reinstwasser gespült.

3.9 CD-Spektroskopie

Eine gängige Methode zur Untersuchung der Konformation von Proteinen stellt seit den 1960er Jahren die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie dar. Sie macht sich den Unterschied in der Wechselwirkung chiraler Moleküle mit links bzw. rechts zirkular polarisiertem Licht zunutze.

3.9.1 Theoretische Grundlagen

Zirkular polarisiertes Licht beschreibt eine elektromagnetische Welle, deren elektrische Feldstärke \vec{E} nicht, wie bei linear polarisiertem Licht, in einer festen Ebene zwischen ihren Maxima schwingt, sondern bei konstantem Betrag $|\vec{E}|$ einer Schraubenbewegung entlang der Ausbreitungsrichtung folgt (Abb. 3-17). Praktisch wird dies durch die Kombination zweier senkrecht zueinander stehender linear polarisierter Strahlen mit gleicher Amplitude und Wellenlänge, allerdings einem Gangunterschied von $\lambda/4$ erzeugt. Bei Betrachtung des resultierenden Lichtstrahl entgegen seiner Ausbreitungsrichtung kann \vec{E} sowohl mit dem Uhrzeigersinn (rechts zirkular polarisiert) als auch gegen ihn (links zirkular polarisiert) rotieren.

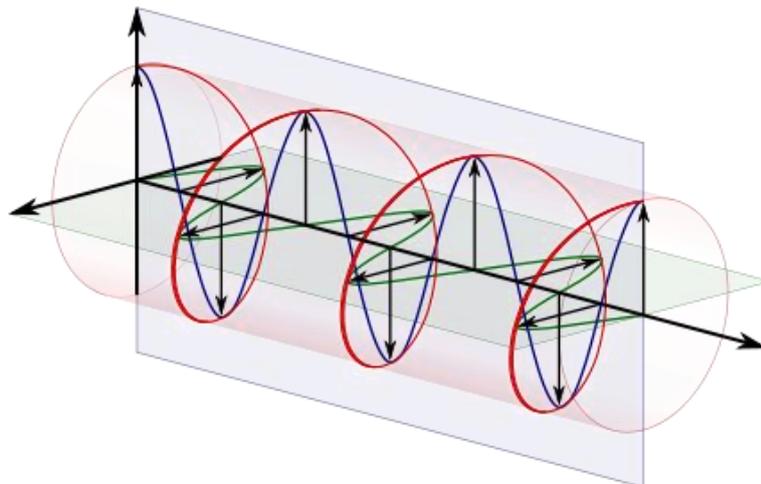


Abb. 3-17: Erzeugung eines zirkular polarisierten Lichtstrahls (rot) durch Kombination zweier senkrecht zueinander stehender linear polarisierter Lichtstrahlen (blau, grün) mit einem Gangunterschied von $\lambda/4$.

Prinzipiell tritt elektromagnetische Strahlung jeder Wellenlänge mit Materie in spezifische Wechselwirkungen. Im Bereich des fernen UV-Lichtes ($\lambda = 180\text{-}280\text{ nm}$) können Elektronen innerhalb eines Moleküls verschoben werden, wobei ein Teil der einfallenden Energie des Strahls absorbiert wird. Diese Wechselwirkung wird bei Proteinen in diesem Wellenlängenbereich hauptsächlich von den $n \rightarrow \pi^*$ bzw. $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergängen der Amidbindungen des Proteinrückgrats dominiert.^[104] Der Betrag des Circular dichroismus hängt sowohl vom elektrischen Übergangsmoment $\vec{\mu}$ als auch vom magnetischen Übergangsmoment \vec{m} ab.^[105] Als vektorielle Größen werden diese wesentlich von der Molekülgeometrie festgelegt, welche in Proteinsekundärstrukturen wie einer α -Helix oder eines β -Sheets relativ genau festgelegt ist.^[98] Ist der Winkel $\alpha(\vec{\mu}, \vec{m})$ zwischen beiden Übergangsmomenten spitz, resultiert daraus ein positiver CD-Effekt, ist der Winkel hingegen stumpf, so ist der CD-Effekt negativ.

Eine fundamentale Eigenschaft von Proteinstrukturen ist deren Chiralität, d. h. das alleinige Vorkommen nur eines von zwei möglichen Spiegelbildern bei ansonsten identischer räumlicher Anordnung der beteiligten Atome. Wird in einem CD-Spektrometer links und rechts polarisiertes Licht kombiniert, so resultiert bei identischer Amplitude und Wellenlänge parallel polarisiertes Licht doppelter Amplitude. Da aber die beiden Teilstrahlen aus oben genannten Gründen unterschiedlich stark mit dem in den Strahlengang eingebrachten Protein wechselwirken und die Strahlen demnach unterschiedlich stark abgeschwächt werden, entsteht durch diese Interaktion elliptisch polarisiertes Licht. Die für jede Wellenlänge λ gemessene Elliptizität $\Theta(\lambda)$ [mdeg] wird nach

$$[\Theta](\lambda) = 100 \frac{\Theta(\lambda)}{c \cdot n \cdot l} \quad (3-8)$$

unter Berücksichtigung der Proteinkonzentration c [mol/l], der Anzahl der beteiligten Aminosäuren n und der Schichtdicke der Proteinlösung in der Messküvette l [cm] zur mittleren molaren Elliptizität $[\Theta](\lambda)$ normiert.^[20] Eine Umrechnung in die Einheit [10³ deg cm² d mol⁻¹] führt zu übersichtlichen Zahlenwerten im Bereich von $[\Theta](\lambda) = 0\text{-}100 \cdot 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$.

3. Materialien und Methoden

Die Elliptizität wurde in dieser Arbeit typischerweise in einem sogenannten *fingerprint*-Bereich bei Wellenlängen von $\lambda = 190\text{-}240$ nm gemessen, da Sekundärstrukturelemente wie α -Helices oder β -Faltblätter in diesem Wellenlängenbereich einen charakteristischen Verlauf der resultierenden molaren Elliptizität aufweisen (**Abb. 3-18**).^[106]

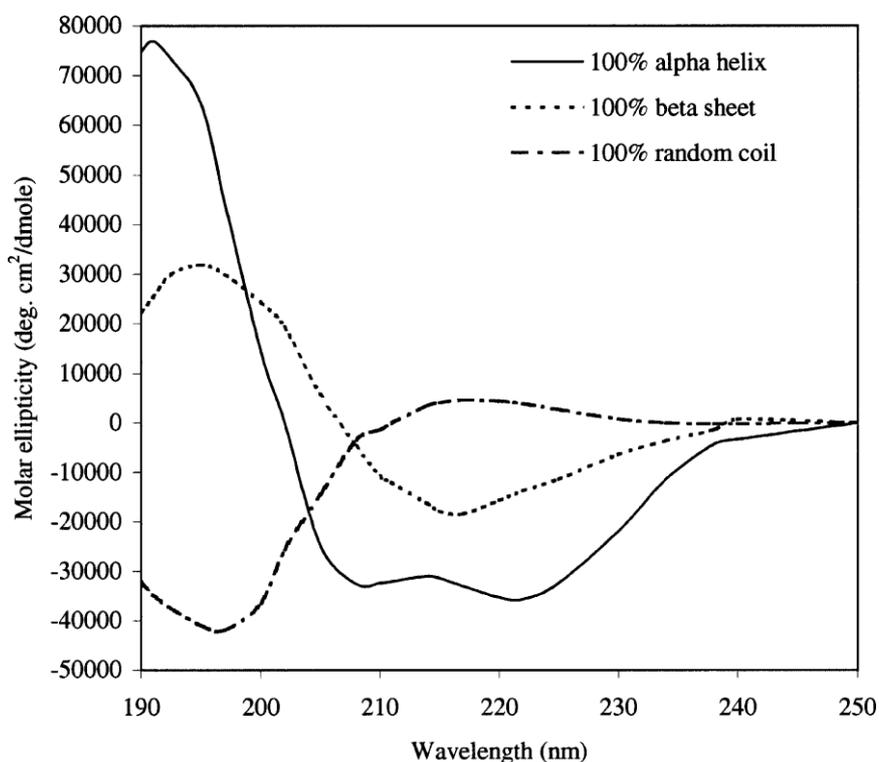


Abb. 3-18: Charakteristischer Verlauf der molaren Elliptizität verschiedener sekundärer Strukturelemente in Proteinen.^[106]

3.9.2 Durchführung eines CD-Experiments

Bei CD-Experimenten war darauf zu achten, bestimmte Spezies wie z. B. Chloridionen, die die Ergebnisse durch Eigenabsorption im betrachteten Wellenlängenbereich verfälschen, nicht im zur Messung verwendeten Puffermedium zu benutzen.^[107] Die VDAC1-Proteine wurden standardmäßig in einer Pufferlösung bestehend aus 100 mM NaCl, 25 mM Bis/Tris, 0,3 % (v/v) LDAO bei pH 6,8 aufbewahrt, vor jedem CD-Experiment wurden sie daher mittels Dialyse in einen für diese Anwendung geeigneteren Phosphatpuffer (20 mM KH₂PO₄ / K₂HPO₄, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) überführt, dem vorher 0,3 % (v/v) LDAO hinzugefügt wurden, um

die VDAC1-Moleküle in Lösung zu halten. Hierzu wurden 200 µl VDAC1-Stammlösung bei 4 °C in drei Schritten jeweils für mindestens 4 h gegen 100 ml Phosphatpuffer dialysiert.

Die Messungen wurden an einem CD-Spektrometer (J-810, Jasco, Groß-Umstadt) in einem Wellenlängenbereich von $\lambda = 190\text{-}240$ nm mit einer Abtastgeschwindigkeit von 20 nm/min bei 20 °C durchgeführt. Jedes Spektrum wurde aufgenommen, indem zunächst der verwendete Puffer ohne Protein gemessen wurde und das erhaltene Leespektrum von einem aus fünf Einzelmessungen gemittelten Proteinspektrum abgezogen wurde. Die verwendete Küvette wies eine Schichtdicke von 0,1 cm auf und wurde jeweils mit 600 µl der betreffenden Lösung gefüllt.

Zur Ermittlung der mittleren molaren Elliptizität $[\Theta](\lambda)$ wurde die Proteinkonzentration für jede untersuchte Probe mithilfe der UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Aus der Absorption der aromatischen Aminosäuren bei $\lambda = 280$ nm kann nach Lambert und Beer die Konzentration des Proteins nach:

$$E_{280} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3-9)$$

bestimmt werden. Neben der gemessenen Extinktion E_{280} und der optischen Weglänge d wird weiterhin der Extinktionskoeffizient ε des Proteins benötigt, der für VDAC1 zu $\varepsilon = 36960 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt wurde.^[108]

4 Ergebnisse

4.1 Strukturelle Integrität des VDAC1

Die untersuchten VDAC1-Proteine wurden in mehreren Chargen von einem Kooperationspartner (Abteilung Prof. Griesinger, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen) bezogen. Da die einzelnen Präparationen teilweise mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die Experimente wieder aufgetaut wurden, musste in diesem Fall zunächst überprüft werden, ob die VDAC1-Moleküle nach dieser Prozedur noch in einem strukturell einwandfreien Zustand vorlagen. Hierzu wurden Circular dichroismus (CD)-Experimente an frisch aufgetauten sowie länger bei Raumtemperatur gelagerten Proteinen durchgeführt.

In **Abb. 4-1** ist das CD-Spektrum von VDAC1 in LDAO-Mizellen als graue Punkte gezeigt.

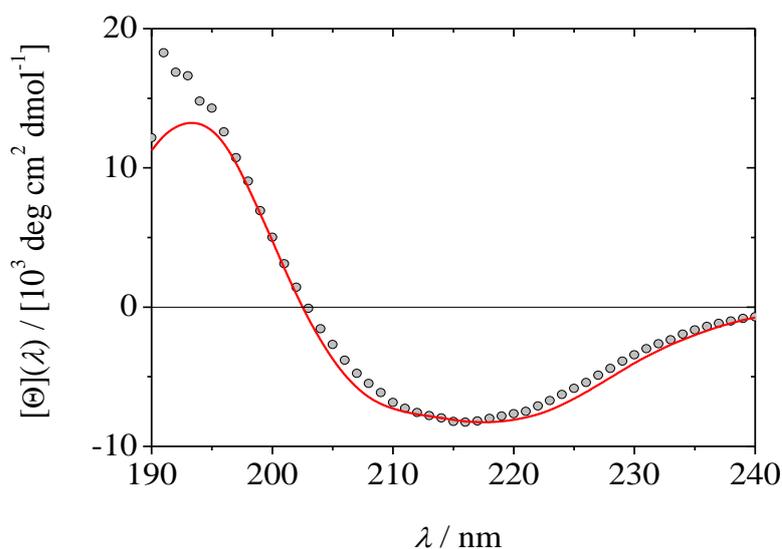


Abb. 4-1: CD-Spektrum von frisch aufgetautem VDAC1 in LDAO-Mizellen, aufgenommen in 20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$, 0,1 mM EDTA, 0,3 % (v/v) LDAO, pH 8,0 (grau). Die rote Line zeigt die Anpassung von Referenzdatensatz 4 des Webservers DichroWeb mithilfe des Algorithmus SELCON3 an die Daten.

4. Ergebnisse

Mithilfe des Algorithmus SELCON3^[109] wurde der Referenzdatensatz 4 des Webservers DichroWeb^[110] an die gemessenen Daten angepasst (Abb. 4-1, rot). Der verwendete Referenzdatensatz enthält die CD-spektroskopischen Daten von insgesamt 43 Proteinen mit bekannter Struktur und ist für den Wellenlängenbereich von $\lambda = 190\text{-}240$ nm optimiert. Aus dieser Anpassung konnte auf den Anteil von α -helikalen und β -Faltblattstrukturen innerhalb der Sekundärstruktur des VDAC1 geschlossen werden (**Tabelle 4-1**).

Um die thermische Stabilität der Proteinstruktur zu überprüfen, wurden weiterhin CD-Spektren von VDAC1 aufgenommen, welches zuvor 24 Stunden bzw. sieben Tage bei 20 °C gelagert worden war (**Abb. 4-2**).

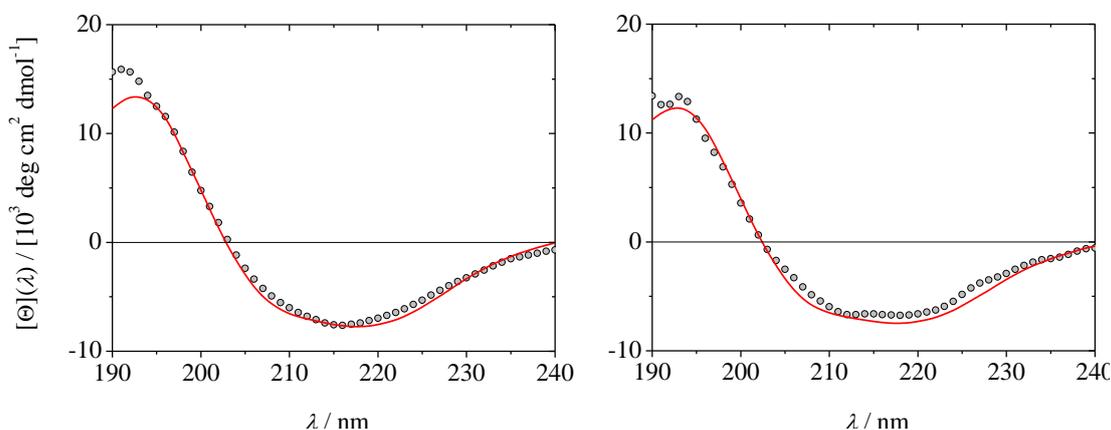


Abb. 4-2: CD-Spektren von VDAC1 in LDAO-Mizellen, welches 24 Stunden (links) bzw. sieben Tage (rechts) bei 20 °C gelagert wurde (grau). Die Spektren wurden in 20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$, 0,1 mM EDTA, 0,3 % (v/v) LDAO, pH 8,0 aufgenommen. Die roten Linien zeigen die Anpassung von Referenzdatensatz 4 des Webservers DichroWeb mithilfe des Algorithmus SELCON3 an die Daten.

Da sich in diesen Fällen jeweils ein leicht veränderter Kurvenverlauf ergab, wurden auch hier die Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente an der Proteinstruktur bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4-1** zusammengefasst.

Porenüberspannende Membranen auf porösen Aluminiumoxidsubstraten

Tabelle 4-1: Anteil bestimmter Sekundärstrukturelemente an der Gesamtstruktur von VDAC1, gelöst in 20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$, 0,1 mM EDTA, 0,3 % (v/v) LDAO, pH 8,0. Verglichen wurden frisch aufgetaute Proteine mit solchen, die 24 Stunden bzw. sieben Tage bei 20 °C aufbewahrt worden waren. Die Werte wurden aus CD-spektroskopischen Daten ermittelt, die mithilfe des Algorithmus SELCON3 mit dem Referenzdatensatz 4 des Webservers DichroWeb verglichen wurden.

VDAC1-Probe	α -Helix / %	β -Faltblatt / %	β -turn / %	unbestimmt
frisch aufgetaut	13,4	37,8	20,5	28,2
24 h bei 20 °C	13,1	36,2	20,3	30,3
7 Tage bei 20 °C	15,9	34,1	20,4	31,1
Referenz ^[20]	17,2	30,7	22,5	28,9

Es ergab sich, dass der Anteil von β -Faltblattstrukturen mit längerer Lagerung bei 20 °C abnahm, während der Anteil von α -helicalen und unbestimmten Strukturanteilen stetig zunahm. In jedem Fall lag der hier bestimmte Anteil von β -Faltblattstrukturen jedoch noch über dem, der von Shanmugavadivu *et al.* für VDAC1 in LDAO-Mizellen bestimmt wurde. Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass schockgefrorenes und wieder aufgetautes VDAC1 nicht denaturiert, sondern in strukturell einwandfreier Form vorlag.

4.2 Porenüberspannende Membranen auf porösen Aluminiumoxidsubstraten

4.2.1 Membranpräparation durch Vesikelspreiten

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den spannungsabhängigen Ionenkanal VDAC1 in artifiziellen Lipidmembranen auf Einzelkanalebene zu charakterisieren. Aufgrund der wesentlich höheren Stabilität gegenüber klassischen *black lipid*

4. Ergebnisse

membrane (BLM)-Systemen (Abschnitt 1.6.1) wurden zunächst Experimente in porenüberspannenden Membranen (Abschnitt 1.6.3) durchgeführt. Da in der Membran enthaltenes Lösungsmittel, wie in Abschnitt 1.6.1 dargestellt, einen Einfluss auf die Eigenschaften inkorporierter Proteine haben kann, sollten diese Membranen möglichst frei von Lösungsmittel sein. Zu diesem Zweck wurde die Strategie verfolgt, vorher präparierte *large unilamellar vesicles* (LUVs), auf funktionalisierten porösen Aluminaten zu spreiten (siehe Kapitel 3.3). Um die bei Einzelkanalexperimenten auftretenden Ströme im pA-Bereich auflösen zu können, waren Membranen mit Widerständen im GΩ-Bereich notwendig (siehe Abschnitt 3.6.2), weshalb als Matrixlipid für diese Anwendung 1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPhPC, Abschnitt 3.1.1) gewählt wurde. Um die Fluidität dieser rigiden Lipidmatrix zu erhöhen, wurde das zwei ungesättigte Fettsäurereste enthaltende Lipid 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC, Abschnitt 3.1.2) zugesetzt und eine Mischung aus DPhPC und DOPC im Stoffmengenverhältnis 6:4 verwendet.

Vor der Membranpräparation wurde ein Impedanzspektrum (Abschnitt 3.4) des verwendeten, 200 µm dicken Aluminats aufgezeichnet. Das poröse Substrat mit zunächst geschlossenen Poren wurde dazu selektiv nur in einem kreisförmigen Bereich mit 1 mm Durchmesser geöffnet (siehe Abschnitt 3.2.6). Die Öffnungen in den verwendeten Messkammern (**Abb. 3-13**) besaßen einen etwas größeren Durchmesser ($r = 1,0$ mm), da sich auf diese Weise der für Leckströme sehr anfällige Bereich zwischen Dichtungsring und Aluminat über noch geschlossenem Aluminiumoxid befand. Ein geöffneter Bereich mit einem Radius von $r = 0,5$ mm ergibt eine Fläche A von

$$A = \pi \cdot r^2 = 0,00785 \text{ cm}^2. \quad (4-1)$$

Die Porosität dieser Aluminate wurde durch eine Pixelanalyse elektronenmikroskopischer Bilder zu $(33 \pm 4) \%$ bestimmt,^[76] was eine aktive Fläche dieses Substrats von $A_a = 0,00281 \text{ cm}^2$ ergibt.

In **Abb. 4-3** ist das Impedanzspektrum eines goldbeschichteten und partiell geöffneten Aluminats, funktionalisiert mit Tetradekanthiol (TDT, siehe Abschnitt 3.3.1), gezeigt. Das Spektrum wurde im Frequenzbereich von 1 MHz bis 10^{-1} Hz in 0,1 M NaCl aufgenommen. Es sind zwei Dispersionen zu erkennen, welche auf die gleichzeitige Anwesenheit und das unterschiedliche Verhalten geschlossener und offener Poren im Barriereoxid zurückzuführen sind.^[81]

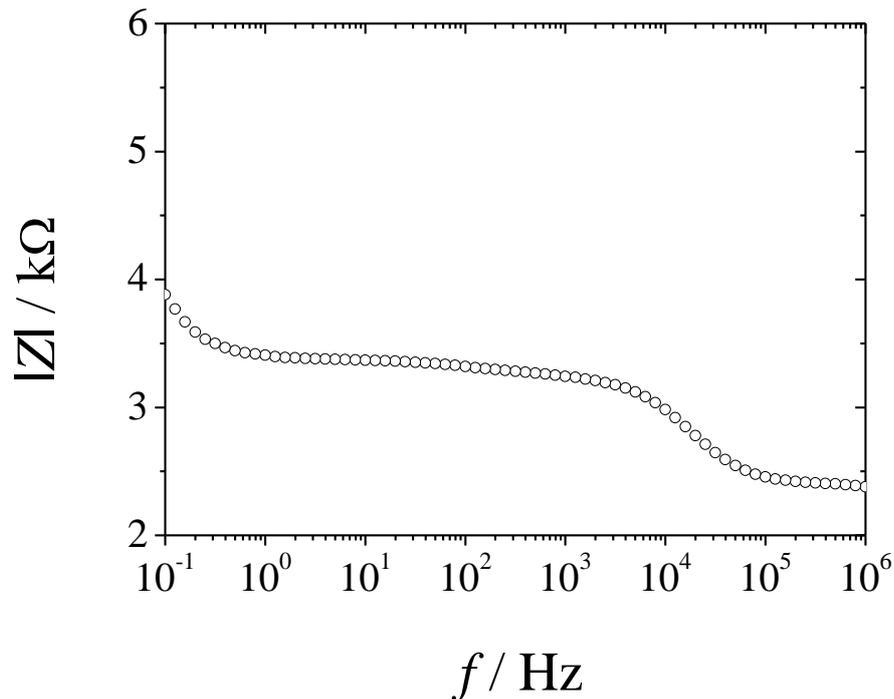


Abb. 4-3: Impedanzspektrum eines porösen Aluminats mit partiell geöffneten Porenböden. Die zunächst geschlossenen Poren mit einem Radius von $r = 30$ nm im Aluminat der Dicke $d = 200$ μm wurde in einem kreisförmigen Bereich mit einem Radius von $r = 0,5$ mm geöffnet, was bei einer Porosität des Bereichs von (33 ± 4) % eine aktive Fläche von $A_a = 0,00281$ cm^2 ergibt. Insgesamt wurde ein kreisförmiger Bereich des Aluminats mit einer Fläche von $A_{\text{ges}} = 0,03141$ cm^2 in 0,1 M NaCl vermessen, weshalb sich eine Dispersion aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens von porösem und nichtporösem Bereich ergibt.

Zur Präparation einer Membran durch das Spreiten von LUVs wurde der Puffer auf der Oberseite des horizontal platzierten Substrats gegen eine LUV-haltige Pufferlösung ausgetauscht. Um den Aufbau der Membran verfolgen zu können, wurde bei einer festen Frequenz von $f = 10$ Hz gegen die Zeit gemessen, bis keine Veränderung des Betrags der Impedanz $|Z|$ mehr zu erkennen war. Diese Frequenz

4. Ergebnisse

wurde gewählt, da im Bereich niedriger Frequenzen generell die größte Zunahme von $|Z|$ beim Prozess des Membranaufbaus zu erwarten ist.^[111]

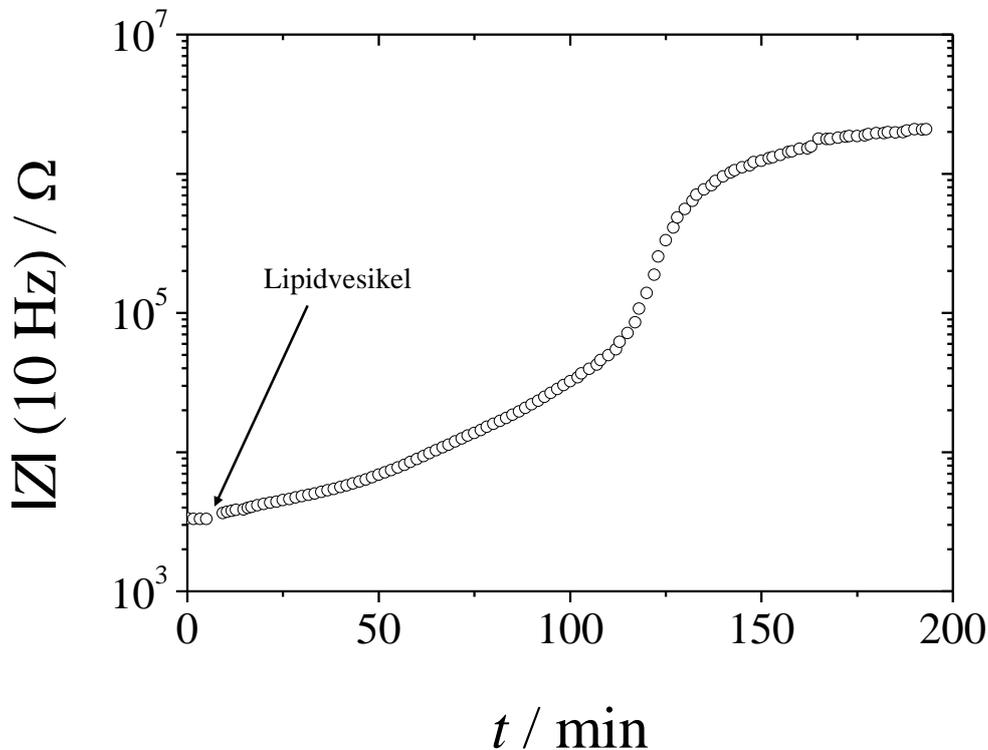


Abb. 4-4: Zeitlicher Verlauf des Betrags der Impedanz $|Z|$ beim Aufbau einer Membran durch Vesikelspreiten. Bei $t = 13,3$ min wurde eine Vesikelsuspension auf ein mit TDT funktionalisiertes poröses Aluminat (vgl. **Abb. 4-3**) gegeben. Das Spektrum wurde bei einer festen Frequenz von $f = 10$ Hz in 0,1 M NaCl aufgenommen.

Vor Zugabe der Vesikelsuspension bei 13,3 min wurde die poröse Oberfläche zunächst mit einem bis auf wenige Haare ausgedünnten Pinsel mit einer Lösung von *n*-Dekan in Reinstwasser 1:100 (v/v) bestrichen. Dieses sogenannte *priming* der Oberfläche unterstützt das Spreiten der Lipidvesikel. Nach Zugabe der Vesikel konnte der Aufbau einer Schicht auf dem Substrat verfolgt werden, die nach gut drei Stunden einen Widerstand im M Ω -Bereich aufwies. Um zu überprüfen, ob es sich um eine Lipiddoppelschicht handelte, wurde ein komplettes Impedanzspektrum in einem Frequenzbereich von 1 MHz bis 10^{-2} Hz aufgenommen, da so auch der Bereich des Membranwiderstands aufgelöst werden kann.^[94]

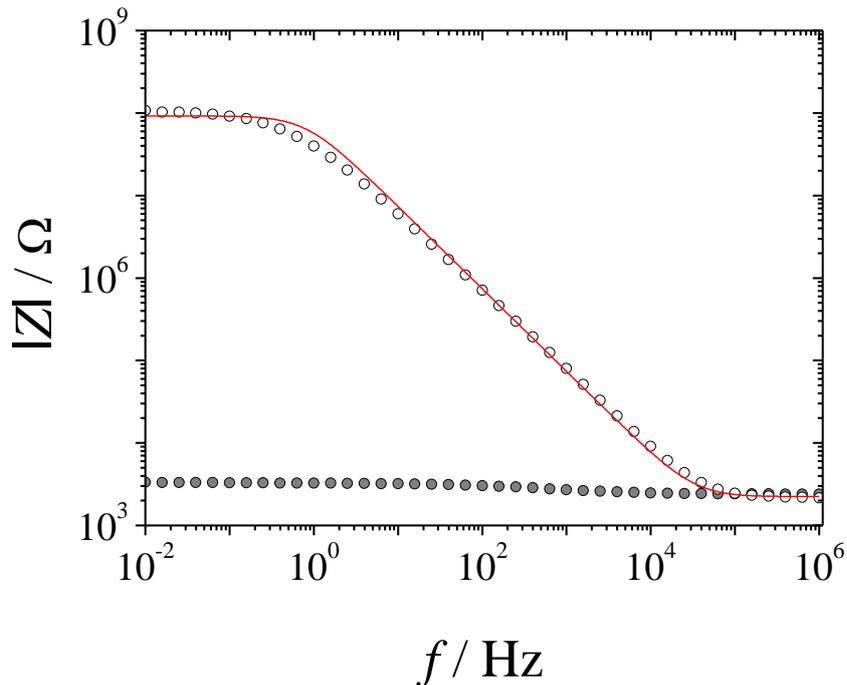


Abb. 4-5: Impedanzspektrum der durch Vesikelspreiten präparierten Membran (ungefüllte Kreise), gemessen in 0,1 M NaCl. Die Membranparameter ergaben sich über einen $R(RC)$ -Fit (rot) zu $R_m = 92,2 \text{ M}\Omega$ und $C_s = 0,99 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$, der Elektrolytwiderstand betrug $R_{el} = 2,2 \text{ k}\Omega$. Das Impedanzspektrum des verwendeten Substrats ist zum Vergleich mit abgebildet (grau gefüllte Kreise, vgl. **Abb. 4-3**).

Das Impedanzspektrum der durch Vesikelspreiten präparierten Membran ist in **Abb. 4-5** durch ungefüllte Kreise dargestellt, während das Impedanzspektrum des Substrats ohne Membran zur Veranschaulichung mit grau gefüllten Kreisen aufgetragen ist. Die rote Line gibt den Verlauf eines an die Daten gefitteten $R(RC)$ -Schaltkreises wieder (Abschnitt 3.4.2). Der Widerstand der Membran ergab sich zu $R_m = 92,2 \text{ M}\Omega$ und ihre Kapazität zu $C_m = 2,157 \text{ nF}$. Zur Ermittlung der spezifischen Kapazität C_s muss die aktive, also zur Kapazität beitragende Fläche des Substrats herangezogen werden. Mit einer aktiven Fläche von $A_a = 0,00281 \text{ cm}^2$ (siehe Seite 66) ergibt sich die spezifische Kapazität der durch Vesikelspreiten gebildeten Membran zu $C_s = 0,99 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Dieser Wert liegt im Bereich der für lösungsmittelfreie Systeme bestimmten spezifischen Kapazitäten von $C_s = 0,9\text{-}1,0 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ^[112] und entspricht damit den spezifischen Kapazitäten biologischer Membranen.^[70]

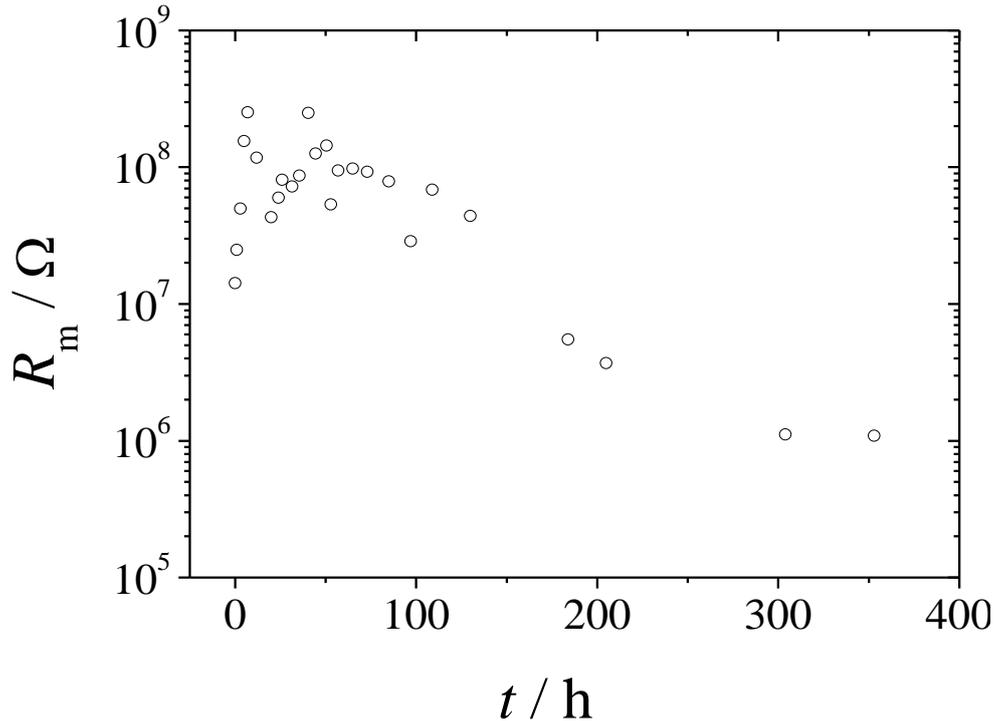


Abb. 4-6: Der Membranwiderstand R_m in Abhängigkeit von der Zeit als Maß der Langzeitstabilität der durch Vesikelspreiten präparierten Membran. Zu den angegebenen Zeiten wurde jeweils ein Impedanzspektrum aufgenommen (vgl. Abb. 4-5) und der Membranwiderstand R_m durch einen $R(RC)$ -Fit ermittelt (Abschnitt 3.4.2).

Um die Langzeitstabilität der durch Vesikelspreiten präparierten Membran zu überprüfen, wurden über einen Zeitraum von insgesamt $t_{\max} = 360$ h (15 Tage) Spektren aufgenommen und der Membranwiderstand jeweils über einen $R(RC)$ -Ersatzschaltkreis bestimmt. Der Widerstand blieb über fünf Tage bei hohen Werten um $R_m = 10^8 \Omega$ und fiel erst nach einer Woche auf ungefähr $R_m = 1 \text{ M}\Omega$ ab, was die Langzeitstabilität der Membran belegt.

Es konnten prinzipiell Membranen durch Vesikelspreiten auf poröse Aluminate aufgebracht werden, jedoch stellte die zuverlässige Ausbildung einer komplett geschlossenen, hochohmigen Lipiddoppelschicht ein Problem dar, welches einer routinemäßigen Anwendung für Untersuchungen an Ionenkanälen entgegen stand. Aus diesem Grund wurde als alternatives Verfahren die Präparation von porenüberspannenden Membranen mithilfe der Mueller-Rudin-Technik, also dem Auftragen (*painten*) von Lipiden in organischen Lösungsmitteln (siehe Abschnitt 1.6.1) untersucht.

4.2.2 Präparation von porenüberspannenden Membranen durch *painten* von Lipiden

Analog zur Präparation von porenüberspannenden Membranen durch das Spreiten von Lipidvesikeln wurden auch Membranen mit der Mueller-Rudin-Technik, also dem Auftrag (*painten*) von Lipiden, gelöst in organischen Lösungsmitteln, präpariert. Da diese Art der Präparation von der Herstellung klassischer BLMs (Abschnitt 1.6.1) auf eine poröse Oberfläche mit Porendurchmessern von 60 nm übertragen wurde, werden die resultierenden Membranen auch als nano-BLMs bezeichnet.^[11]

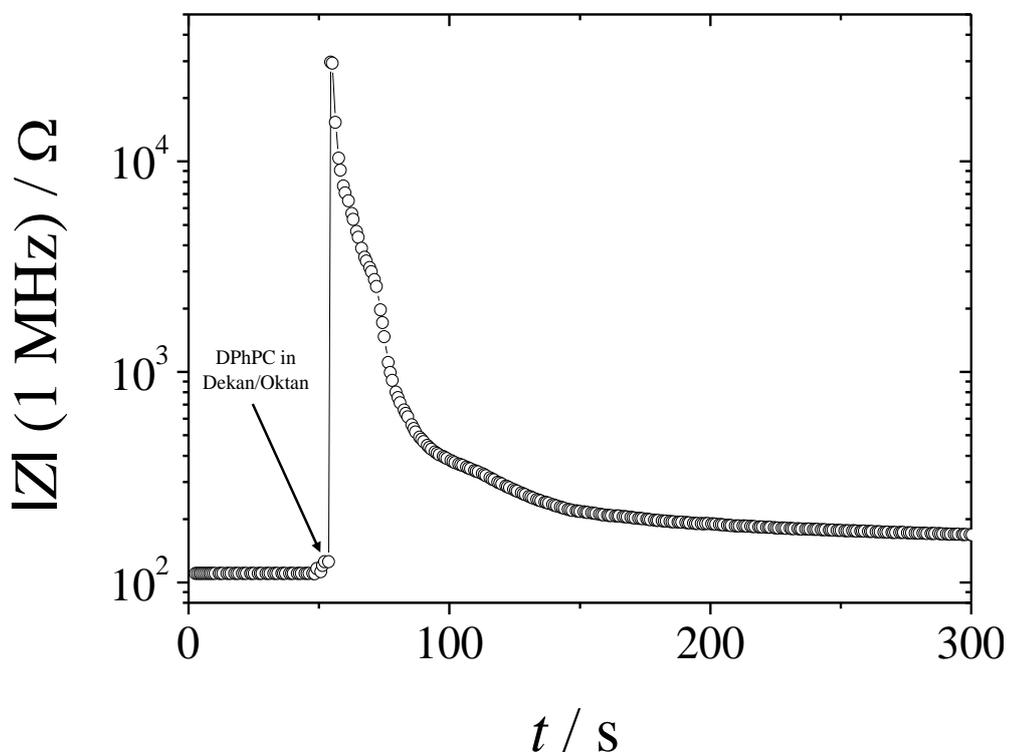


Abb. 4-7: Zeitlicher Verlauf des Betrags der Impedanz $|Z|$, gemessen bei einer festen Frequenz von $f = 1$ MHz, im Verlauf der Präparation einer Membran mittels Mueller-Rudin-Technik auf porösem Aluminat ($d = 200 \mu\text{m}$, $A_a = 0,00281 \text{ cm}^2$, Porendurchmesser 60 nm). Bei $t = 55$ s wurden $7,5 \mu\text{l}$ einer 20 mM Lösung von DPhPC in *n*-Dekan/*n*-Oktan 1:1 (v/v) mittels Pipette auf das Substrat appliziert. Puffer: 1 M KCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7,4.

Abb. 4-7 zeigt exemplarisch den Verlauf des Betrags der Impedanz gemessen bei einer festen Frequenz von 1 MHz während der Präparation einer Membran mit einer 20 mM Lösung von DPhPC in *n*-Dekan/*n*-Oktan 1:1 (v/v). Direkt nach dem Auftrag von $7,5 \mu\text{l}$ Lösung bei $t = 55$ s steigt die Impedanz sprunghaft von 110Ω um über

4. Ergebnisse

zwei Größenordnungen auf knapp 30 k Ω an und fällt anschließend innerhalb von vier Minuten wieder bis auf 150 Ω ab. Dies ist typisch für den anfänglich sehr hohen Widerstand des Lösungsmitteltropfens und ein anschließendes Ausdünnen der Membran.^[65] Zwar fällt der Widerstand nicht komplett auf den Ausgangswert zurück, jedoch liegt er mit einer Differenz von 30 Ω nur unwesentlich über diesem.

Das komplette Impedanzspektrum der resultierenden Membran ist in Abb. 4-8 gezeigt.

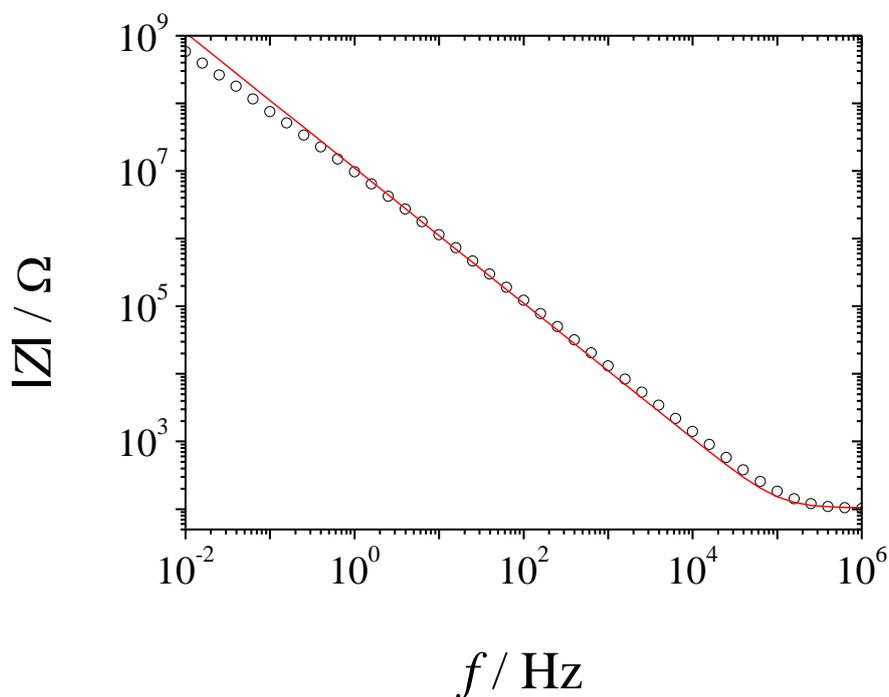


Abb. 4-8: Impedanzspektrum der durch Auftrag einer 20 mM Lösung von DPhPC in *n*-Dekan/*n*-Oktan 1:1 (v/v) präparierten Membran, gemessen in 1 M KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4. Die spezifische Membrankapazität wurde durch die Anpassung eines RC-Ersatzschaltbilds (Abschnitt 3.4.2) zu $C_s = 0,62 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ bestimmt.

Der Widerstand der Membran ist so hoch, dass er im betrachteten Frequenzbereich nicht mehr aufgelöst werden kann. Zur Ermittlung der Membrankapazität wurde daher ein Ersatzschaltkreis verwendet, der aus einem Widerstand und einer Kapazität in Reihe besteht (RC-Ersatzschaltkreis, Abschnitt 3.4.2). Die spezifische Kapazität der Membran ergab sich zu $C_s = 0,62 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Für lösungsmittelhaltige Membranen stellt dies einen charakteristischen Wert dar, da sich aufgrund der im Vergleich zu

Lipiden höheren Dicken und der niedrigen Permittivität organischer Lösungsmittel wie Dekan ($\epsilon_r^{20} = 1,99$)^[113] geringere Werte als im Falle lösungsmittelfreier Membranen (Abschnitt 4.2.1) ergeben.^[114]

4.2.3 OmpF in porenüberspannenden Membranen

Das bakterielle Porin OmpF (Abschnitt 1.3) wurde bereits in porenüberspannende Membranen rekonstituiert und elektrophysiologisch untersucht.^[11] Als Machbarkeitsnachweis (*proof of concept*) wurde daher zunächst OmpF in nano-BLMs untersucht und das Vorgehen dann auf das strukturell ähnliche VDAC1-Protein übertragen.

Hierzu wurde per Mueller-Rudin-Technik eine Membran auf einem mit TDT funktionalisierten porösen Aluminat mittels Auftrag (*painten*) einer 20 mM Lösung des Lipids DPhPC in *n*-Dekan/*n*-Oktan 1:1 (v/v) präpariert. Der Auftrag der Lipidlösung und das sukzessive Ausdünnen des Tropfens zu einer resultierenden Membran wurde bei einer festen Frequenz von $f = 1$ MHz zeitaufgelöst impedanzspektroskopisch in einem Puffer bestehend aus 1 M KCl, 1 mM CaCl₂ und 5 mM HEPES bei pH 7,4 verfolgt. War keine Veränderung des Betrags der Impedanz $|Z|$ und des frequenzabhängigen Phasenwinkels $\varphi(\omega)$ mehr zu erkennen, wurde ein Spektrum im Bereich von 10⁻¹ Hz bis 1 MHz aufgenommen und die Membranparameter durch Anpassung eines RC-Ersatzschaltbildes quantifiziert. Der Membranwiderstand konnte nicht aufgelöst werden, ihre spezifische Kapazität ergab sich zu $C_s = 0,25 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Dass dieser Wert geringer ist, als der in Abschnitt 4.2.2 angegebene ($C_s = 0,62 \mu\text{F}/\text{cm}^2$), wird auf ein unvollständiges Ausdünnen der Membran und damit auf etwas größere Mengen an restlichem Lösungsmittel in der Membran zurückgeführt.

Die Präparation wurde vorsichtig im Faraday-Käfig der Einzelkanal-Messapparatur platziert und zu beiden Seiten der Membran mit Elektroden versehen. Die ca. 4 ml Pufferlösung pro Seite wurden mit einem kleinen Rührfisch und einem Rührer, welcher einen störenden magnetischen Fluss Φ_B über die Membran durch zwei rotierende Dipole zu beiden Seiten der Membran verhinderte (SPIN-2, Warner

4. Ergebnisse

Instruments, Hamden, CT, USA), gerührt. Unter *voltage clamp* Bedingungen (Abschnitt 3.6.2) bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = 90$ mV wurden in drei Schritten insgesamt $3,6 \mu\text{l}$ einer OmpF-Stammlösung ($c_{\text{OmpF}} = 3$ mg/ml bzw. $80 \mu\text{M}$ in 1 M KCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, 1 % v/v *o*-POE, pH 7,4) zur Pufferlösung gegeben, was einer Proteinkonzentration in der Messkammer von $c_{\text{OmpF}} = 70$ nM entsprach. Der Strom wurde mit einer *sampling rate* von 50 kHz aufgenommen und mit einem 1 kHz *low-pass* Besselfilter mit einer Flankensteilheit von 24 dB/Oktave gefiltert.

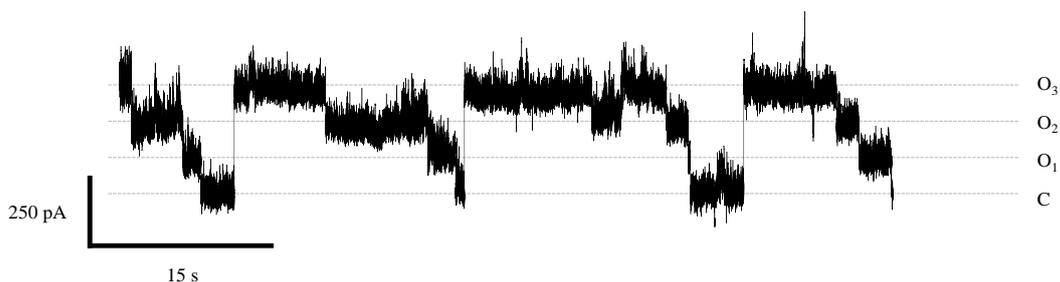


Abb. 4-9: Stromsignal einer Membran in Anwesenheit eines Trimers des Membranproteins OmpF ($c_{\text{OmpF}} = 70$ nM). Das Signal wurde bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = 90$ mV in einer per Mueller-Rudin-Technik präparierten Membran bestehend aus DPhPC in 1 M KCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7,4 aufgenommen. Graue Hilfslinien kennzeichnen vier Stromniveaus, welche charakteristisch für OmpF sind. Sie werden durch das Öffnen einer oder mehrerer Untereinheiten des Trimers (*open*, O₁ - O₃) bzw. das Schließen aller Untereinheiten (*closed*, C) hervorgerufen.^[11]

Ein Ausschnitt des aufgezeichneten Stromsignals ist in Abb. 4-9. gezeigt. Die Aktivität eines für OmpF charakteristischen Trimers und den daraus resultierenden vier Stromniveaus wird durch vier äquidistante Hilfslinien (grau) verdeutlicht. Das niedrigste Niveau entspricht einem vollständig geschlossenen (*closed*, C) Trimer, während die weiteren drei Niveaus durch das sukzessive Öffnen eines, zweier oder aller drei beteiligten Monomere (*open*, O₁ – O₃) zustande kommt.^[11]

Zur weiteren Auswertung wurde das Stromsignal zunächst digital mit einem *low-pass* Gaußfilter mit einer -3 dB *cutoff*-Frequenz von 15 Hz gefiltert und das Signal mittels einer Histogrammanalyse ausgewertet.

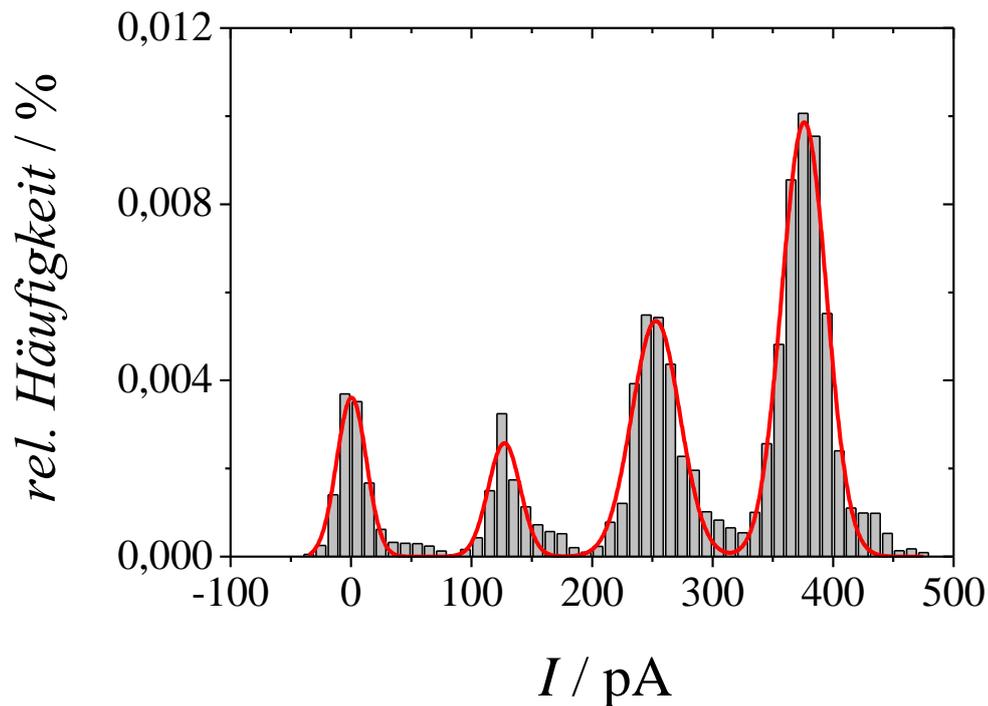


Abb. 4-10: Auftragung der Datenpunkte des in Abb. 4-9 gezeigten Stromsignals in einem Histogramm. Eine Anpassung von Normalerteilungen an die Daten ergab für die vier Zustände Stromniveaus von $I_C = (0 \pm 11)$ pA, $I_{O1} = (127 \pm 12)$ pA, $I_{O2} = (253 \pm 20)$ pA und $I_{O3} = (376 \pm 18)$ pA.

Jeder Datenpunkt wurde seiner Stromamplitude entsprechend in einem Säulendiagramm mit einer Binbreite von 10 pA aufgetragen (**Abb. 4-10**), wodurch sich eine äquidistante Verteilung von insgesamt vier Stromniveaus ergab. Das niedrigste Niveau wurde als Grundlinie definiert, da der endliche Widerstand der betrachteten Membran und der damit verbundene Leckstrom die Berechnung der einzelnen Leitfähigkeiten verfälschen würde.

Die Auswertung des Histogramms erfolgte über die Anpassung von Normalverteilungen der Form

$$f(G_i) = \frac{A}{\sigma_{G_i} \sqrt{2\pi}} \cdot \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{(G_i - G)^2}{\sigma_G^2}\right). \quad (4-2)$$

4. Ergebnisse

Hierbei beschreibt A die Fläche unter der jeweiligen Kurve und σ die Standardabweichung. G_i steht für die einzelnen Leitfähigkeiten, während G ihren Erwartungswert angibt.

Es ergaben sich für die vier Zustände $I_C = (0 \pm 11)$ pA, $I_{O1} = (127 \pm 12)$ pA, $I_{O2} = (253 \pm 20)$ pA und $I_{O3} = (376 \pm 18)$ pA.

Unter Berücksichtigung des angelegten Potentials von $U_m = 90$ mV wurden die Daten des Stromsignals nach Gleichung (3-7) in Leitfähigkeiten umgerechnet und als Histogramm aufgetragen (**Abb. 4-11**).

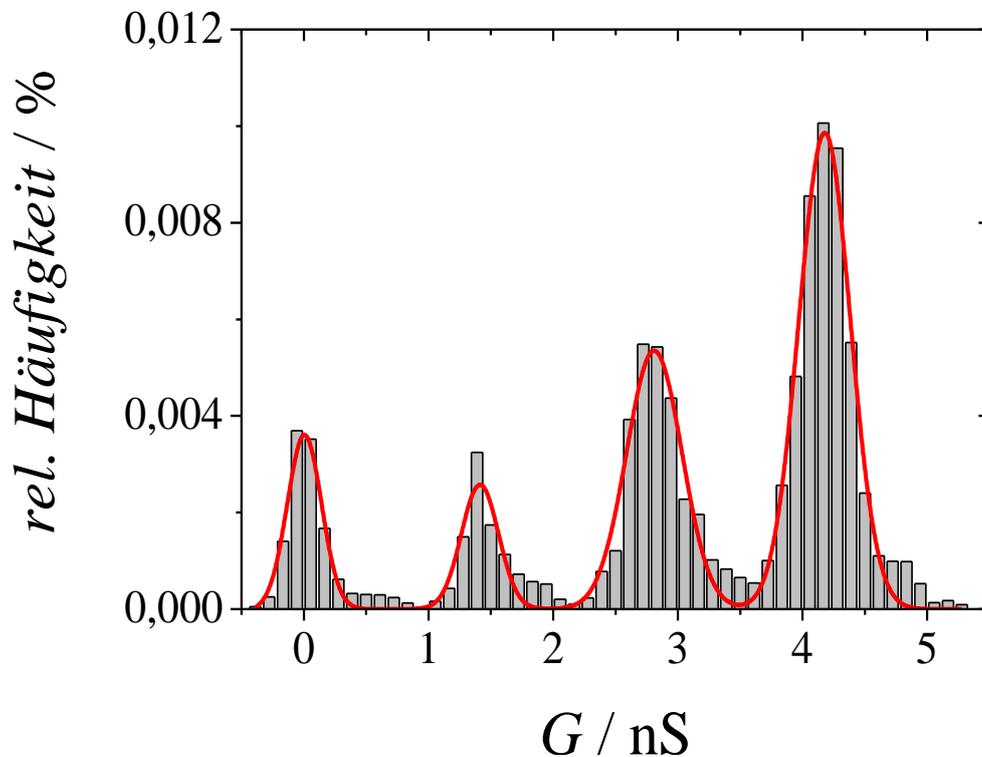


Abb. 4-11: Auftragung der Datenpunkte des in Abb. 4-9 gezeigten Stromsignals in einem Histogramm. Die Leitfähigkeit G wurde über Gleichung (3-7) aus den Daten des Stromsignal und der Transmembranspannung von $U_m = 90$ mV errechnet. Eine Anpassung von Normalverteilungen nach Gleichung (4-2) an die Daten ergab Leitfähigkeiten von $G_{O1} = (1,4 \pm 0,2)$ nS, $G_{O2} = (2,8 \pm 0,2)$ nS und $G_{O3} = (4,2 \pm 0,2)$ nS.

Eine Anpassung von Normalverteilungen an diese Daten ergab Leitfähigkeiten der offenen Zustände von $G_{O1} = (1,4 \pm 0,2)$ nS, $G_{O2} = (2,8 \pm 0,2)$ nS und

$G_{O_3} = (4,2 \pm 0,2)$ nS. Die mittlere Differenz der Leitfähigkeiten ergab sich zu $\Delta G = (1,4 \pm 0,2)$ nS.

4.2.4 VDAC1 in porenüberspannenden Membranen

Nachdem das bakterielle Porin OmpF erfolgreich in porenüberspannende Membranen eingebracht und elektrophysiologisch charakterisiert werden konnte, wurde die Methodik auf das mitochondriale Porin VDAC1 übertragen.

Auch hier wurde zunächst analog zum Vorgehen bei der Untersuchung von OmpF mit der Mueller-Rudin-Technik eine Lipiddoppelschicht auf einem mit TDT funktionalisierten porösen Aluminat erzeugt. Auf dieses Substrat wurde eine 20 mM Lösung des Lipids DPhPC in *n*-Dekan/*n*-Oktan 1:1 (v/v) mittels einer Pipette aufgebracht und anschließend die Parameter der erhaltenen Membran impedanzspektroskopisch quantifiziert. Nachdem das Ausdünnen des Lösungsmitteltropfens bei einer Frequenz von 1 MHz zeitaufgelöst verfolgt wurde, ergab die Anpassung der Parameter eines RC-Ersatzschaltbilds an das Impedanzspektrum der Membran eine spezifische Kapazität von $C_s = 0,52 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, wobei der Membranwiderstand größer als $R_m > 10^8 \Omega$ war und daher im gewählten Frequenzbereich zwischen 0,1 Hz und 1 MHz nicht aufgelöst werden konnte.

Diese Membran wurde zur Rekonstitution des VDAC1-Proteins verwendet. Es wurden in drei Schritten insgesamt 3 μl einer 40 μM VDAC1-Stammlösung (1 M KCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7,4 mit zusätzlichen 0,3 % (v/v) LDAO) unter Rühren zu 4 ml Pufferlösung (1 M KCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7,4) in der Messkammer gegeben. Bei der resultierenden Proteinkonzentration von $c(\text{VDAC1}) = 30 \text{ nM}$ konnte mit einem vorgegebenen Transmembranpotenzial von $U_m = -50 \text{ mV}$ Proteinaktivität beobachtet werden, die sich durch Sprünge zwischen zwei Niveaus im aufgezeichneten Stromsignal äußerten (Abschnitt 3.6.2).



Abb. 4-12: Sprünge im detektierten Stromsignal in Anwesenheit von 30 nM VDAC1, aufgezeichnet bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = -50$ mV in 1 M KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4.

Diese Sprünge im Stromsignal wurden mithilfe der Software Clampfit ausgewertet, wobei, wie in Abschnitt 3.6.2 erläutert, ein Stromniveau dem offenen und ein Stromniveau dem geschlossenen Zustand des VDAC1 zugeordnet wurde.

Bei einer Transmembranspannung von $U_m = -50$ mV konnten insgesamt 7808 Ereignisse, also Sprünge zwischen den einzelnen Niveaus, detektiert werden. Um Aussagen über die Differenzen der Leitfähigkeiten machen zu können, wurden alle beobachteten Werte zunächst in normierten Ereignisamplitudendiagrammen aufgetragen.^[115] Der geschlossene Zustand wurde auf $I_c = 0$ pA normiert, um einen Einfluss der Leitfähigkeit der Membran auszuschließen.

Die Ereignisse wurden in Gruppen ähnlicher Leitfähigkeit, sog. *bins*, zusammengefasst, wobei die Intervallgröße (Breite der *bins*) nach der Regel von Freedman und Diaconis festgelegt wurde:^[116]

$$\delta = \frac{2 \cdot IQR(x)}{n^{-1/3}}. \quad (4-3)$$

Die Intervallgröße δ wurde mithilfe der Anzahl der Ereignisse n und der Interquartilbreite ihrer Verteilung $IQR(x)$ auf $\delta = 50$ festgelegt. Eine Auftragung der Daten als Säulendiagramm ist in **Abb. 4-13** gezeigt.

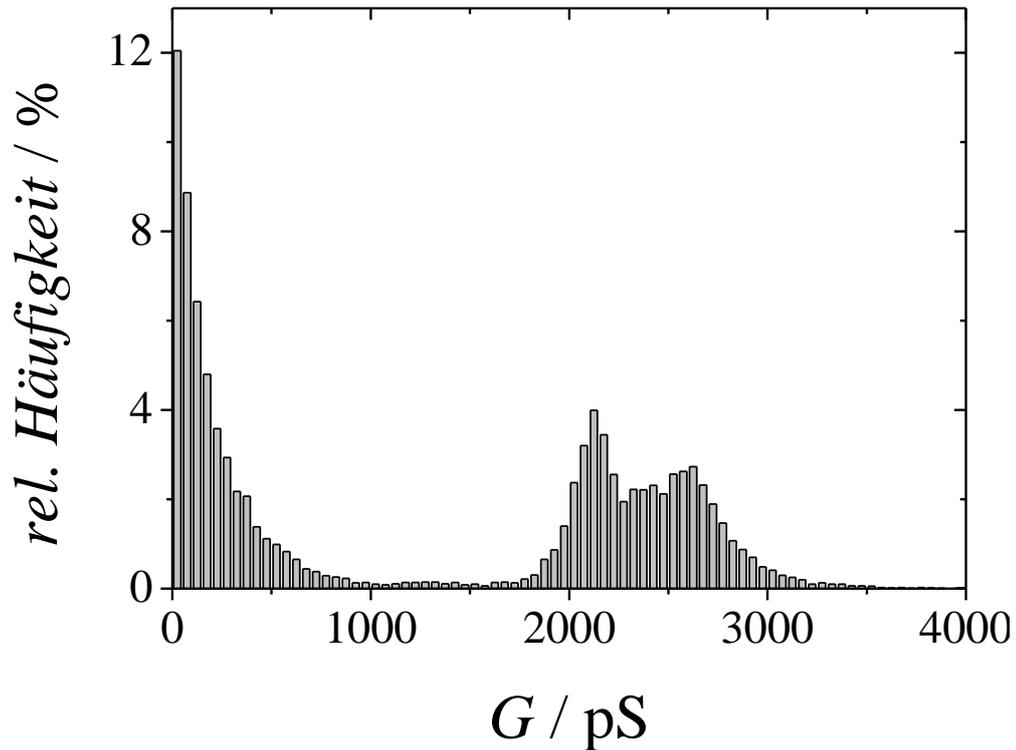


Abb. 4-13: Verteilung der Leitfähigkeiten von 7808 ausgewerteten Ereignissen gemessen bei $U_m = -50$ mV in 1 M KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4.

Für den als geschlossen definierten und auf $G = 0$ nS normierten Zustand ergab sich ein Maximum, beim offenen Zustand waren hingegen zwei Maxima in der Verteilung zu erkennen, was zwei unterschiedlichen Leitfähigkeiten dieses offenen Zustands entsprach. Zur Quantifizierung dieser Leitfähigkeiten wurden an die Daten des offenen Zustands nach Gleichung (4-2) zwei Normalverteilungen angepasst.

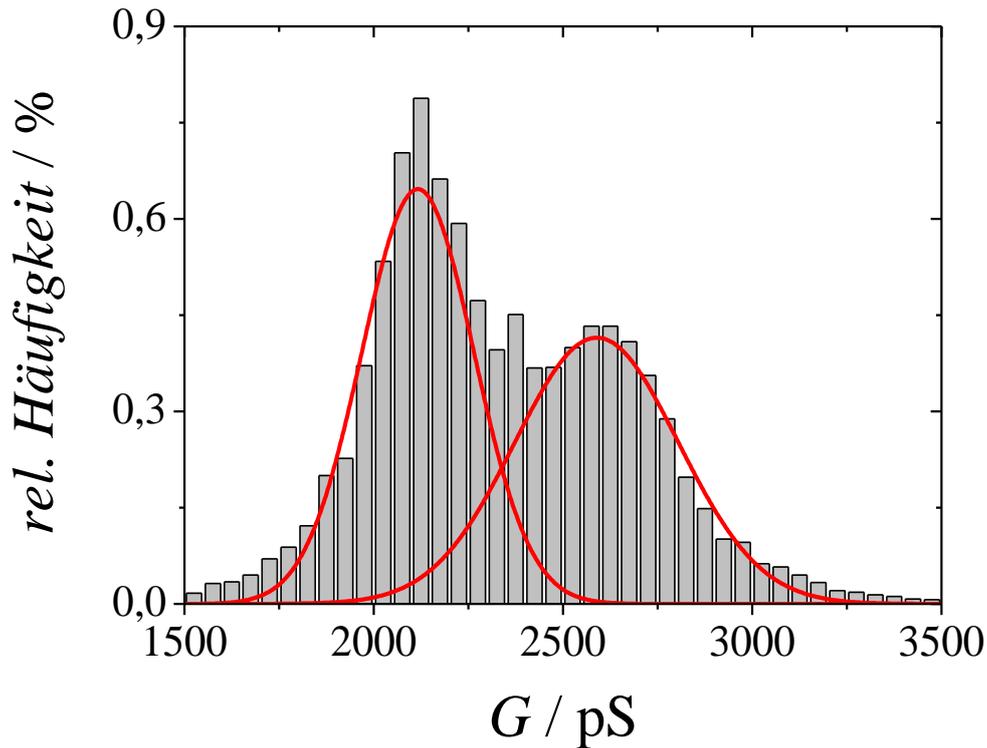


Abb. 4-14: Analyse des aus 7808 detektierten Ereignissen bei $U_m = -50$ mV erhaltenen offenen Zustands des VDAC1. Es sind zwei unterschiedliche Maxima zu erkennen. Aus einer Anpassung zweier Normalverteilungen (jeweils in rot) nach Gleichung (4-2) ergaben sich zwei Leitfähigkeitsdifferenzen gegenüber dem geschlossenen Zustand von $\Delta G_1 = (2117 \pm 140)$ pS respektive $\Delta G_2 = (2589 \pm 211)$ pS.

Die Mittelwerte der Leitfähigkeitsdifferenzen ergaben sich zu $\Delta G_1 = (2,1 \pm 0,1)$ nS und $\Delta G_2 = (2,6 \pm 0,2)$ nS. Eine Auswertung der Flächen unter den jeweiligen Kurven ergab, dass die Population beider Zustände ungefähr gleich groß (1,1 : 1) war.

Da zwei voneinander unterscheidbare Leitfähigkeiten bestimmt werden konnten, wurde weiterhin untersucht, ob sich auch zwei unterschiedliche mittlere Lebensdauern dieser offenen Zustände ergaben. Zu diesem Zweck wurden die Lebensdauern aller Abschnitte, in denen sich der Ionenkanal im offenen (O) Zustand befand, logarithmisch aufgetragen.^[117]

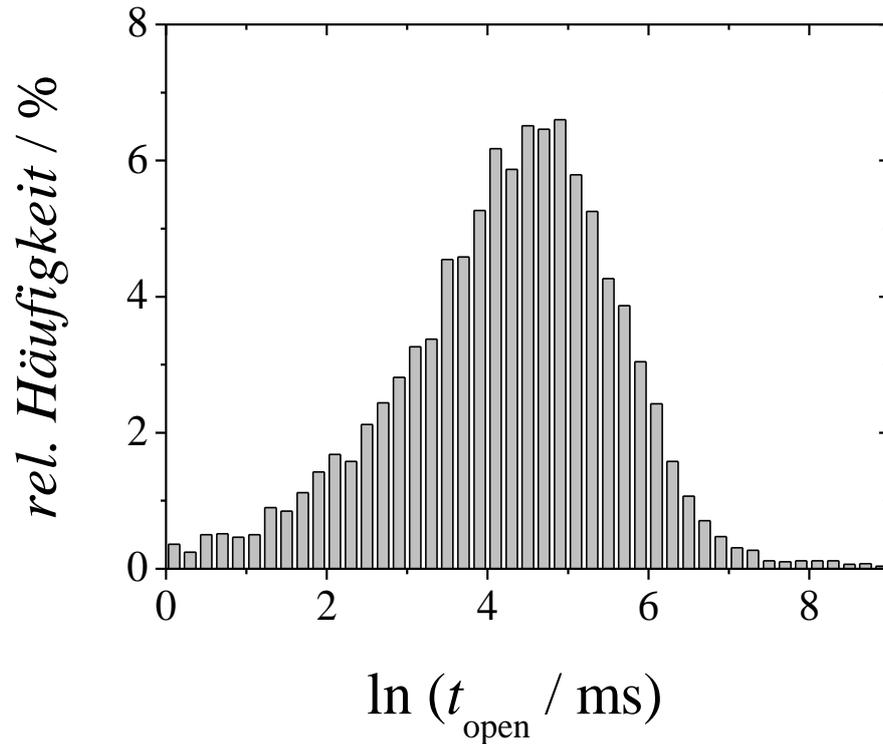


Abb. 4-15: Logarithmische Auftragung der Lebensdauern des offenen Zustands t_{open} bei $U_m = -50$ mV. Da nur ein Maximum zu erkennen ist, existiert auch nur eine mittlere Lebensdauer dieses Zustands.^[117]

In einer solchen Auftragung hätte sich auch eine nur unwesentlich verschiedene Nebenlebensdauer von der Hauptlebensdauer abgehoben und ein zweites Maximum der Verteilung bewirkt. Da dies eindeutig nicht der Fall war, wurde die Lebensdauer des offenen Zustands aus dem monoexponentiellen Abfall der Lebensdauerverteilung nach

$$f(t) = A \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (4-4)$$

ermittelt, wobei t für alle und τ für die mittlere Lebensdauer steht.

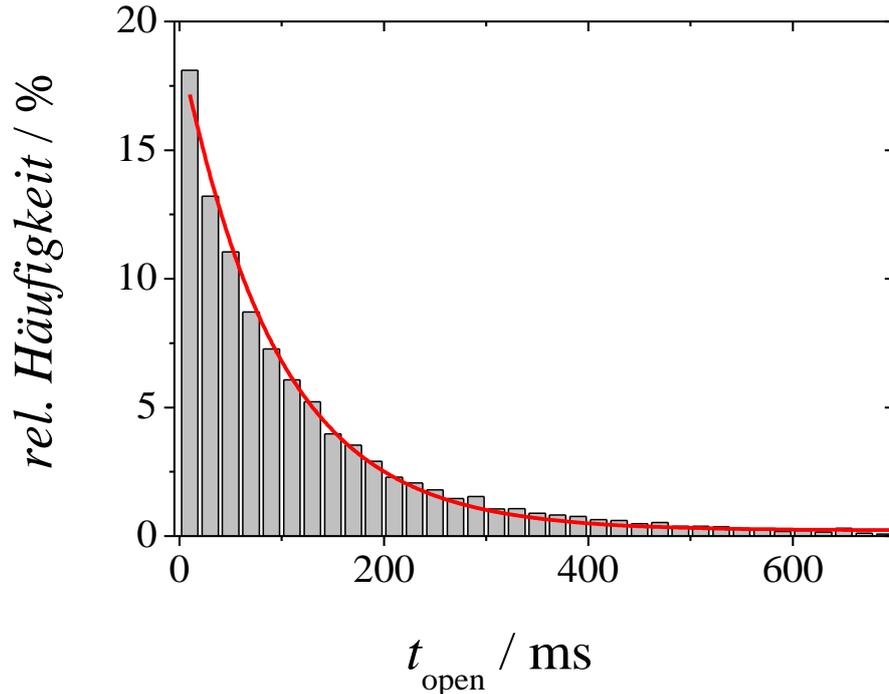


Abb. 4-16: Auftragung der Lebensdauern des offenen Zustands t_{open} bei $U_m = -50$ mV. Die rote Linie zeigt eine Anpassung von Gleichung (4-4) mit einer mittleren Lebendauer von $\tau_{\text{open}} = (95 \pm 2)$ ms an die Daten.

Die in **Abb. 4-16** rot dargestellte Anpassung von Gleichung (4-4) an die Daten ergibt eine mittlere Lebensdauer des offenen Zustands bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = -50$ mV von $\tau_{\text{open}} = (95 \pm 2)$ ms. Die Öffnungswahrscheinlichkeit wurde zu 86,4 % bestimmt, indem die Zeit, die sich das VDAC1-Protein im offenen Zustand befand, durch die Gesamtdauer der ausgewerteten Daten geteilt wurde.

Bei einer Transmembranspannung von $U_m = -60$ mV wurden 289 Ereignisse detektiert, die einen Unterschied in der Leitfähigkeit des offenen und des geschlossenen Zustandes von $\Delta G = (1,6 \pm 0,1)$ nS ergab. Das zugehörige Ereignisamplitudendiagramm ist in **Abb. 4-17** gezeigt.

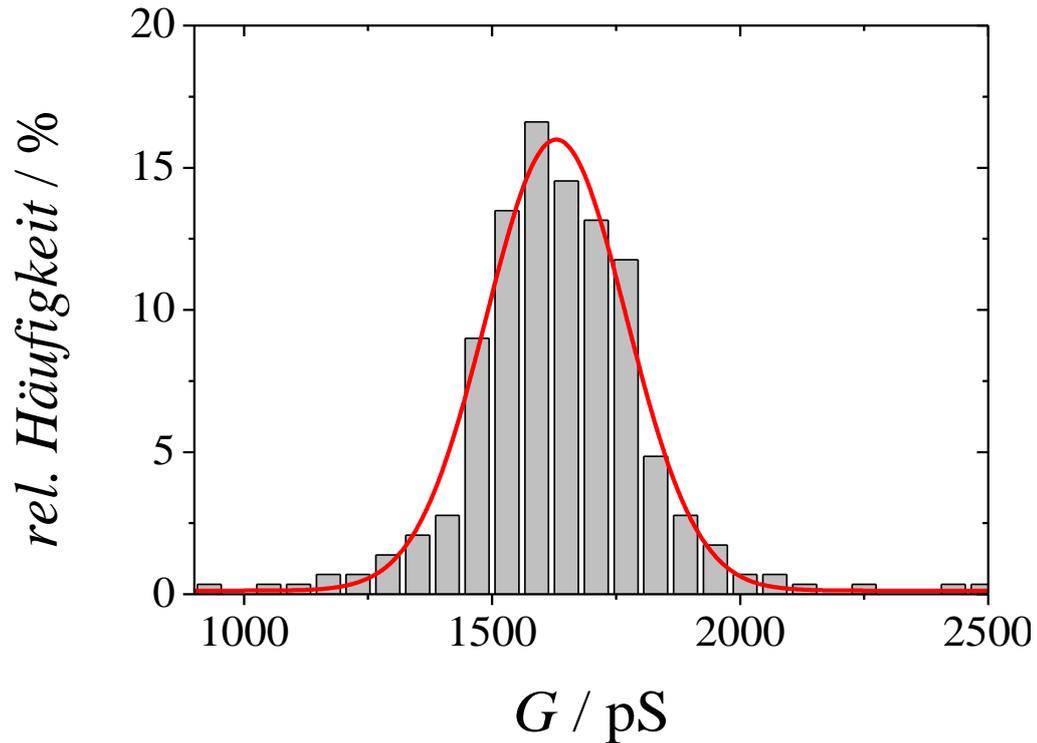


Abb. 4-17: Verteilung der Leitfähigkeiten von 289 ausgewerteten Ereignissen gemessen bei $U_m = -60$ mV in 1 M KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4. Aus einer Anpassung einer Normalverteilung (rot) nach Gleichung (4-2) ergab sich eine Leitfähigkeitsdifferenz von $\Delta G = (1630 \pm 138)$ pS.

Auch hier wurde die mittlere Lebensdauer des offenen Zustands über eine Anpassung von Gleichung (4-4) an die Daten ermittelt. Für diese Spannung ergab sich $\tau_{\text{open}} = (453 \pm 138)$ ms (**Abb. 4-18**).

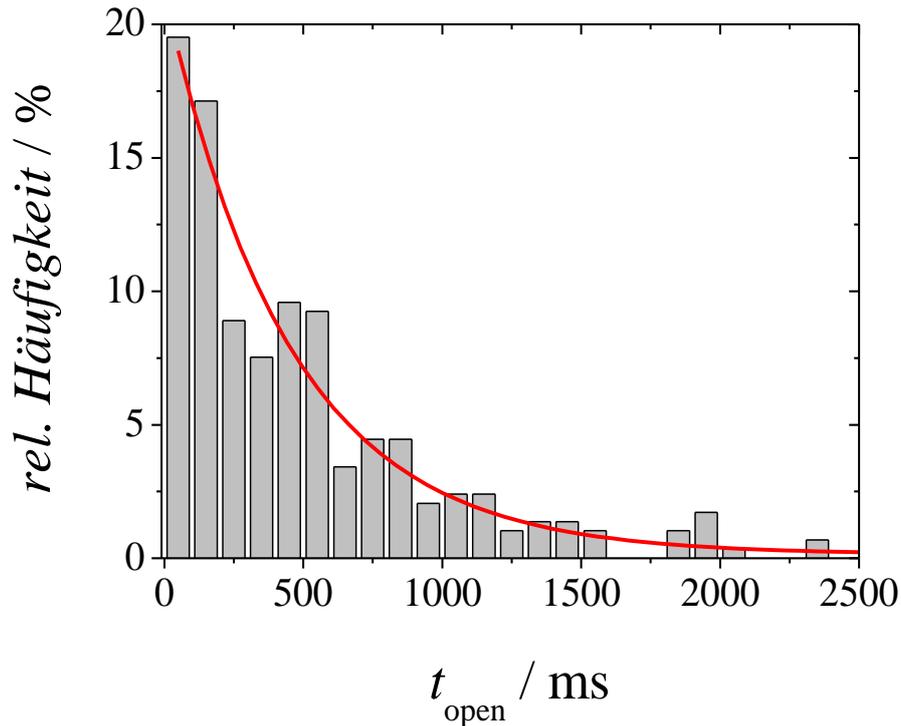


Abb. 4-18: Auftragung der Lebensdauern des offenen Zustands t_{open} bei $U_m = -60$ mV. Die rote Linie zeigt eine Anpassung von Gleichung (4-4) mit einer mittleren Lebendauer von $\tau_{\text{open}} = (453 \pm 138)$ ms an die Daten.

Die Öffnungswahrscheinlichkeit betrug in diesem Fall 79,8 %.

Für Transmembranpotenzial von $U_m = -30$ mV konnten 89 auswertbare Ereignisse registriert werden. Die Verteilung der Amplituden ist in **Abb. 4-19** gezeigt, eine Normalverteilung wurde auch hier zur Ermittlung der mittleren Leitfähigkeitsdifferenz von $\Delta G = (2,5 \pm 0,3)$ nS herangezogen.

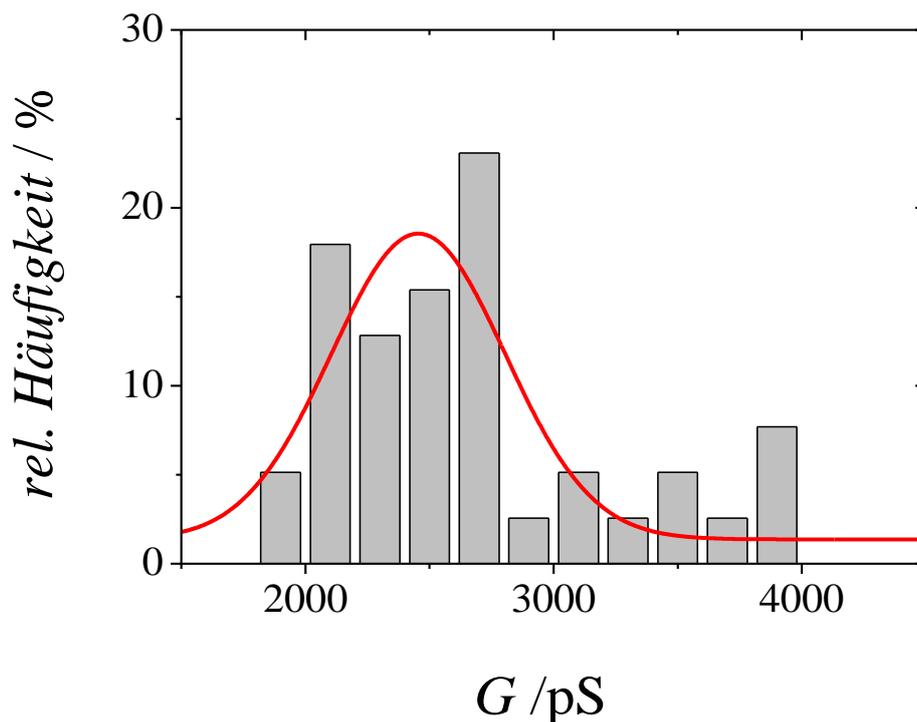


Abb. 4-19: Verteilung der Leitfähigkeiten von 89 ausgewerteten Ereignissen gemessen bei $U_m = -30$ mV in 1 M KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4. Aus einer Anpassung einer Normalverteilung (rot) nach Gleichung (4-2) ergab sich eine Leitfähigkeitsdifferenz von $\Delta G = (2455 \pm 348)$ pS.

Eine Ermittlung der mittleren Lebensdauer konnte auf Grund der unterschiedlichen Verteilung der Werte nicht erfolgen.

4.3 Charakteristik des VDAC1 in Einzelkanalmessungen

VDAC1 besitzt die charakteristische Eigenschaft, bei erhöhtem Transmembranpotenzial in Zustände geringerer Leitfähigkeit zu wechseln (siehe Abschnitt 1.4.2). In Abb. 4-20 wird dieses Phänomen anhand zweier, bei unterschiedlichen Transmembranpotenzialen U_m aufgezeichneten Stromsignale verdeutlicht.

4. Ergebnisse

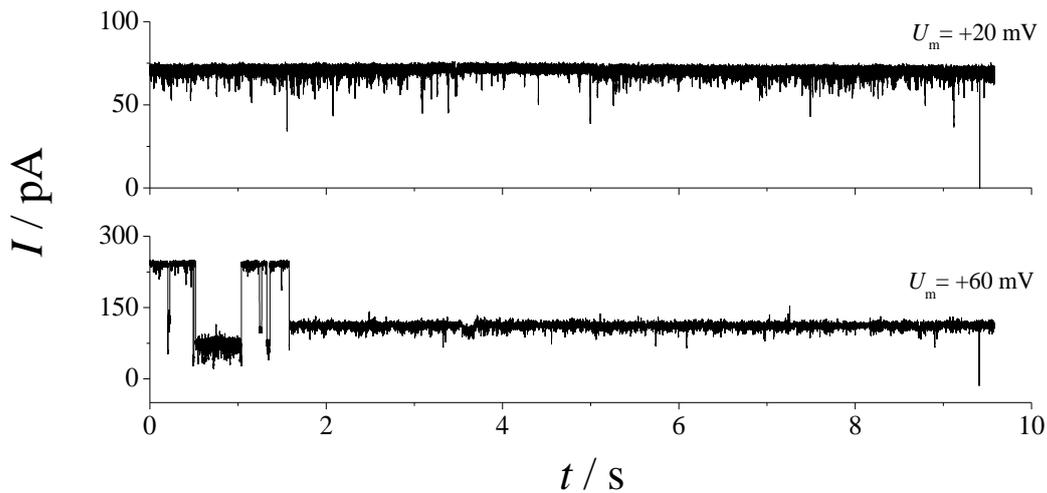


Abb. 4-20: Stromsignale, aufgenommen an einer Membran der Zusammensetzung DPhPC/Cholesterol 9:1, welche einen einzelnen VDAC1 enthielt. Die Signale wurden bei einem konstanten Transmembranpotenzial von $U_m = 20$ mV (**oben**) und $U_m = 60$ mV (**unten**) aufgenommen. Puffer: 1 M KCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7,4.

Das obere Signal wurde bei einer angelegten Spannung von $U_m = 20$ mV aufgenommen und blieb mit durchgängig $I = 75$ pA konstant. Die Leitfähigkeit ergibt sich nach Gleichung (3-7) zu $G_o = 3,9$ nS, was einem offenen VDAC1 entspricht. Allerdings lässt sich ohne weitere Informationen nicht zwischen einer Membran mit geringen Widerstand und einer Membran mit enthaltenen inaktiven Proteinkanälen unterscheiden, durch welche ein konstanter Stromfluss zu messen wäre.

Einen Beweis der Anwesenheit des VDAC1 kann nur durch eine Messung bei erhöhter Transmembranspannung erfolgen. Das untere der beiden in **Abb. 4-20** gezeigten Stromsignale wurde bei $U_m = 60$ mV aufgenommen und besitzt zunächst eine Leitfähigkeit von $G_o = 4$ nS. Ab $t = 0,4$ s weist das Signal im weiteren Verlauf zwei niedrigere Leitfähigkeiten von $G_{c1} = 1,7$ nS und $G_{c2} = 1,3$ nS auf, was typisch für das spannungssensitive Verhalten eines VDAC1 ist, der bei hohem Potenzial in einen weniger leitfähigen Zustand wechselt.

4.3.1 Spannungsrampen

Ein Problem, welches sich ganz konkret bei Untersuchungen an VDAC-Proteinen ergibt, besteht darin, dass diese Kanäle bei konstant anliegender Transmembranspannung dazu tendieren, in einen Zustand niedriger Leitfähigkeit zu wechseln und dort minuten- bis stundenlang zu verbleiben. Erst durch eine Depolarisation der Membran lassen sich die Kanäle dann wieder öffnen.^[118] Das Potential muss zu diesem Zweck vorübergehend wieder auf $U_m = 0$ mV gesenkt werden, weswegen sich zur Untersuchung dieser Kanäle sogenannte Spannungsrampen etabliert haben. Die über die Membran applizierte Spannung wird kontinuierlich bis zu einem Maximalwert erhöht (beispielsweise $U_{m,max} = 60$ mV) und danach sukzessive wieder auf $U_m = 0$ mV zurückgefahren. Dies ermöglicht eine Rückkehr der Proteine in ihren offenen Zustand und liefert so durch wiederholte Anwendung eine Vielzahl an Ereignissen auch auf Einzelkanalebene. Wird die Spannung nicht nur im Positiven verändert, sondern auch in gleicher Weise im negativen Spannungsbereich variiert, können Asymmetrien im Verhalten der beobachteten Ionenkanäle analysiert werden. Abb. 4-21 verdeutlicht dies am Beispiel eines Dreiecksspannungspulses mit maximaler Amplitude von $U_{m,max} = 60$ mV und einer Frequenz von $f = 100$ mHz.

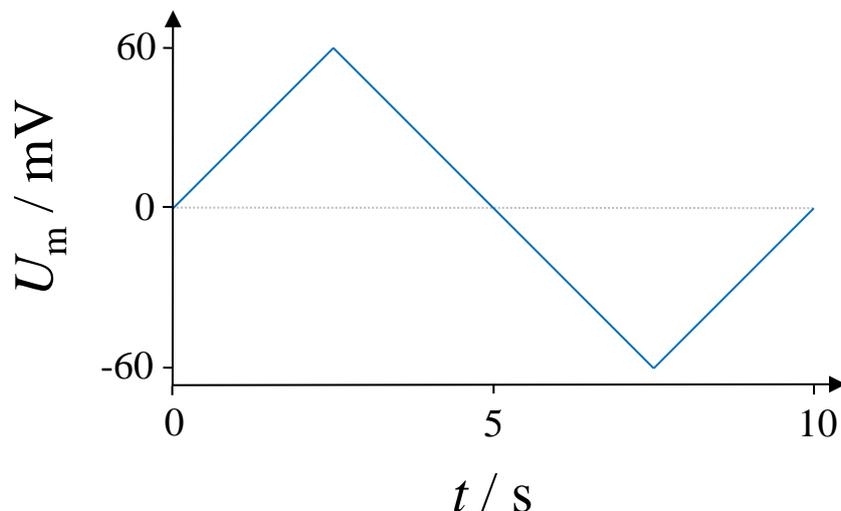


Abb. 4-21: Zeitlicher Verlauf der applizierten Transmembranspannung U_m am Beispiel eines Dreiecksspannungspulses mit maximaler Amplitude von $U_{m,max} = \pm 60$ mV und einer Frequenz von $f = 100$ mHz.

4. Ergebnisse

Wird diese Spannungsrampe an einen Membran mit einem enthaltenem VDAC1 angelegt, so resultiert eine Stromantwort, deren Verlauf exemplarisch in Abb. 4-22 gezeigt ist. Zunächst folgt der Stromfluss proportional dem aufgeprägten, in **Abb. 4-21** gezeigten Spannungssignal, steigt also mit konstanter Steigung an. Nach Gleichung (3-7) entspricht dies einer konstanten Leitfähigkeit von $G_o = 4,0$ nS. Geht das VDAC1-Protein bei erhöhtem Potenzial in einen weniger leitfähigen Zustand mit einer Leitfähigkeit von $G_c = 1,6$ nS über (bei $t = 1,9$ s), so bewirkt dieser Übergang einen sprunghaften Abfall des Stroms.

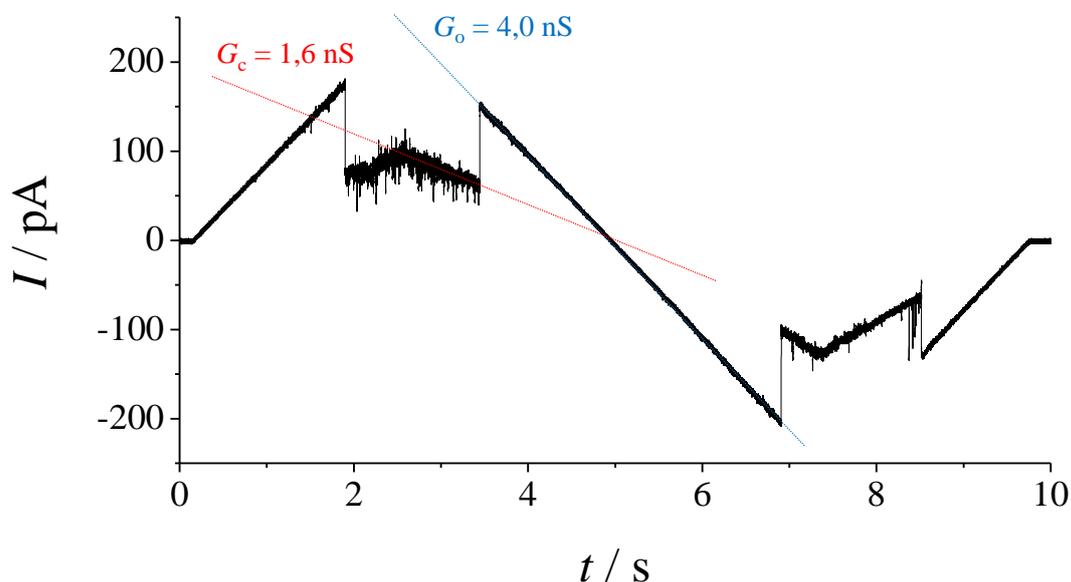


Abb. 4-22: Detektierte Stromantwort auf die in Abb. 4-21 gezeigte Spannungsrampe, gemessen an einer Membran der Zusammensetzung DPhPC/Cholesterol 9:1, welche ein einzelnes VDAC1-Protein enthielt. Da der Strom sich proportional zur angelegten Spannung ändert, entspricht eine konstante Steigung des Signals einer konstanten Leitfähigkeit. Die Leitfähigkeit $G_o = 4,0$ nS des offenen Zustands des VDAC1 ist durch eine blaue Linie angedeutet. Bei $t = 1,9$ s fällt der Strom abrupt ab, was durch einen Wechsel des VDAC1 in den geschlossenen Zustand mit einer Leitfähigkeit von $G_c = 1,6$ nS (rote Linie) hervorgerufen wird. Puffer: 1 M KCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7,4.

Durch die Depolarisation der Membran mit fallendem Potential öffnet der Kanal bei $t = 3,7$ s wieder in seinen höher leitfähigen Zustand, was analog auch bei negativen Transmembranpotenzialen auftritt.

4.4 Elektrophysiologie des VDAC-Proteins

Auf porösen Aluminaten konnten Membranen nur über das *painten* von Lipiden in organischen Lösungsmitteln (Mueller-Rudin-Technik, Abschnitt 1.6.1) reproduzierbar präpariert werden. Da bei dieser Technik aber verbleibendes organisches Lösungsmittel in den Membranen die Eigenschaften von Membranproteinen beeinflussen kann, wurden die Untersuchungen am VDAC1 auf dem Port-a-Patch System (Abschnitt 3.7) weitergeführt. Mithilfe proteinhaltiger Lipidvesikel (GUVs) wurden Membranen über einer Öffnung mit einem Durchmesser von ca. $3\ \mu\text{m}$ in einem Borsilikatchip präpariert (Abschnitt 3.6.1). Ohne zugesetztes Protein wurden so standardmäßig Membranen mit Widerständen im Gigaohmbereich erhalten, was aus dem resultierenden Stromverlauf als Antwort auf eine angelegte Spannungsrampe mit einer Frequenz von $f = 100\ \text{mHz}$ und einer Amplitude von $U_m = \pm 60\ \text{mV}$ (vgl. **Abb. 4-21**) nach Gleichung (3-7) errechnet werden konnte.

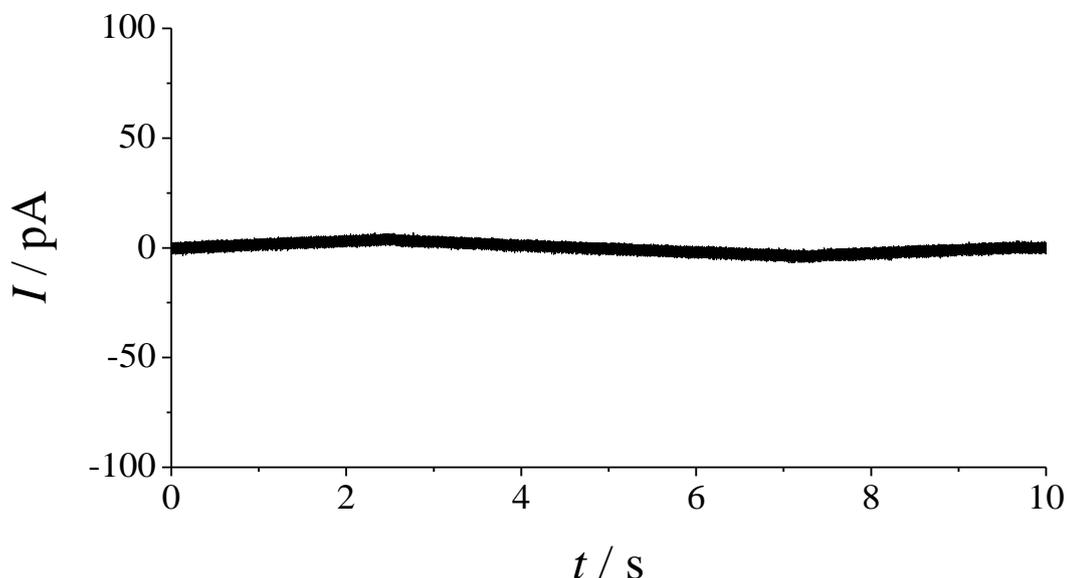


Abb. 4-23: Stromantwort einer Membran ohne enthaltenes Protein auf eine angelegte Spannungsrampe mit einer Frequenz von $f = 100\ \text{mHz}$ und einer Amplitude von $U_m = \pm 60\ \text{mV}$. Die Membran wurde durch Spreiten eines GUVs bestehend aus DPhPC/Cholesterol (9:1) erzeugt und wies einen Widerstand von $R_m = 24\ \text{G}\Omega$ auf. Puffer: $1\ \text{M KCl}$, $1\ \text{mM CaCl}_2$, $5\ \text{mM HEPES}$, $\text{pH } 7,4$.

4. Ergebnisse

Das Stromsignal folgt proportional dem aufgeprägten, sich periodisch ändernden Transmembranpotenzial, die Steigung ist sowohl bei steigendem als auch bei fallendem Potenzial gleich. Dies entspricht, wie in Abschnitt 4.3.1 erläutert, einer konstanten Leitfähigkeit. In diesem Fall nimmt der Strom bei anliegendem maximalen Transmembranpotenzial von $U_{m,max} = \pm 60$ mV um 2,5 pA zu (**Abb. 4-23**), was nach Gleichung (3-7) einem Membranwiderstand von $R_m = 24$ G Ω entspricht.

Der Verlauf des Stromsignals in Anwesenheit eines VDAC1-Ionenkanals ist in **Abb. 4-24** dargestellt.

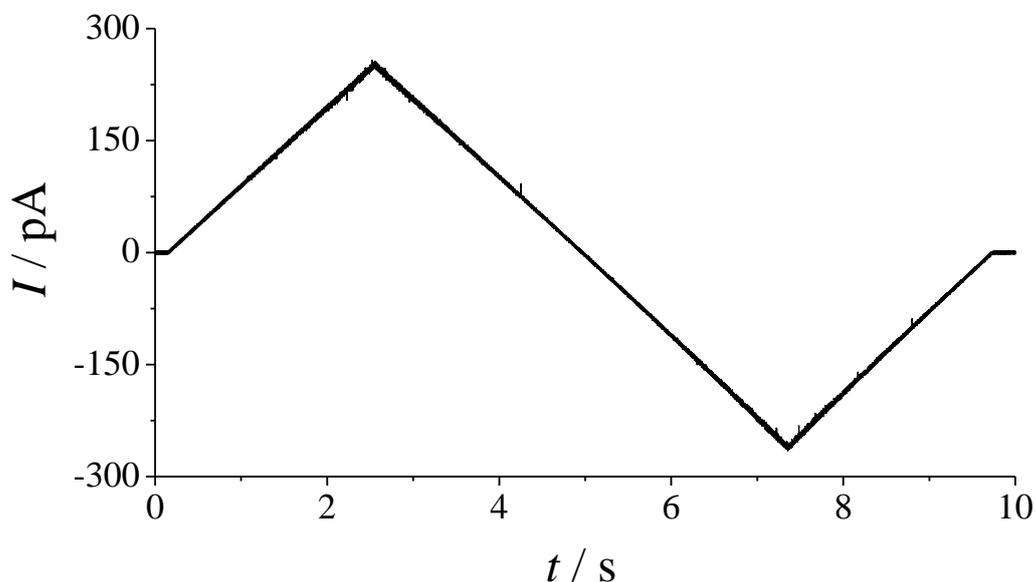


Abb. 4-24: Stromantwort einer Membran mit einem rekonstituierten VDAC1-Molekül. Die Membran wurde durch Spreiten eines GUVs bestehend aus DPhPC/Cholesterol (9:1) erzeugt, welches zuvor mit VDAC1 inkubiert wurde. Der Widerstand betrug $R_m = 0,24$ G Ω . Puffer: 1 M KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4.

Auch hier ergibt sich nach Gleichung (3-7) zu jedem Zeitpunkt aus dem Quotient des Stroms und der jeweiligen Spannung ein konstanter Membranwiderstand von $R_m = U/I = 0,24$ G Ω bzw. eine konstante Leitfähigkeit von $G = R^{-1} = 4,2$ nS. Diese Leitfähigkeit spricht für einen einzelnen Ionenkanal, der im offenen Zustand in der Membran vorliegt. Allerdings lässt sich nicht ausschließen, dass eine Membran beobachtet wird, deren Widerstand zufällig in einer Größenordnung liegt, deren

korrespondierende Leitfähigkeit der eines Ionenkanals der Größe des VDAC1 entspricht.

Unzweifelhaft nachweisen lässt sich die Anwesenheit des Proteins nur, wenn *gating*-Ereignisse, also Wechsel in einen weniger leitfähigen Zustand, beobachtet werden können. **Abb. 4-25** verdeutlicht dies anhand eines Stromsignals, welches direkt nach dem in **Abb. 4-24** gezeigten Signal an derselben Membranpräparation aufgenommen wurde. Es ist eine sprunghafte Abnahme der Leitfähigkeit von $G_o = 4,2 \text{ nS}$ auf $G_c = 1,7 \text{ nS}$ für ca. 0,7 s mit anschließender sprunghafter Rückkehr auf den Ausgangswert zu erkennen.

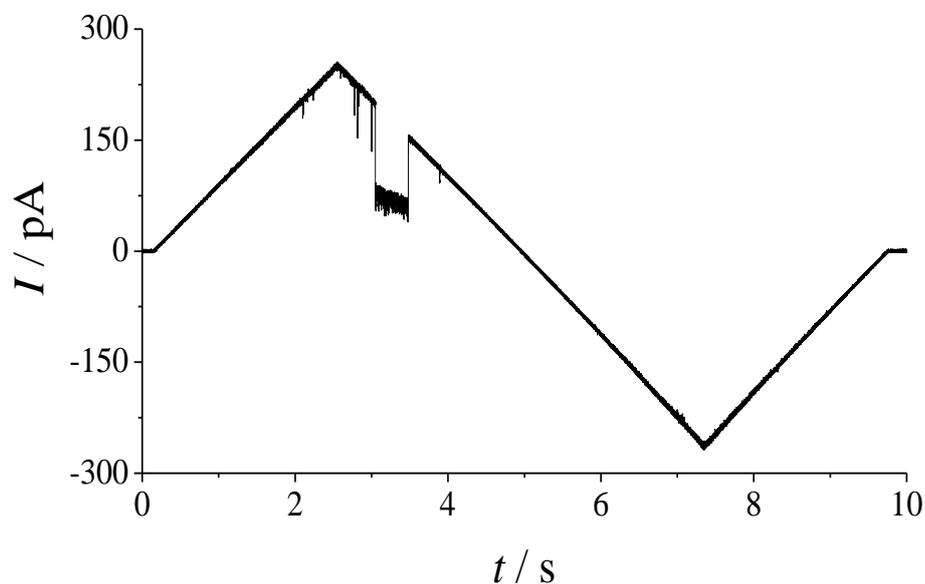


Abb. 4-25: Stromantwort einer Membran mit einem enthaltenen VDAC1-Molekül. Eine Abnahme der Leitfähigkeit von $G_o = 4,2 \text{ nS}$ auf $G_c = 1,7 \text{ nS}$ mit anschließender Rückkehr auf den Ausgangswert beweist die Anwesenheit eines VDAC1. Puffer: 1 M KCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7,4.

Ein solches Verhalten kann nur durch einen aktiven, also durch ein anwesendes Membranprotein hervorgerufenen Prozess erklärt werden. Andere denkbare Ursachen einer Leitfähigkeitsmodulation wie Membranfluktuationen oder ein Einfluss von z. B. restlichem Detergens würden, wenn überhaupt, eine Zunahme des resultierenden Stroms bewirken. Die Membranleitfähigkeit G_m addiert sich zu der Leitfähigkeit des Kanals und kann nicht einzeln aufgelöst werden. Da sie gering im

4. Ergebnisse

Vergleich zur Leitfähigkeit eines VDAC1 ist, verändert sie maximal deren Nachkommastelle.

4.4.1 Multikanal Experimente

Eine besondere Herausforderung bei diesen Messungen stellte die Integration nur eines einzigen Kanals in die porenüberspannende Membran dar. Zwar lassen sich aus Messungen an Membranen mit mehreren enthaltenen VDAC1-Molekülen Informationen über die Leitfähigkeitsdifferenzen der beteiligten Kanäle gewinnen, wichtige Aspekte wie die Öffnungswahrscheinlichkeit P_o und damit die Reaktion eines einzelnen Kanals auf eine erhöhte Transmembranspannung können allerdings nicht ausgewertet werden.

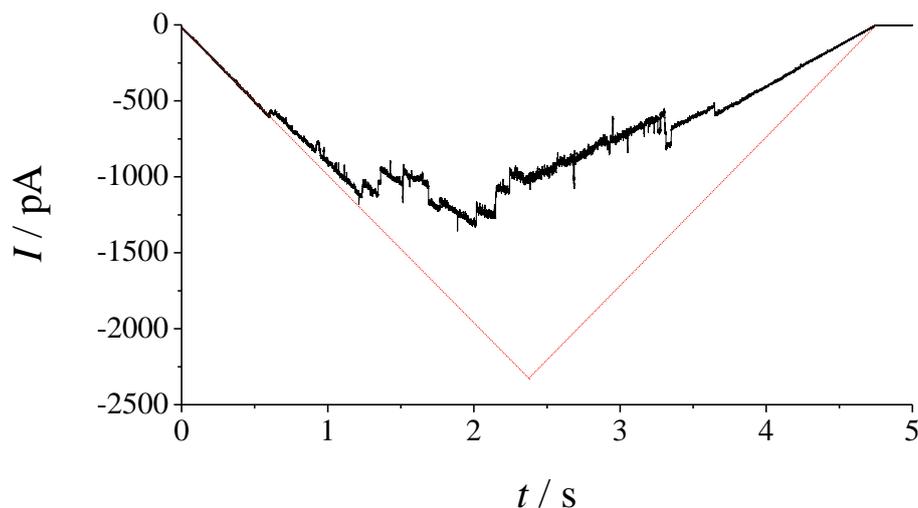


Abb. 4-26: Stromantwort einer Membran mit mehreren enthaltenen VDAC1-Molekülen. Die Transmembranspannung wurde von $U_m = 0$ mV auf $U_m = -60$ mV gesenkt und anschließend wieder auf $U_m = 0$ mV zurückgefahren. Das Schließen einzelner Kanäle äußert sich in einer Stufenweise Abnahme des Stroms als Reaktion auf ein erhöhtes Transmembranpotenzial. Der theoretische Stromverlauf ohne diese Schließereignisse ist rot dargestellt. Puffer: 1 M KCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7,4.

Abb. 4-26 verdeutlicht dies anhand der Stromantwort einer Membran, die eine Vielzahl von VDAC1-Molekülen enthielt. Die angelegte Spannung wurde zunächst bis $t = 2,36$ s mit einer Rate von 24 mV/s von $U_m = 0$ mV auf $U_m = -60$ mV abgesenkt und anschließend in gleicher Weise wieder zurück bis auf $U_m = 0$ mV erhöht. Von $t = 0$ s bis $t = 0,7$ s wurde eine Leitfähigkeit von $G_0 = 37,3$ nS

beobachtet, welche mit steigendem Potential in acht Stufen ($G_1 = 34,4 \text{ nS}$, $G_2 = 32,6 \text{ nS}$, $G_3 = 30,0 \text{ nS}$, $G_4 = 27,4 \text{ nS}$, $G_5 = 24,6 \text{ nS}$, $G_6 = 23,4 \text{ nS}$, $G_7 = 20,2 \text{ nS}$) auf $G_8 = 17,3 \text{ nS}$ bei $U_m = -60 \text{ mV}$ abfiel. Die eingezeichnete rote Linie zeigt den theoretischen Verlauf des Stromsignals ohne Schließereignis. Eine durchschnittliche sprunghafte Abnahme der Leitfähigkeit um $\Delta G = (2,6 \pm 0,5) \text{ nS}$ lässt den Schluss zu, dass es sich bei den beobachteten Sprüngen um mindestens acht in der betrachteten Membran vorhandenen VDAC-Proteine handelt, die nacheinander als Reaktion auf das erhöhte Membranpotenzial schließen. Allerdings wurde bei anschließender Erhöhung des Potenzials nur eine Zunahme in zwei Stufen auf $G_{\text{rück,max}} = 19,7 \text{ nS}$ beobachtet. Zwar liegt die Vermutung nahe, dass hier zwei Kanäle wieder in den offenen Zustand wechselten, jedoch ist es ausgeschlossen, Rückschlüsse darauf zu ziehen, um welche der vorhandenen Kanäle es sich im Einzelnen handelte. Die Dauer, die ein spezifischer Kanal im geschlossenen Zustand verbrachte, kann somit prinzipiell nicht bestimmt werden. Weiterhin wäre es auch denkbar, dass einzelne Kanäle während der Messung aus dem porenüberspannenden Bereich der verwendeten Membran herausdiffundiert sind, was allerdings eine Abnahme der Leitfähigkeit in der Größenordnung von $\Delta G = 4 \text{ nS}$ zur Folge hätte. Dieses Phänomen wurde nicht beobachtet.

Auch lediglich zwei anwesende Kanäle erschweren die Interpretation der Daten erheblich. In Abb. 4-27 ist eine Stromantwort einer 100 mHz Spannungsrampe dargestellt, die nur zwei oder drei Ionenkanäle enthält.

4. Ergebnisse

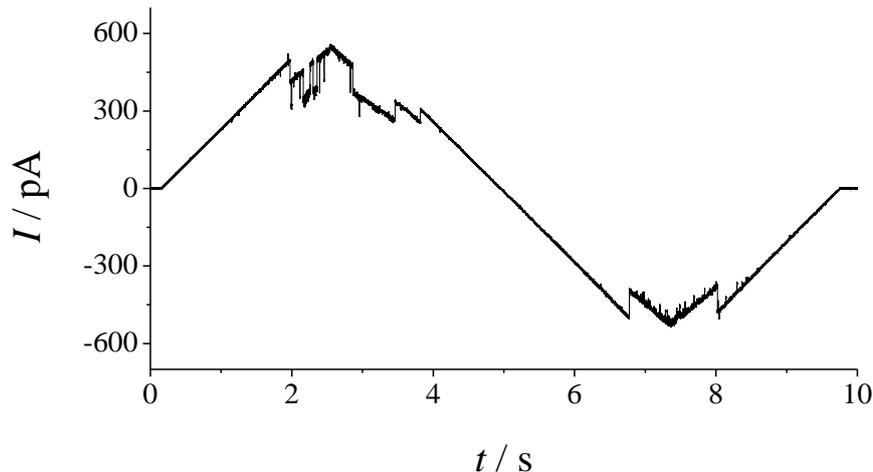


Abb. 4-27: Stromantwort einer Membran mit zwei oder drei enthaltenen VDAC1-Proteinen. Eine Abnahme der Leitfähigkeit im positiven Bereich von $G_o = 11,0$ nS auf $G_{c1} = 9,0$ nS und weiter auf $G_{c2} = 7,1$ nS mit anschließender Rückkehr auf den Ausgangswert legt die Anwesenheit von mindestens zwei VDAC1-Molekülen nahe. Puffer: 1 M KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4.

Es können drei verschiedenen Leitfähigkeitsstufen unterschieden werden. Beträgt die Leitfähigkeit zu Beginn bei niedrigem Potential noch $G_o = 11,0$ nS, so sinkt sie zunächst auf $G_{c1} = 9,0$ nS und schließlich auf $G_{c2} = 7,1$ nS. Die Differenz von $\Delta G_1 = 2,0$ nS bzw. $\Delta G_2 = 1,9$ nS legt die Vermutung nahe, dass es sich um zwei Kanäle handelt, die sukzessive schließen. Im Bereich positiven Potentials wäre für beide Kanäle ein erneuter Wechsel in den geöffneten Zustand bei abnehmendem Potenzial zu verzeichnen. Obwohl die Aufenthaltsdauer im geschlossenen Zustand jedem Kanal plausibel zuzuordnen wäre, ergeben sich auch hier Probleme hinsichtlich der Interpretation. Im Bereich negativen Potentials ist eine Abnahme von $G_o = 11,1$ nS auf $G_c = 8,8$ nS mit anschließender Rückkehr auf den Ausgangswert zu erkennen, die keinem der beiden vorher postulierten Kanäle eindeutig zuzuordnen wäre. Weiterhin ergibt sich für den Fall, dass beide Kanäle geschlossen wären eine Restleitfähigkeit von $G_2 = 7,1$ nS. Bei einer maximalen Leitfähigkeit des VDAC1 von $G_{\max} = 4,0$ nS könnten abzüglich beider Stufen nur noch insgesamt ca. 4 nS von den beiden Kanälen im geschlossenen Zustand stammen. Die restlichen 3,1 nS wären dann allerdings zu wenig für einen offenen dritten Kanal. Es bleibt damit unklar, ob eventuell ein dritter Kanal, der dauerhaft im geschlossenen Zustand vorliegt, mit anwesend ist, oder die komplette Restleitfähigkeit einem generell geringeren Membranwiderstand geschuldet ist.

4.4.2 Einzelkanalexperimente am VDAC1

Eine Möglichkeit, die detektierten Ereignisse eindeutig zuzuordnen, besteht darin, Messungen mit nur einem in der Membran befindlichen Kanal durchzuführen.

Um Membranpräparationen mit nur einem Kanal erzeugen zu können, mussten die per Elektroformation erzeugten GUVs (Abschnitt 3.3.2) mit dem im Detergens LDAO solubilisierten hydrophoben Membranprotein VDAC1 inkubiert werden. In diesem Schritt musste zunächst die kritische Mizellbildungskonzentration (*critical micellar concentration*, CMC) eines Detergens‘ unterschritten werden, um so die Detergenzmizellen, welche die Membranproteine in Lösung halten, aufzulösen und eine spontane Integration der Proteine in die hydrophobe Lipiddoppelschicht der GUVs zu ermöglichen.^[119] Die verwendeten Proteinlösungen enthielten typischerweise 0,3 % LDAO (v/v) und wiesen daher eine Detergenzkonzentration von $c_{\text{LDAO}} = 13 \text{ mM}$ auf ($M_{\text{LDAO}} = 229,4 \text{ g/mol}$). Für LDAO beträgt die CMC 1-2 mM.^[120] Wurde mit hohen LDAO-Konzentrationen inkubiert, so wurden die Lipidvesikel destabilisiert, wie Durchlicht-Hellfeldmikroskopaufnahmen (BX 51 Systemmikroskop, Olympus GmbH, Hamburg) zeigten. Ab einer Detergenzkonzentration von ca. $c_{\text{LDAO}} = 50 \mu\text{M}$, wurden nur wenige GUVs destabilisiert (siehe **Abb. 4-28**), allerdings führte dies häufig zu Messungen mit mehreren beteiligten Proteinen (Abschnitt 4.4.1).

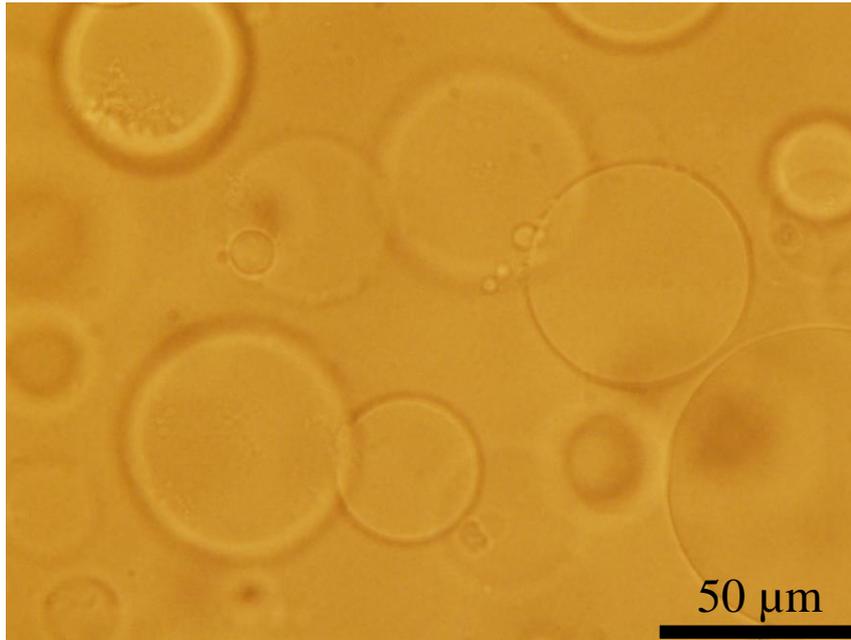


Abb. 4-28: Durchlichtmikroskopische Aufnahme einer GUV-Suspension (DPhPC/Cholesterol 9:1), hergestellt in 1 M Sorbitlösung, in Reinstwasser. Die Vesikel wurden über Nacht bei einer Detergenskonzentration von $c_{\text{LDAO}} = 50 \mu\text{M}$ mit VDAC1-Stammlösung inkubiert.

Für die gewünschten Einzelkanalmessungen wurde daher eine Proteinkonzentration von $c_{\text{VDAC1}} = 50 \text{ nM}$ gewählt, während gleichzeitig die CMC des Detergens‘ LDAO mit Konzentrationen von $c_{\text{LDAO}} = 7\text{-}13 \mu\text{M}$ weit unterschritten wurde (*vide supra*).

Eine exemplarische Aufnahme, die das spannungsabhängige Schließen des VDAC1 explizit zeigt, ist in **Abb. 4-29** gezeigt. Sowohl bei positivem, als auch bei negativem Potential wechselt der Kanal in seinen weniger leitfähigen geschlossenen Zustand, sobald das angelegte Potential einen gewissen Wert (in diesem Fall ca. +40 mV und -50 mV) über- bzw. unterschritten hat. Zur Verdeutlichung dieses Befundes sind die verschiedenen Leitfähigkeiten, die, solange sie konstant sind, eine konstante Steigung der Stromkurve zur Folge haben, durch farblich unterschiedliche Geraden markiert und hervorgehoben.

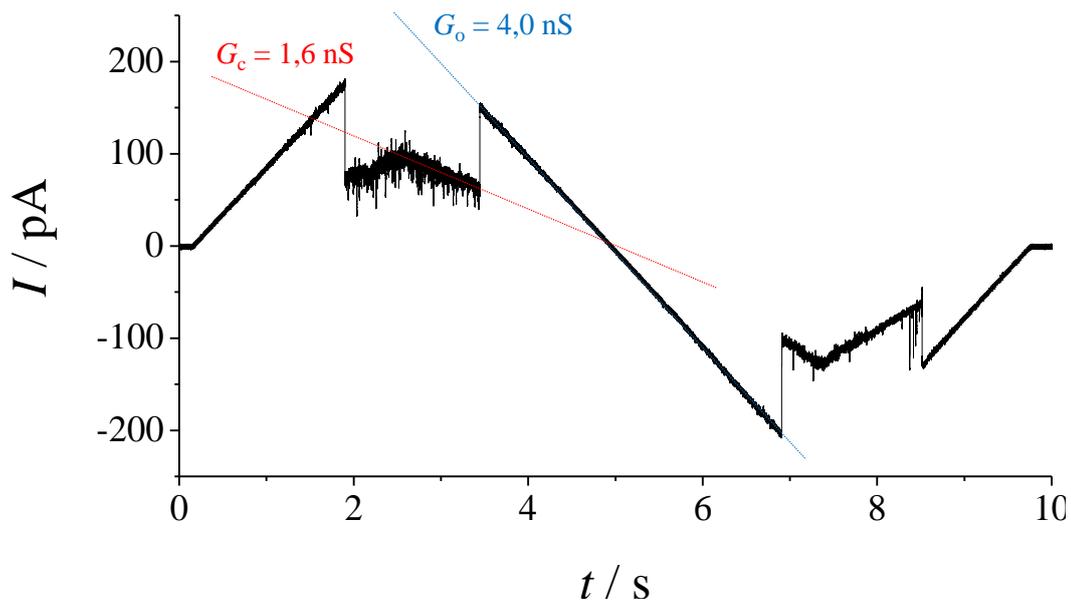


Abb. 4-29: Stromantwort einer Membran mit einem enthaltenen VDAC1. Eine Abnahme der Leitfähigkeit im positiven Bereich von $G_o = 4,0 \text{ nS}$ (blau) auf $G_c = 1,6 \text{ nS}$ (rot) mit anschließender Rückkehr auf den Ausgangswert beweist die Anwesenheit eines VDAC1-Proteins in der Membran. Puffer: 1 M KCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7,4.

Wie aus den vorhergehend beschriebenen drei Abbildungen bereits ersichtlich ist, verhält sich ein einzelner in einer Membran untersuchter VDAC1 nicht in jedem Durchlauf einer angelegten Spannungsrampe gleich. Während einige Aufnahmen ein Schließen des Kanals im positiven, negativen oder in beiden Bereichen des Stromsignals zeigen, erscheint er in anderen komplett offen, zeigt also eine konstante Leitfähigkeit ohne Wechsel in andere Stufen.

4.4.3 Automatische Basislinienkorrektur und Auswertung von Stromsignalen

Um das stochastische Öffnen und Schließen des Kanals auf monomolekularer Ebene über ein sinnvolles zeitliches Mittel bestimmen zu können, sollte die Stromantwort einer Membran mit genau einem enthaltenen Kanal über einen längeren Zeitraum ausgewertet werden. Hierzu wurde ein Skript mit dem Programm MatLab (MathWorks, Natick, MA, USA) erstellt, welches die unter konstanten Bedingungen erzeugten Stromsignale automatisch auswertet (siehe Anhang 8.2). Das Skript nimmt zunächst eine Basislinienkorrektur für jede aufgezeichnete Stromkurve vor. Um

4. Ergebnisse

diese Korrektur vornehmen zu können, wurde die spezielle Form des von der Software pClamp in Verbindung mit dem Axopatch 200B ausgegebenen Spannungssignals ausgenutzt. In **Abb. 4-30** ist die über die Membran applizierte Spannung U_m in Abhängigkeit von der Zeit als blaue Linie aufgetragen.

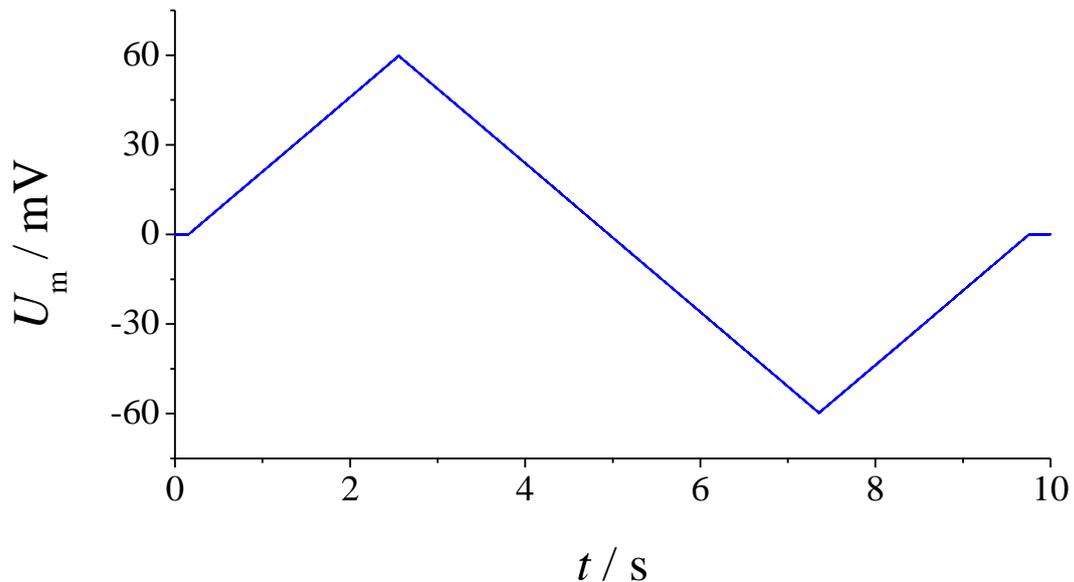


Abb. 4-30: Auftragung der über die Membran applizierten Spannung U_m in Abhängigkeit von der Zeit (blau).

Dieses Signal verläuft größtenteils analog zu der in **Abb. 4-21** gezeigten, idealisierten Spannungsrampe. Die Stromantwort auf dieses aufgeprägte Spannungssignal ist in **Abb. 4-31** gezeigt.

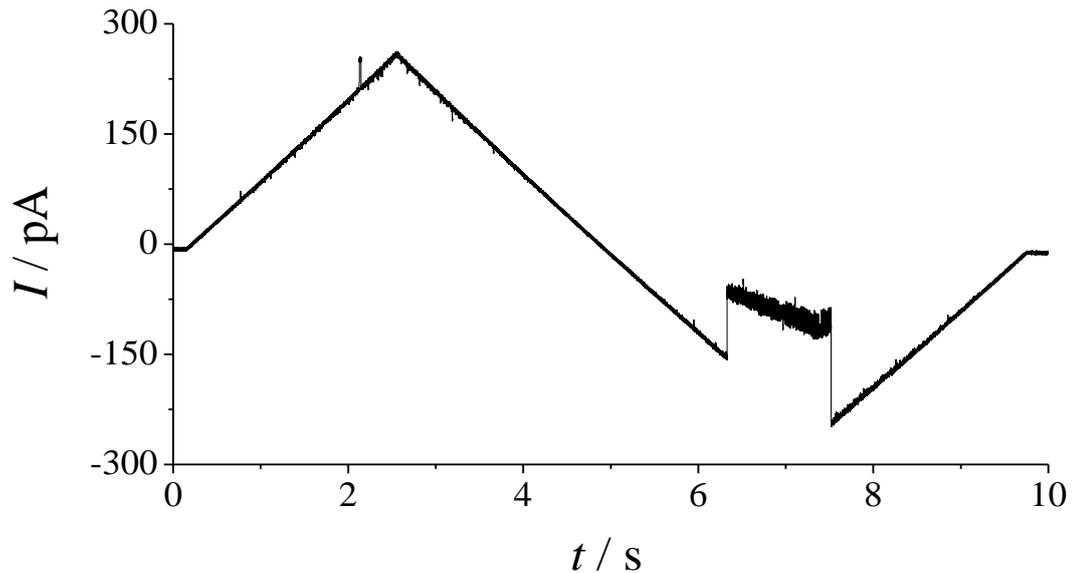


Abb. 4-31: Stromantwort einer Membran, bestehen aus DPhPC/Cholesterol 9:1 mit einem enthaltenen VDAC1 auf das in Abb. 4-30 gezeigte Spannungssignal, aufgetragen in Abhängigkeit von der Zeit.

Das reale Spannungssignal zeigt allerdings zu Anfang und am Ende der Rampe einen jeweils etwa 0,15 s langen Abschnitt konstanten Potentials, bevor, bzw. nachdem die eigentliche Rampe durchfahren wird (**Abb. 4-32**).

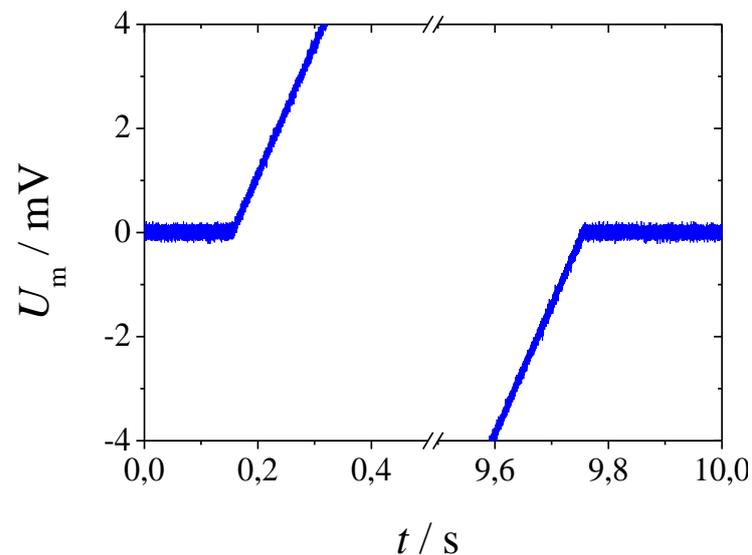


Abb. 4-32: Auftragung der ersten 0,5 s und der letzten 0,5 s des in **Abb. 4-30** gezeigten Spannungssignals. Sowohl zu Anfang, als auch am Ende des Signals liegt für jeweils $t = 0,15$ s eine Transmembranspannung von $U_m = 0$ mV an.

4. Ergebnisse

Diese Abschnitte konstanten Verhaltens werden auch im resultierenden Stromsignal detektiert (**Abb. 4-33**), allerdings zeigt sich hier eine geringe Verschiebung dieser Datenpunkte gegenüber der bei $I = 0$ pA befindlichen Basislinie.

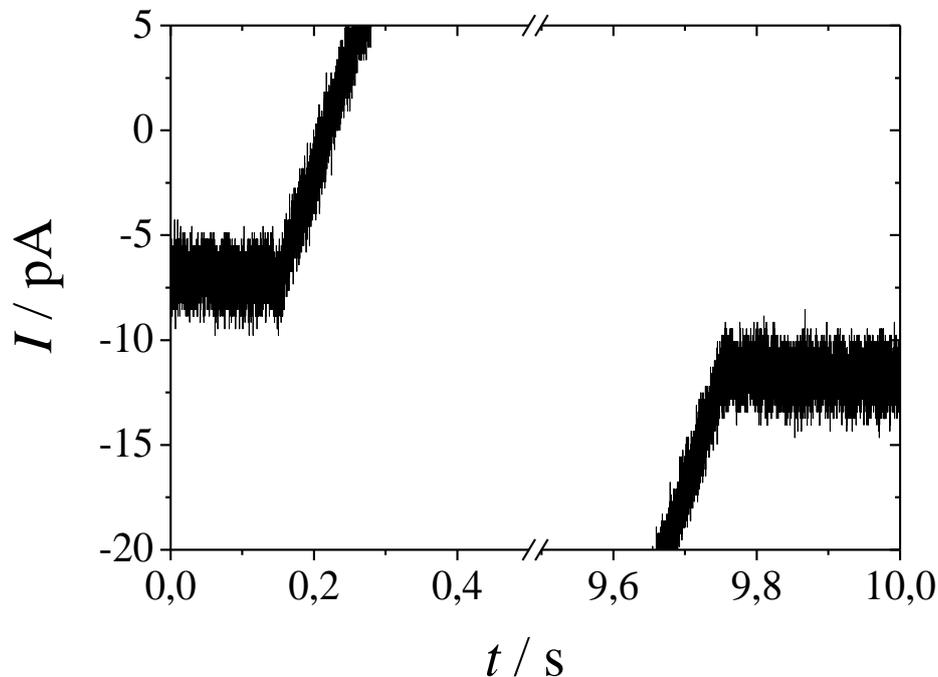


Abb. 4-33: Detailausschnitt der in Abb. 4-31 gezeigten Stromkurve. Sowohl zu Anfang, als auch am Ende der Aufnahme bleibt das Signal für jeweils $t = 0,15$ s konstant. Innerhalb der Kurve tritt eine Drift der Daten auf, da zu Anfang des Signals ein Strom von konstant $I = -7$ pA detektiert wurde, während es an dessen Ende $I = -12$ pA sind.

Diese Drift des Signals ist auf die Abnutzung der Elektroden während der Messung (siehe Abschnitt 3.8.2) und auf eine leichte Asymmetrie der Zusammensetzung der Pufferlösungen durch Verdampfung auf der *cis*-Seite des Borsilikatchips (siehe Abschnitt 3.7) zurückzuführen. Dies stellt einen systematischen Fehler dar, der die Auswertung der Stromsignale verfälscht. Um diesen Fehler zu korrigieren wurde eine Ausgleichsgerade benutzt, die durch zwei Punkte verlief, welche aus den in **Abb. 4-33** gezeigten Abschnitten konstanter Stromwerte errechnet wurden. Aus allen Datenpunkten der ersten 0,15 s eines Stromsignals wurden sowohl für den Strom, als auch für die Zeit die Mittelwerte gebildet. Sie definierten einen Punkt, der als ein Stützpunkt der Ausgleichsgeraden diente. Mit den Datenpunkten der letzten 0,15 s des Signals wurde in gleicher Weise verfahren, sodass sich zwei Punkte ergaben, durch die eine Gerade gelegt werden konnte (**Abb. 4-34**).

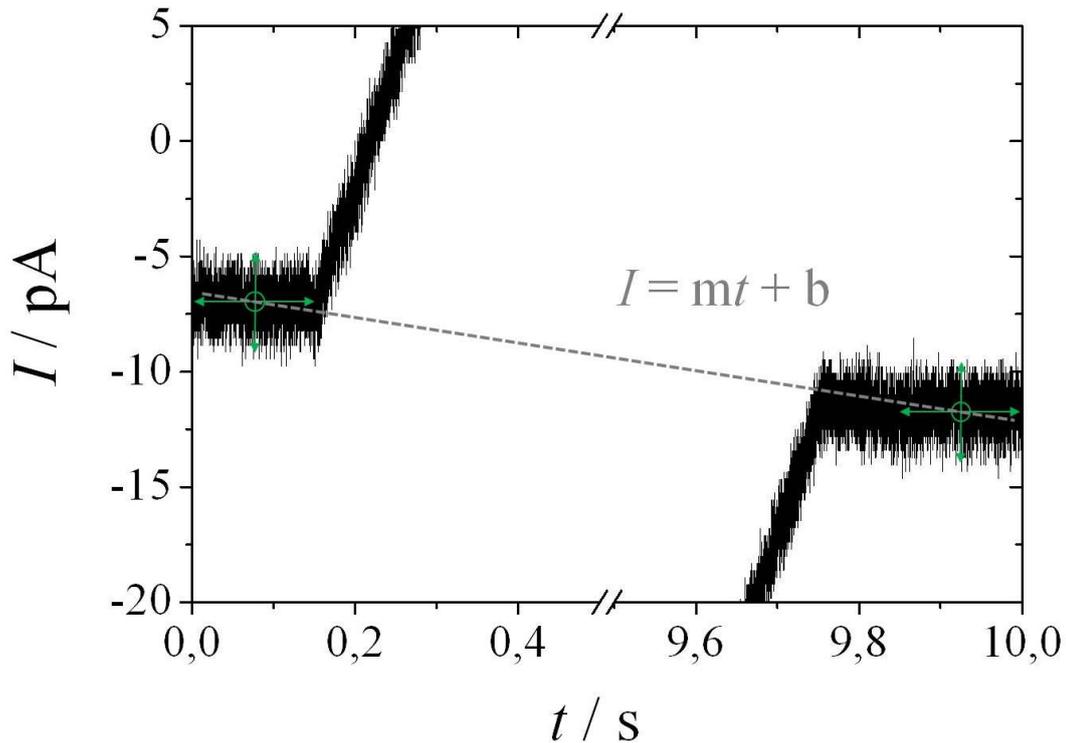


Abb. 4-34: Aus den Datenpunkten der ersten und letzten jeweils 0,15 s des Stromsignals (schwarz) wurden die Mittelwerte der Strom- bzw. Zeitdaten errechnet (in grün angedeutet). Durch die beiden resultierenden Punkte wurde eine Ausgleichsgerade (grau) gelegt, deren Stromwert $I(t)_{Gerade}$ für jeden Zeitpunkt t errechnet und vom jeweiligen Stromwert des Signals $I(t)_{Signal}$ zur Korrektur der Basislinie abgezogen wurde.

Nach der Geradengleichung der Ausgleichsgeraden:

$$I(t) = m \cdot t + b \quad (4-5)$$

kann der Stromwert der Geraden $I(t)_{Gerade}$ zu jedem Zeitpunkt t errechnet werden. Zur Korrektur der Basislinie des Stromsignals wurde dieser Wert vom Stromwert des Signals $I(t)_{Signal}$ zu jedem korrespondierenden Zeitpunkt t abgezogen:

$$I(t)_{Signal} - I(t)_{Gerade} = I(t)_{korrigiert} \quad (4-6)$$

Anschließend wird aus jedem Datenpunkt des aufgenommenen und korrigierten Stromsignals mittels Division durch die an diesem Punkt jeweils anliegende

4. Ergebnisse

Spannung nach Gleichung (3-7) die zugehörige Leitfähigkeit berechnet. Zur weiteren Auswertung der erhaltenen Daten wurde manuell ein Grenzwert (*threshold value*) der Leitfähigkeit vorgegeben, der möglichst genau zwischen der Leitfähigkeit des offenen und der des geschlossenen Zustands liegt. In Abbildung **Abb. 4-35** wird dieses Vorgehen anhand des bereits in **Abb. 4-29** gezeigten Traces noch einmal verdeutlicht.

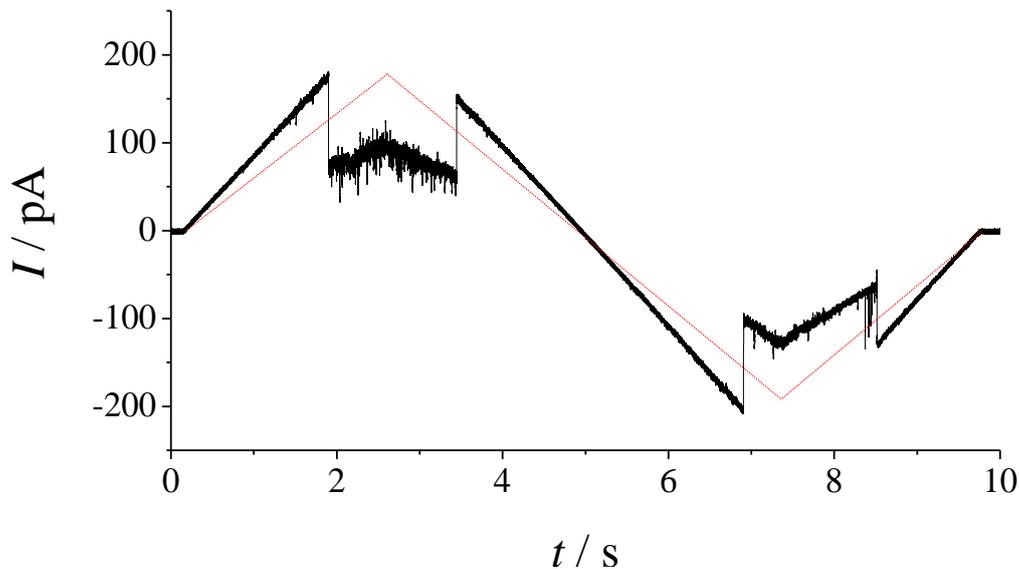


Abb. 4-35: Stromantwort einer Membran mit einem enthaltenen VDAC1. Eine Abnahme der Leitfähigkeit im positiven Bereich von $G_o = 4,0$ nS auf $G_c = 1,6$ nS mit anschließender Rückkehr auf den Ausgangswert beweist die Anwesenheit eines VDAC1-Proteins (vgl. **Abb. 4-27**). Der *threshold value* (rot) des zur automatischen Auswertung der Stromsignale verwendeten MatLab-Skripts mit einer Leitfähigkeit von $G_{\text{thresh}} = 3$ nS liegt genau zwischen dem Leitfähigkeitsbereich des offenen und dem des geschlossenen Zustands des VDAC1. Puffer: 1 M KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4.

Die rote Linie entspricht dem theoretischen Stromsignal einer konstanten Leitfähigkeit von $G = 3,0$ nS. Liegt die Leitfähigkeit über diesem Grenzwert, so werden diese Datenpunkte als „offener Zustand“ registriert. Wechselt der Kanal in den geschlossenen Zustand, so wird der *threshold* mit $G_c = 1,6$ nS unterschritten, was eine Zuordnung dieser Daten zum geschlossenen Zustand zur Folge hat. Die Wahrscheinlichkeit, den VDAC1 bei einem bestimmten Potenzial U_m im offenen Zustand (*open*, o) vorzufinden (*open probability*, P_o), errechnet sich dann aus dem Verhältnis der Datenpunkte, welche dem offenen Zustand entsprechen (N_{G_o}) zu allen bei dieser Transmembranspannung aufgenommenen Datenpunkten (N):

$$P_o(U_m) = \frac{N_{G_o}(U_m)}{N(U_m)}. \quad (4-7)$$

Die Auswertung von insgesamt 185 hintereinander an derselben Membran mit genau einem VDAC1 aufgenommenen Traces mit einer Gesamtdauer von 31 Minuten liefert die Öffnungswahrscheinlichkeit P_o als Funktion der angelegten Transmembranspannung U_m (**Abb. 4-36**). Da die Membran eine sehr geringe Restleitfähigkeit besaß ($G_{\text{rest}} < 0,5 \text{ nS}$), wurde als *threshold value* der Leitfähigkeit $G_{\text{thresh}} = 3,0 \text{ nS}$ gewählt, der damit genau zwischen der Leitfähigkeit des offenen ($G_o \approx 4,0 \text{ nS}$) und des geschlossenen ($G_c \approx 2,0 \text{ nS}$) Zustands eines VDAC1 lag.

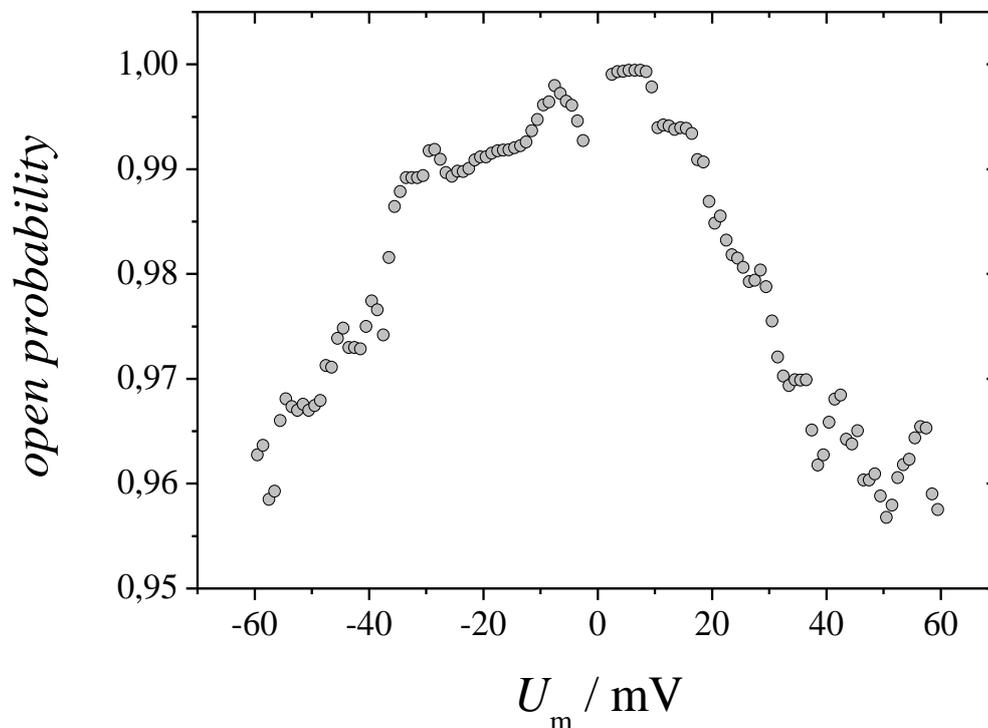


Abb. 4-36: Die Öffnungswahrscheinlichkeit des VDAC1 errechnet nach Gleichung (4-7) aus 185 hintereinander aufgenommenen Stromsignalen mit einer Gesamtdauer von 31 Minuten.

Der Kanal zeigt ein reduziertes P_o bei erhöhter Spannung, da es bei $U_m = \pm 60 \text{ mV}$ auf bis zu 96 % absinkt, während es bei Spannungen um $U_m = 0 \text{ mV}$ 100 % beträgt. Von den 185 hintereinander aufgenommenen Stromsignalen zeigten nicht alle eine eindeutige Proteinaktivität, also Stufen im Signal, die auf einen Wechsel zwischen offenem und geschlossenem Zustand des VDAC1 beruhen. Wurden nur Aufnahmen

4. Ergebnisse

berücksichtigt, die Proteinaktivität zeigten (siehe Abschnitt 5.3), so blieben 33 der insgesamt aufgenommenen 185 Traces für eine Auswertung übrig, was 18 % der Traces entsprach (**Abb. 4-37**).

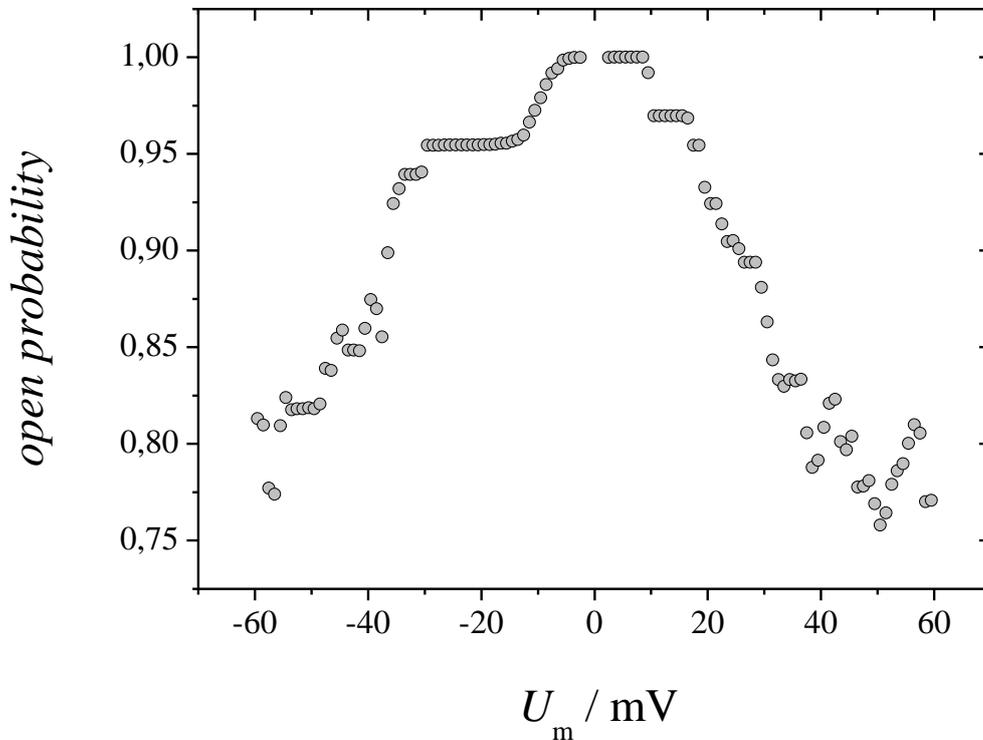


Abb. 4-37: Öffnungswahrscheinlichkeit des VDAC1 errechnet nach Gleichung (4-7) aus Stromsignalen, welche Proteinaktivität zeigten.

Die Öffnungswahrscheinlichkeit sinkt durch das Weglassen aller Signale, die keine Proteinaktivität zeigen, von 96 % auf bis zu 76 % bei Potenzialen von über $U_m = \pm 30$ mV.

4.5 Blockierung des VDAC1 mit tBid

Da die beobachtete, nur sehr gering ausgeprägte Spannungsabhängigkeit im Widerspruch zur bisher veröffentlichten, sehr stark ausgeprägten Abhängigkeit des Öffnen und Schließens eines VDAC1 vom Membranpotenzial stand, wurde durch ein geeignetes Blockierungsgagens bewiesen, dass es sich bei dem beobachteten Transmembranprotein tatsächlich um VDAC1 handelte.

Zu diesem Zweck wurde das proapoptotische Protein tBid^[121] ausgewählt, welches zusammen mit anderen Proteinen für die Ausschüttung von Cytochrom *c* aus der mitochondrialen Matrix ins Cytosol und damit für die Einleitung der Apoptose verantwortlich gemacht wird (vgl. Abschnitt 1.4.4).^{[122],[123]} Aufgrund dieser Eigenschaft wurde die spezielle Wechselwirkung dieses Proteins mit VDAC1 untersucht. Es ergab sich, dass tBid ein Schließen des VDAC1 sowie seinen Verbleib im geschlossenen Zustand induziert.^[124] Das komplette, 195 Aminosäuren lange Protein Bid wurde zunächst mit dem Polypeptidketten-spaltenden Enzym Caspase-8 vor der Aminosäure Asparaginsäure 60 in zwei Teile gespalten. Das 15,5 kDa große C-terminale Stück des geschnittenen Bid (*truncated* Bid, tBid), welches folglich die Aminosäuren 60-195 umfasste, besitzt die kanalschließende Aktivität.^[124]

Im Folgenden ist der Einfluss des tBid auf ein VDAC1-Protein dargestellt. Die Anwesenheit eines einzelnen VDAC1 in der Membran vor tBid-Zugabe konnte nachgewiesen werden, da teilweise ein Übergang des VDAC1 vom offenen in den geschlossenen Zustand zu beobachten war (**Abb. 4-38**).

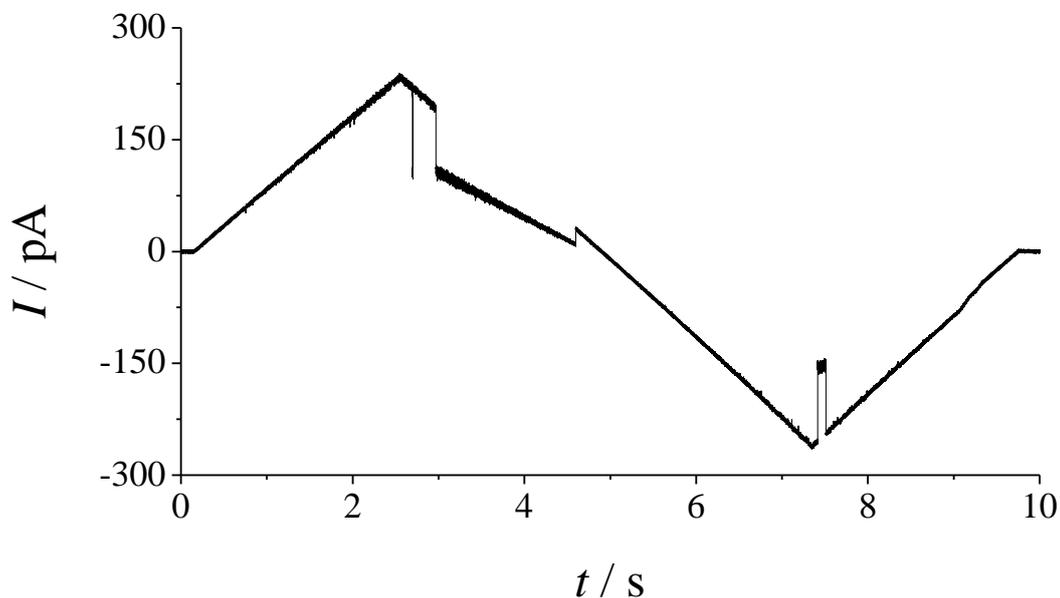


Abb. 4-38: Nachweis der VDAC1-Aktivität in einer Membran bestehend aus DPhPC/Cholesterol 9:1. Puffer: 1 M KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4.

Der offene Zustand besitzt eine Leitfähigkeit von $G_o = 4,0$ nS, der geschlossene Zustand liegt bei $G_{c, \text{pos}} = 2,1$ nS respektive $G_{c, \text{neg}} = 2,7$ nS. In diese Membran

4. Ergebnisse

umgebenden Puffer (1 M KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4) wurden zunächst ein tBid-Konzentration von $c_{\text{tBid}} = 700 \text{ nM}$ eingestellt, was keinen detektierbaren Einfluss auf den VDAC1 hatte. Nach einer weiteren Zugabe des tBid-Proteins mit einer Zunahme der Konzentration auf $c_{\text{tBid}} = 2,5 \text{ }\mu\text{M}$ war ein vor allem bei positivem Potenzial destabilisierter offener Zustand und folglich vermehrte Schließereignisse zu beobachten (**Abb. 4-39**).

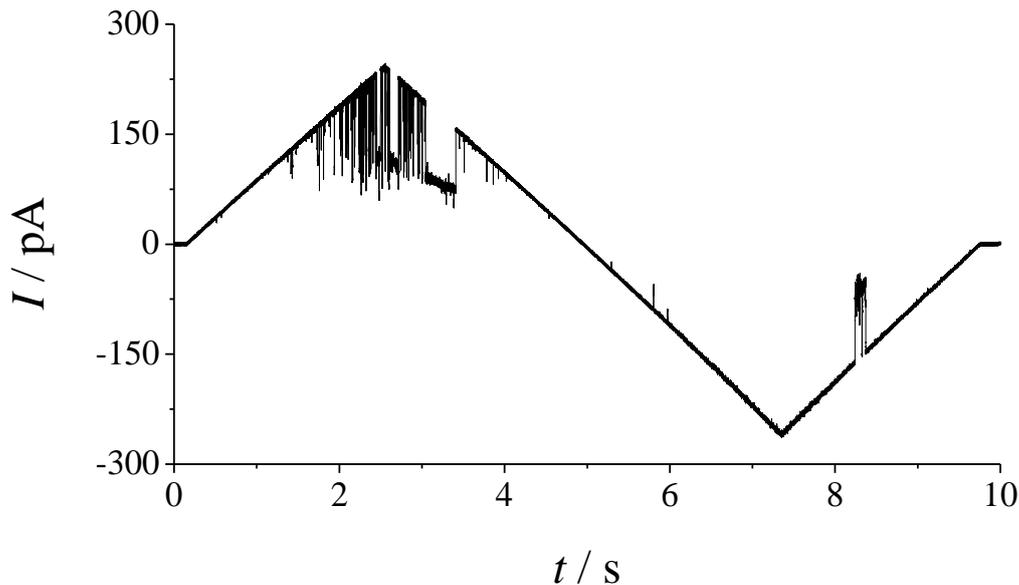


Abb. 4-39: Destabilisierung des offenen Zustands eines VDAC1-Moleküls durch Zugabe des proapoptischen Proteins tBid mit einer Konzentration von $c_{\text{tBid}} = 2,5 \text{ }\mu\text{M}$.

Die Leitfähigkeit des offenen Zustands lag unverändert bei $G_o = 4,0 \text{ nS}$, während der geschlossene Zustand mit $G_{\text{c,pos}} = 1,9 \text{ nS}$ und $G_{\text{c,neg}} = 1,7 \text{ nS}$ etwas gegenüber den Werten, die für die Membran ohne zugesetztes tBid beobachtet wurden (vgl. **Abb. 4-38**), abgesenkt war. Eine finale Erhöhung der tBid-Konzentration auf $c_{\text{tBid}} = 5,8 \text{ }\mu\text{M}$ bewirkte schließlich einen endgültigen Wechsel des VDAC1 in den geschlossenen Zustand (**Abb. 4-40**).

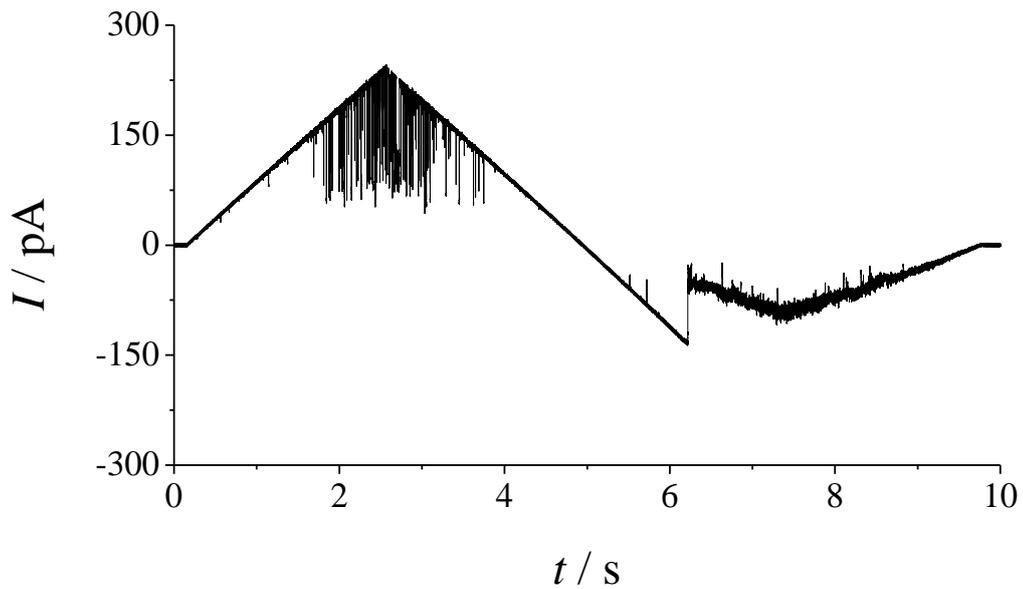


Abb. 4-40: Wechsel der Leitfähigkeit eines VDAC1-Moleküls von $G_o = 4,0$ nS auf $G_c = 1,7$ nS bei $t = 6,2$ s als Reaktion auf eine Konzentration des proapoptotischen Proteins tBid von $c_{\text{tBid}} = 5,8$ μM .

Vor der Zugabe von $c_{\text{tBid}} = 5,8$ μM wurden insgesamt 99 Traces mit einer Gesamtdauer von 16,5 Minuten aufgenommen und deren spannungsabhängige Leitfähigkeit errechnet. Nach der tBid-Zugabe wurden weitere 50 Traces mit einer Dauer von 8,3 Minuten aufgezeichnet, bevor die Membran schließlich riss. Vor tBid-Zugabe lag die durchschnittliche Leitfähigkeit bei $G = 4,0$ nS, nach Zugabe von $c_{\text{tBid}} = 5,8$ μM wurde sie auf $G = 2,6$ nS reduziert, was der Leitfähigkeit des geschlossenen Zustands entspricht (**Abb. 4-41**).

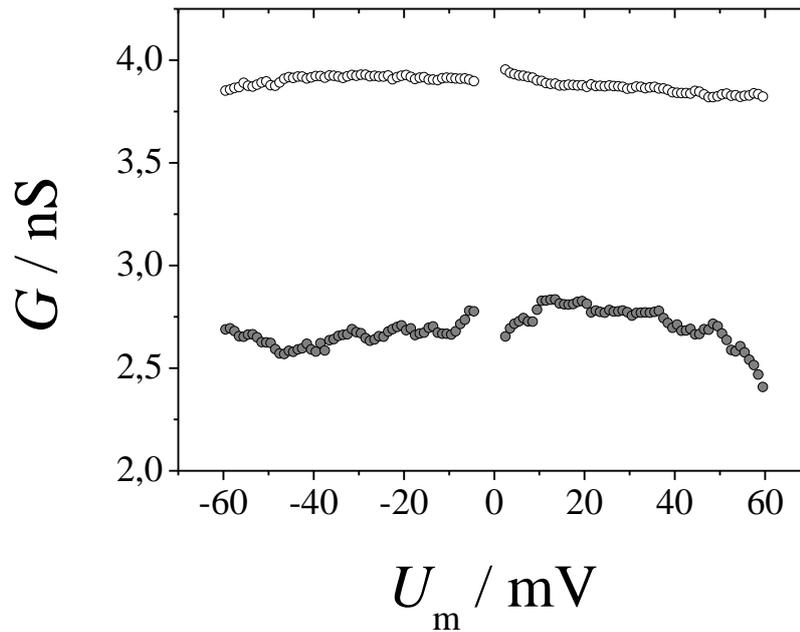


Abb. 4-41: Einfluss des proapoptischen Proteins tBid auf ein VDAC1-Molekül in einer Membran bestehend aus DPhPC/Cholesterol 9:1. Aufgetragen sind die mittleren Leitfähigkeiten des Kanals vor (weiß gefüllte Kreise) und nach (grau gefüllte Kreise) der Zugabe von tBid mit einer Konzentration von $c_{\text{tBid}} = 5,8 \mu\text{M}$.

Insgesamt wurde dieses Experiment drei Mal durchgeführt, wobei reproduzierbar eine Verminderung der Leitfähigkeit des VDAC1 durch tBid festgestellt wurde. Zusammenfassend wurde mit dieser Versuchsreihe der eindeutige Nachweis der Rekonstitution eines aktiven VDAC1 in Membranen bestehend aus DPhPC/Cholesterol 9:1 geführt. Das finale Reißen der Membran ist dem generell destabilisierenden Effekt von tBid auf Lipidmembranen geschuldet.^{[125],[126]}

4.6 Kinetik des *gatings* von *wt*-VDAC1 und einer Mutante

Neben den Studien zur generellen Spannungsabhängigkeit des VDAC1 wurden Untersuchungen der Kinetik der Übergänge zwischen den verschiedenen Leitfähigkeitsstufen des Kanals durchgeführt. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die N-terminale α -Helix des VDAC1-Moleküls gelegt, da spekuliert wird, dass diesem Teil des Proteins eine entscheidende Rolle beim charakteristischen *voltage gating* zukommt. Zum einen wird eine mögliche Bewegung dieser Helix in der vom

restlichen Protein geformten Pore diskutiert,^[14] zum anderen könnte diese Struktur auch eine stabilisierende Funktion für die Pore haben. Das *gating* könnte dann ursächlich mit einer Verformung des Gesamtproteins, bzw. der Pore selbst als Reaktion auf eine Lageveränderung der Helix zusammenhängen.^[127]

Zunächst wurde das natürlich im Menschen vorkommende *wild type* Protein (*wt*-VDAC1) bezüglich seiner Kinetik untersucht. Hierzu wurden unter *voltage clamp* Bedingungen aufgenommene Stromsignale mithilfe des Programms QuB (University of Buffalo, www.qub.buffalo.edu) ausgewertet. Diese Software ist in der Lage, über *segmental-k-means* Algorithmen Sprünge im aufgezeichneten Stromsignal zu detektieren und daraus idealisierte Stromsignale zu erstellen.^[128] Dazu werden dem Programm die ungefähren Stromamplituden der vermuteten Zustände vorgegeben. Diese Daten werden in einem zweiten Schritt mit Viterbi-Algorithmen ausgewertet, wodurch Informationen über die Lebensdauern der beteiligten Zustände und damit auch über die Kinetik der Leitfähigkeitsänderungen erhalten werden können.^[129] Weiterhin ist aus den Verteilungen der jeweiligen Lebensdauer ersichtlich, ob eventuell ein nicht direkt sichtbarer, also *Hidden Markov State* für einen bestimmten Zustand vorliegt. Durch das Verfahren des *Hidden Markov Modeling* (HMM) ist auch eine Quantifizierung der Anzahl solcher Zustände und ihrer Übergangsraten untereinander möglich.

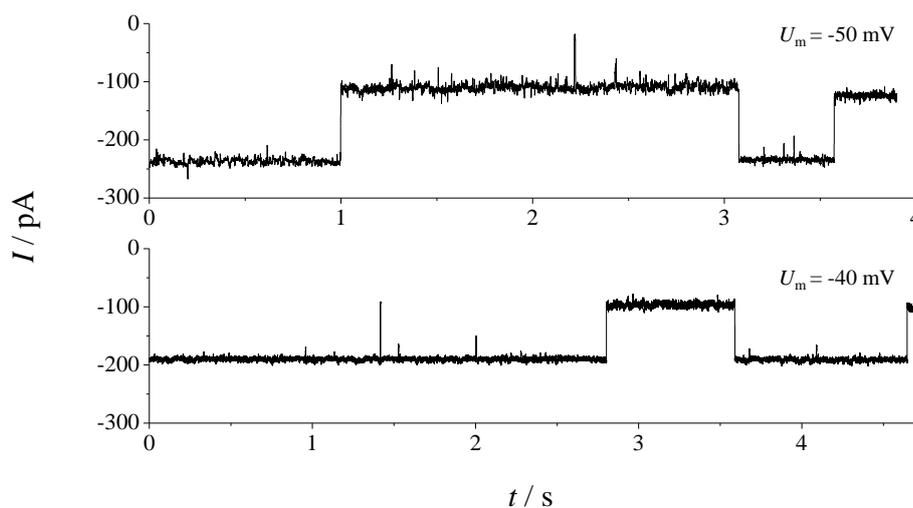


Abb. 4-42: Zwei für den *wt*-VDAC1 charakteristische Stromsignale, aufgenommen bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = -50$ mV (oben) und $U_m = -40$ mV (unten). Puffer: 1 M KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4.

4. Ergebnisse

Zwei für den *wt*-VDAC1 typische Stromsignale, die bei verschiedenen Transmembranpotenzialen aufgenommen wurden, sind in **Abb. 4-42** gezeigt. Da die Aufenthaltsdauer des Kanals im jeweiligen Zustand stochastisch willkürlich verteilt war und wesentlich länger als eine Sekunde betrug, wurden nur wenige Ereignisse unter *voltage clamp* Bedingungen detektiert. Aufgrund der resultierenden geringen Statistik konnten die Übergangsraten nur ungenau bestimmt werden. Für das beobachtete langsame *gating* wurden Übergangsraten im Bereich von $k = 0,1-2 \text{ s}^{-1}$ erhalten.

4.6.1 RGS-VDAC-Mutante

Die N-terminale α -Helix des *wt*-VDAC1 wurde modifiziert, indem drei zusätzliche Aminosäuren zwischen dem ersten Methionin und dem Rest der Polypeptidkette des Proteins eingefügt wurden.^[108] Im Einzelnen handelte es sich neben dem kleinen und ungeladenen Glycin (Einbuchstabencode: G) sowie der kleinen, aber polaren Aminosäure Serin (S) vor allem um die relativ große und bei physiologischem pH positiv geladene Aminosäure Arginin (R).

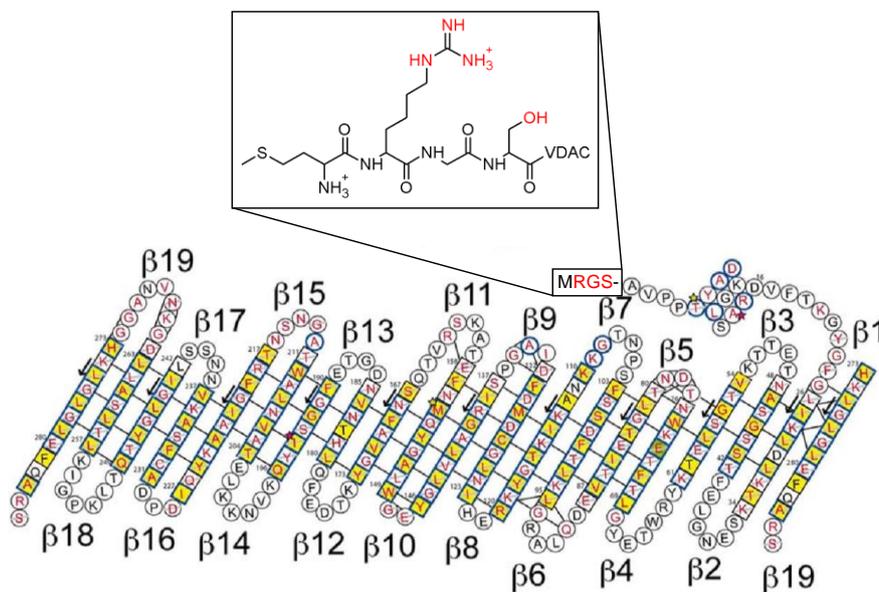


Abb. 4-43: Primärstruktur des VDAC1-Moleküls.^[12] Während der N-Terminus des *wild type* (wt) Proteins mit den Aminosäuren M-A-V beginnt, sind im Falle der RGS-VDAC-Mutante noch die Aminosäuren R-G-S nach dem initialen Methionin eingefügt.

Da der restliche N-Terminus bis zum Beginn des α -helicalen Strukturmotivs nur aus kleinen, apolaren Aminosäuren wie Alanin (A), Valin (V) und Prolin (P) besteht, wird vermutet, dass seine Struktur und sein Effekt auf das Gesamtprotein durch diese Modifikation verändert sein kann.

Analog zu den in Abschnitt 4.4.2 beschriebenen Untersuchungen am *wt*-VDAC1 auf Einzelkanalebene wurde eine elektrophysiologische Charakterisierung für die RGS-VDAC-Mutante durchgeführt. Auch dieser Kanal zeigte einen offenen Zustand mit einer Leitfähigkeit um $G_o = 4\text{-}5$ nS und wechselte mit einer geringen Übergangsrate von $k = 0,1\text{-}2$ s⁻¹ zwischen diesem und einem geschlossenen Hauptzustand mit einer Restleitfähigkeit von ca. $G_c = 2$ nS. Ein Stromsignal mit einem einzelnen in der Membran befindlichen RGS-VDAC1 ist in **Abb. 4-44** exemplarisch gezeigt.

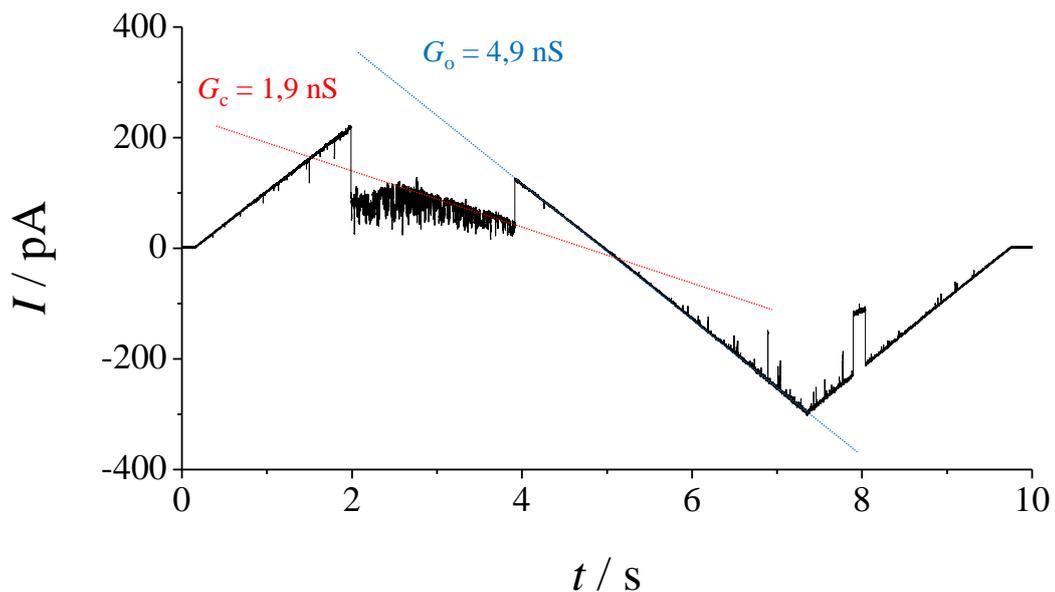


Abb. 4-44: Stromantwort einer Membran der Zusammensetzung DPhPC/Cholesterol 9:1 mit einem rekonstituierten RGS-VDAC1 auf eine 100 mHz Spannungsrampe mit Spannungsmaxima von $U_{m,max} = \pm 60$ mV (vgl. Abb. 4-21). Der Kanal wechselt in Abhängigkeit von der angelegten Spannung von einem offenen Zustand der Leitfähigkeit $G_o = 4,9$ nS (blau) in einen geschlossenen Zustand der Leitfähigkeit $G_c = 1,9$ nS (rot) Puffer: 1 M KCl, 1 mM CaCl₂ und 5 mM HEPES, pH 7,4.

Auch hier wurde eine Membran durch das Spreiten proteinhaltiger GUVs auf einem Port-a-Patch Chip präpariert. Die Öffnungswahrscheinlichkeit eines einzelnen

4. Ergebnisse

RGS-VDAC1 wurde anhand von 220 nacheinander aufgenommenen Stromsignalen ermittelt, wobei sich auch hier eine sehr geringe Abhängigkeit von der Transmembranspannung ergab (**Abb. 4-45**, dunkelgrau gefüllte Kreise).

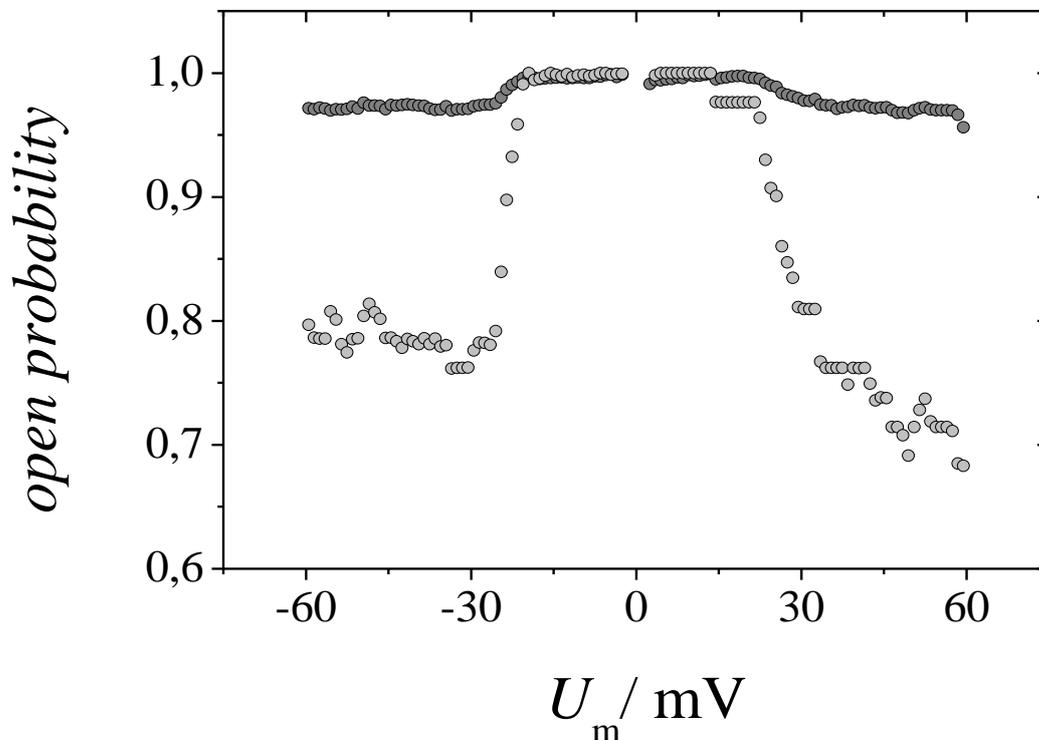


Abb. 4-45: Die spannungsabhängige Öffnungswahrscheinlichkeit des RGS-VDAC1, ermittelt nach Gleichung (4-7) aus 198 hintereinander aufgenommenen Stromsignalen (dunkelgrau gefüllte Kreise). Wurden nur solche Signale berücksichtigt, die ein *reopening* des Kanals zeigten (11 % aller aufgenommenen Traces), fiel die Öffnungswahrscheinlichkeit ab Potenzialen von $U_m = \pm 30$ mV rapide auf Werte von bis zu 68 %.

Wurden nur solche Signale berücksichtigt, die ein *reopening* des Kanals zeigten (**Abb. 4-45**, hellgrau gefüllte Kreise), nahm die Öffnungswahrscheinlichkeit ab Potenzialen von $U_m = \pm 30$ mV rapide ab und fiel auf Werte von bis zu 68 %. In diesem Fall wurde in 21 von 198, also in knapp 11 % der aufgenommenen Signale Proteinaktivität detektiert.

Während sich der RGS-VDAC1 bezüglich der Größenordnung der Öffnungswahrscheinlichkeitsabnahme nur unwesentlich von *wt*-VDAC1 unterschied, zeigte der Ionenkanal eine wesentlich schnellere Abnahme der Öffnungswahrscheinlichkeit ab Potentialen von $U_m = \pm 30$ mV. Weiterhin konnten

mitunter charakteristische, sehr schnelle Übergänge zwischen zwei Leitfähigkeitsstufen detektiert werden, die für den wt-VDAC1 nicht beobachtet wurden. Diese Tatsache wird im Folgenden anhand zweier charakteristischer Stromsignale verdeutlicht. Sowohl vor dem in **Abb. 4-46** gezeigten Stromsignal als auch danach wurden an derselben Membran weitere Stromsignale aufgenommen, die sich in ihrem Verlauf nicht von denen mit einem wt-VDAC1 aufgenommenen Signalen unterschieden, also kein derartiges Phänomen zeigten.

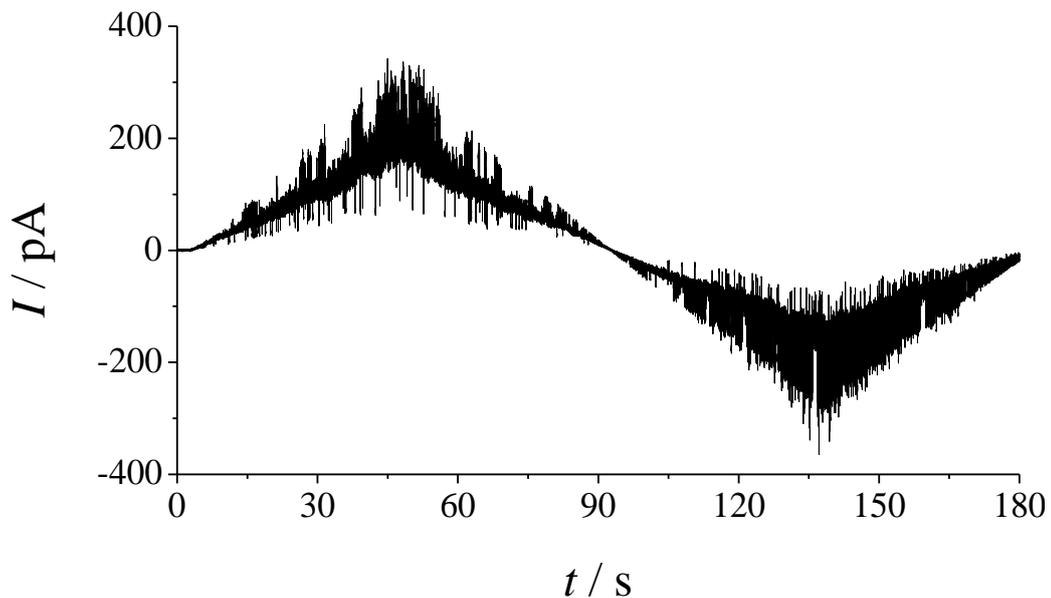


Abb. 4-46: Stromantwort einer RGS-VDAC1 enthaltenden Membran auf eine Spannungsrampe mit Spannungmaxima von $U_{m,max} = \pm 60$ mV und einer Frequenz von $f = 5,6$ mHz. Die Membran wurde präpariert durch das Spreiten eines RGS-VDAC1 enthaltenden GUVs der Zusammensetzung DPhPC/Cholesterol 9:1 und gemessen in 1 M KCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7,4.

Das in **Abb. 4-46** gezeigte Signal wurde als Stromantwort auf Spannungsrampen etwas niedrigerer Frequenz ($f = 5,6$ mHz) und einem einzelnen enthaltenen RGS-VDAC1 aufgenommen. Während diese Aufnahme zunächst lediglich sehr verrauscht aussah und als Hinweis auf eine Verschlechterung der Membran gewertet werden könnte, enthüllte eine genaue Betrachtung das Vorhandensein genau definierter Zustände (**Abb. 4-47**).

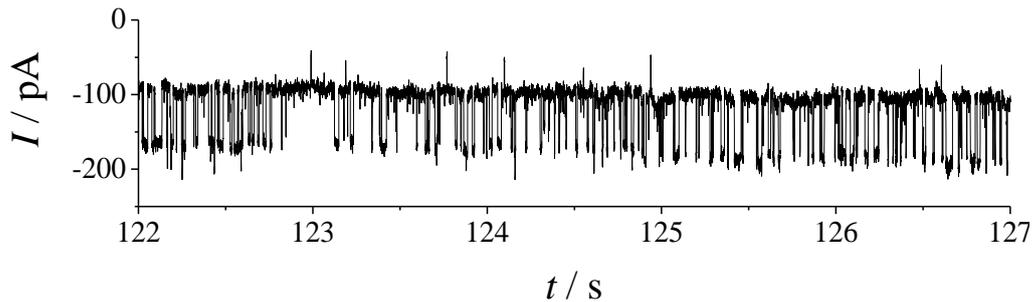


Abb. 4-47: Detailausschnitt des in Abb. 4-46 gezeigten RGS-VDAC-Stromsignals. Es sind zwei konstante Stromniveaus zu erkennen, zwischen denen das Molekül mit hoher Übergangsrate wechselt. Die Leitfähigkeiten dieser Zustände ergeben sich nach Gleichung (3-7) unter Berücksichtigung des jeweils anliegenden Potentials zu $G_o = 4,2 \text{ nS}$ und $G_c = 2,4 \text{ nS}$.

Es ließen sich zwei Stromniveaus unterscheiden, deren Leitfähigkeiten sich zu $G_o = 4,2 \text{ nS}$ und $G_c = 2,4 \text{ nS}$ ergaben. Diese charakteristischen Werte und die Tatsache, dass dauerhaft ein Wechsel zwischen denselben Niveaus stattfindet, ließen den Schluss zu, dass es sich um ein *gating* zwischen einem offenem und einem geschlossenen Zustand mit hohen Übergangsraten handelte. Diese Art des schnellen *gatings* ist für den *wt*-VDAC1 nicht beschrieben.

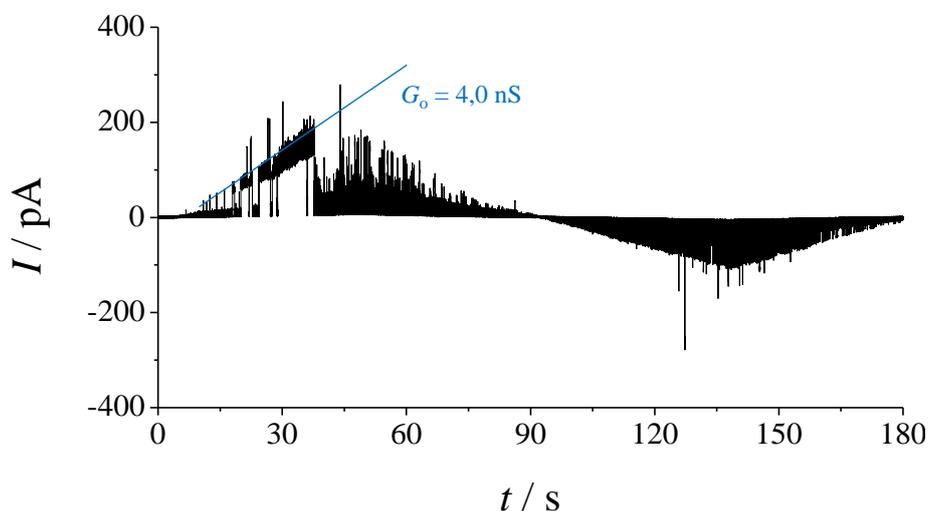


Abb. 4-48: Stromantwort einer RGS-VDAC1 enthaltenden Membran auf eine Spannungsrampe mit Spannungsmaxima von $U_{m,max} = \pm 60 \text{ mV}$ und einer Frequenz von $f = 5,6 \text{ mHz}$. Während das Protein anfänglich noch zwischen dem offenen Zustand der Leitfähigkeit $G_o = 4,0 \text{ nS}$ (blau) und geschlossenen Hauptzuständen wechselt (*main gating*), verbleibt es ab $t = 40 \text{ s}$ im geschlossenen Zustand. Die Membran wurde präpariert durch das Spreiten eines RGS-VDAC1 enthaltenden GUVs der Zusammensetzung DPhPC/Cholesterol 9:1 und gemessen in 1 M KCl , 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES , $\text{pH } 7,4$.

In **Abb. 4-48** ist anfänglich der Wechsel zwischen dem komplett offenen Zustand des RGS-VDAC1 mit einer Leitfähigkeit von $G_o = 4,0$ nS und weniger leitfähigen Zuständen zu erkennen. Dieser Hauptwechsel (*main gating*) der Zustände war von einem schnellen Wechsel niedrigerer Amplitude (*fast gating*) überlagert. Ab ca. $t = 40$ s wechselte der Kanal in seinen geschlossenen Zustand und zeigte kein weiteres *main gating*, während das *fast gating* erhalten blieb und sich zwischen zwei konstanten Leitfähigkeitsniveaus mit $G_{c1} = 1,0$ nS und $G_{c2} = 0,1$ nS bewegte (**Abb. 4-49**). Dieses *fast gating* konnte also sowohl für den offenen, als auch für den geschlossenen Hauptzustand des VDAC1 beobachtet werden.

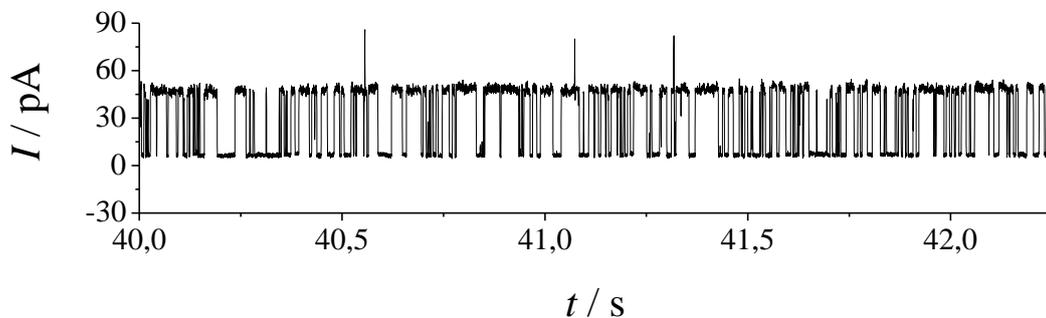


Abb. 4-49: Detailausschnitt des in **Abb. 4-48** gezeigten RGS-VDAC1-Stromsignals. Es sind zwei konstante Stromniveaus zu erkennen, zwischen denen das Molekül mit hoher Übergangsrate wechselt (*fast gating*). Die Leitfähigkeiten dieser Zustände ergeben sich nach Gleichung (3-7) unter Berücksichtigung des jeweils anliegenden Potentials zu $G_{c1} = 1,0$ nS und $G_{c2} = 0,1$ nS und liegen damit beide im Bereich des geschlossenen Hauptzustands des RGS-VDAC1 *main gatings*.

Obwohl eindeutig ersichtlich war, dass dieses *fast gating* eine wesentlich höhere Übergangsrate als die für das *main gating* des wt-VDAC1 ermittelte ($k = 0,1-2$ s⁻¹) ergeben musste, konnten sie anhand dieser Traces nicht quantifiziert werden. Die verwendeten Algorithmen (siehe Einleitung des Abschnitts) benötigen eine konstante Basislinie, um die gegebenen Daten idealisieren zu können. Da das Stromsignal hier aber auf Grund der angelegten Spannungsrampen nicht linear ist, sondern eine konstante, periodisch das Vorzeichen wechselnde Steigung enthält, konnten diese Signale nicht für eine kinetische Analyse verwendet werden. Eine Umrechnung des detektierten Stroms auf die dazugehörige Leitfähigkeit und somit auf konstante Werte löst diese Problem prinzipiell, jedoch zeigte sich, dass die Kinetik dieses *fast*

4. Ergebnisse

gatings spannungsabhängig ist und daher für verschiedene Spannungswerte einzeln ausgewertet werden muss.

4.6.2 Kinetische Analyse des *fast gatings* der RGS-VDAC-Mutante

Zu diesem Zweck wurden weitere Aufnahmen unter *voltage clamp*-Bedingungen bei verschiedenen Transmembranpotenzialen durchgeführt, wobei wieder das *fast gating* des RGS-VDAC1 beobachtet werden konnte. Im Falle des in **Abb. 4-50** gezeigten bei einem Potenzial von $U_m = -50$ mV aufgenommenen Stromsignals überlagerte dieses *fast gating* das mitunter gleichzeitig auftretende *main gating* des Ionenkanals.

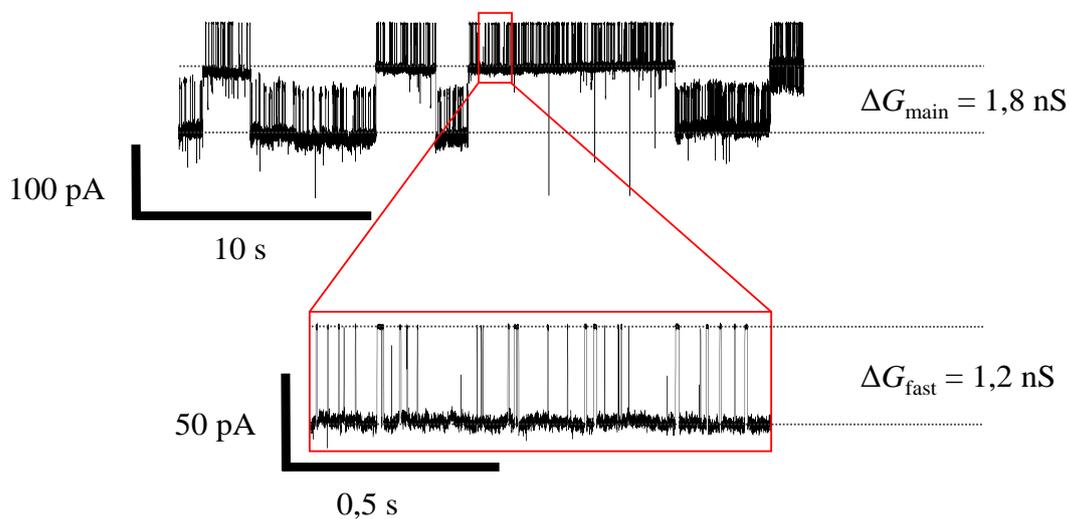


Abb. 4-50: Detailausschnitt eines unter *voltage clamp*-Bedingungen bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = -50$ mV aufgenommenen RGS-VDAC-Stromsignals. Das langsamere *main gating* zwischen den Hauptzuständen des Kanals mit einer Leitfähigkeitsdifferenz von $\Delta G_{\text{main}} = 1,8$ nS wird von einem *fast gating* mit geringerer Amplitude ($\Delta G_{\text{fast}} = 1,2$ nS) und höherer Übergansrate überlagert. Puffer: 1 M KCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7,4.

Bei der kinetischen Analyse dieses *fast gatings* mit der Software QuB wurde darauf geachtet, keine Ereignisse zu berücksichtigen, die kürzer als 0,3 ms waren (*dead time*, t_d), da dies nach Gleichung (4-8) bei Benutzung eines Besselfilters mit einer Filterfrequenz von $f_c = 1$ kHz bei der Aufzeichnung der Daten die von der Hardware vorgegebene Grenze des Auflösungsvermögens darstellt.^[115]

$$t_d = \frac{0,3321}{f_c} \quad (4-8)$$

In Gleichung (4-6) steht f_c für die Grenzfrequenz des Filters (*cut-off frequency*), wonach sich für die Totzeit $t_d = 0,3321$ ms ergaben. Die so von der Software durchgeführte Idealisierung des Datensatzes ist in **Abb. 4-51** durch eine rote Linie über den Messdaten (schwarz) dargestellt. Neben der Totzeit wurden der Software weiterhin die ungefähren Strombeträge der beiden beteiligten Level vorgegeben.

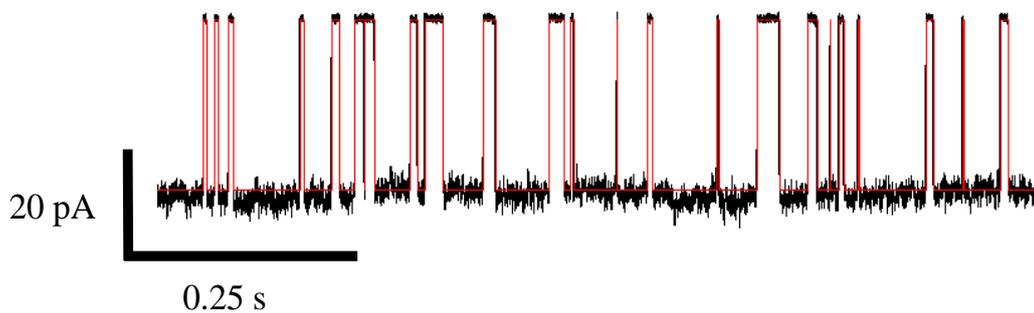


Abb. 4-51: Detailausschnitt des in Abb. 4-50 gezeigten RGS-VDAC-Traces im Bereich des *fast gatings*. Nachdem der Software QuB manuell die Stromamplituden der beteiligten Zustände vorgegeben wurden, detektierte sie die Sprünge im Signal und erstellte einen idealisierten Datensatz (rot) zur Bestimmung der kinetischen Parameter.

Aus den so idealisierten Daten konnten über die Analyse der jeweiligen Öffnungsdauern τ beider Zustände die Übergangsraten für den Übergang von niedrigerer zu höherer Leitfähigkeit $k_{c \rightarrow o}$ und von höherer zu niedrigerer Leitfähigkeit $k_{o \rightarrow c}$ ermittelt werden.

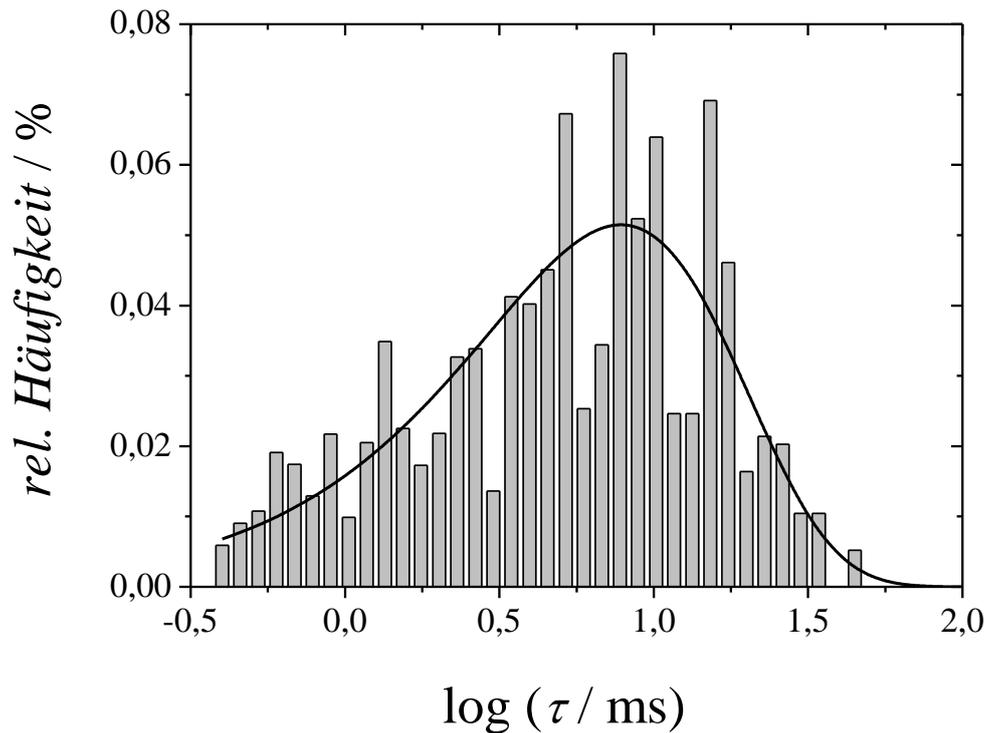


Abb. 4-52: Logarithmische Auftragung der Lebensdauern τ des *fast gating*-Zustands geringerer Leitfähigkeit (c) des RGS-VDAC1-Proteins. Eine kinetische Auswertung mit der Software QuB (schwarz) ergab eine Übergangsrate vom niedriger in den höher leitfähigen Zustand (o) von $k_{c \rightarrow o} = (137 \pm 9) \text{ s}^{-1}$ ($n = 192$).

Abb. 4-52 zeigt die Verteilung der für den weniger leitfähigen Zustand (c) detektierten Lebensdauern und die zur Ermittlung der Übergangsrate verwendeten Anpassung der von der Software QuB verwendeten Algorithmen an diese Daten (schwarze Linie). Für die Übergangsrate ergab sich in diesem Fall $k_{c \rightarrow o} = (137 \pm 9) \text{ s}^{-1}$ ($n = 192$).

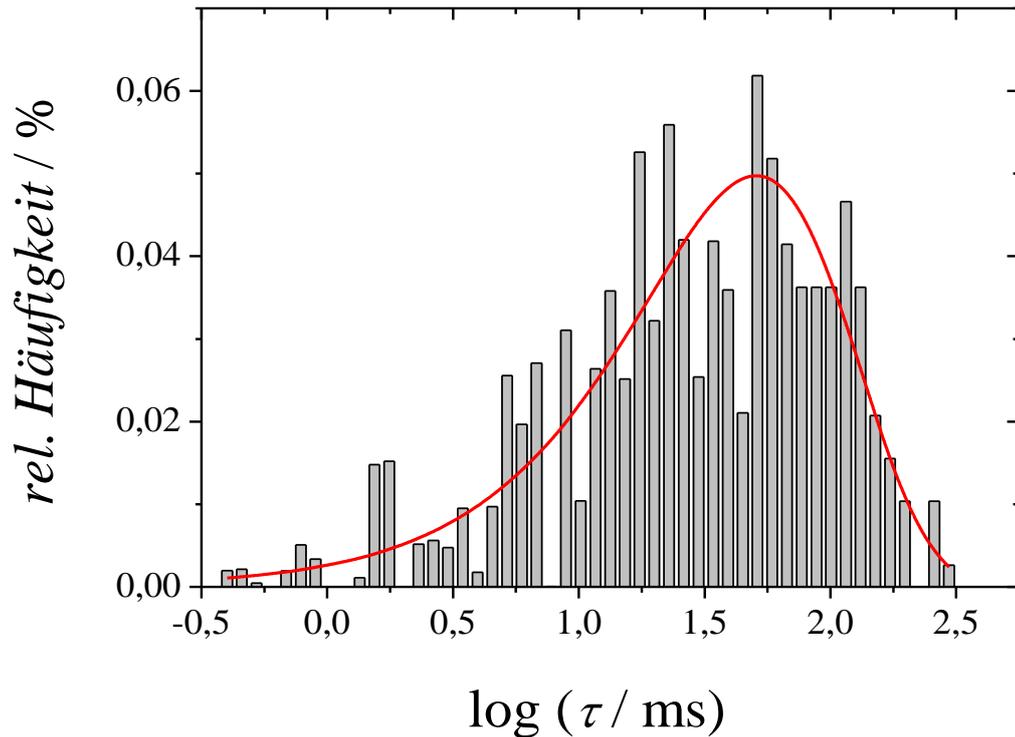


Abb. 4-53: Logarithmische Auftragung der Lebensdauern τ des *fast gating*-Zustands höherer Leitfähigkeit (o) des RGS-VDAC1-Proteins. Eine kinetische Auswertung mit der Software QuB (rot) ergab eine Übergangsrate vom höher in den geringer leitfähigen Zustand (c) von $k_{o \rightarrow c} = (22 \pm 2) \text{ s}^{-1}$ ($n = 193$).

Für den Zustand höherer Leitfähigkeit (o) ergab sich nach dem in **Abb. 4-53** dargestellten Histogramm über eine kinetische Analyse mithilfe der Software QuB (rote Linie) eine Übergangsrate in den Zustand geringerer Leitfähigkeit von $k_{o \rightarrow c} = (22 \pm 2) \text{ s}^{-1}$ ($n = 193$). Aus der Differenz beider Übergangsraten wird bereits ersichtlich, dass der Zustand höherer Leitfähigkeit im zeitlichen Mittel häufiger besetzt gewesen sein muss. Dies deckt sich mit der über QuB ermittelten Öffnungswahrscheinlichkeit von $P_o = 86 \%$.

In gleicher Weise wurden die Übergangsraten für verschiedene angelegte Transmembranpotenziale U_m bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4-2** zusammengefasst.

4. Ergebnisse

Tabelle 4-2: Spannungsabhängigkeit des beim RGS-VDAC1 beobachteten *fast gatings*.

U_m / mV	$k_{c \rightarrow o} / \text{s}^{-1}$	$k_{o \rightarrow c} / \text{s}^{-1}$	n
-20	911 ± 16	331 ± 6	6633
-40	150 ± 4	592 ± 17	2571
-50	137 ± 9	22 ± 2	385
-60	20 ± 2	39 ± 4	169
-80	32 ± 2	18 ± 1	440

4.7 V17C/A205C-VDAC-Mutante

Um weitere Informationen über das Zustandekommen des *main gatings* auf molekularer Ebene zu erhalten, wurde weiterhin versucht, die postulierte Bewegung der N-terminalen α -Helix zu unterbinden. Würde dann kein *gating* als Reaktion auf ein erhöhtes Transmembranpotenzial mehr auftreten, so wäre ein Beweis für die Beteiligung einer Bewegung der Helix in der Pore an diesem Prozess erbracht. Daher wurden, ausgehend vom *wild type*-VDAC1, die Aminosäuren Valin-17 und Alanin-205 jeweils zu Cysteinen mutiert. Diese beiden Aminosäuren liegen im funktional gefalteten Protein in günstiger räumlicher Nähe und können zwischen den Schwefelatomen ihrer Seitenketten eine Disulfidbrücke ausbilden. Das neu eingeführte Cystein-17 stellt einen Teil der N-terminalen α -Helix dar, Cystein-205 befindet sich im β -14 Strang und bildet einen Teil der Porenwand (vgl. **Abb. 4-43**). Durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke in dieser Position, welche in **Abb. 4-54** gelb hervorgehoben ist, sollte die Beweglichkeit der Helix innerhalb der Pore unterbunden werden.

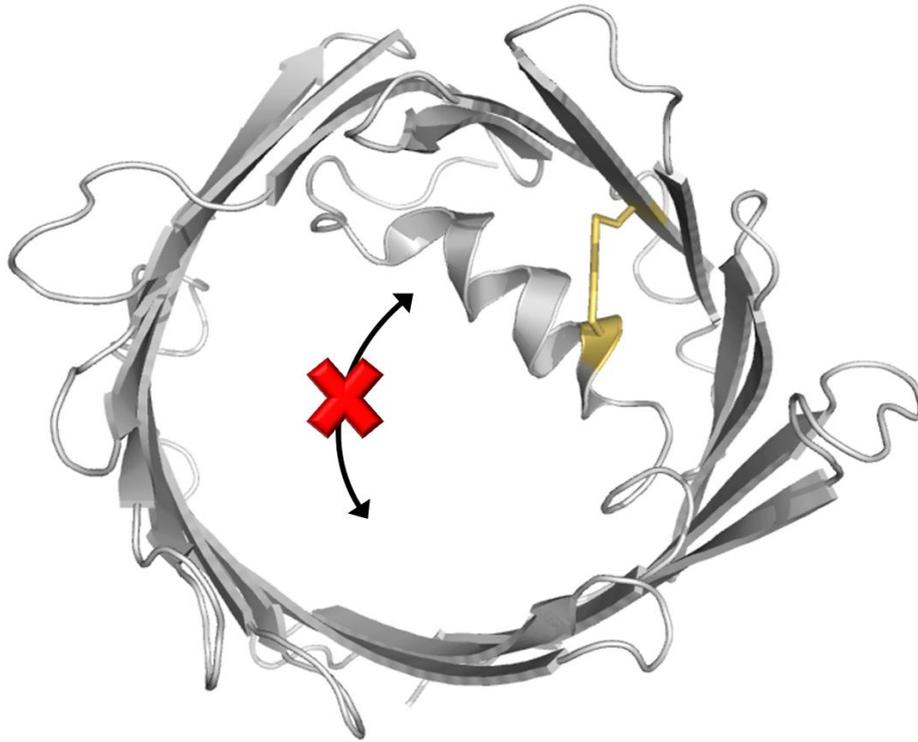


Abb. 4-54: Position der bei der V17C/A205C-VDAC-Mutante artifiziiell eingefügten Disulfidbrücke (gelb hervorgehoben). Diese sollte eine postulierte Bewegung der α -Helix innerhalb der Pore als Ursache des spannungsabhängigen *main gatings* unterbinden.

Um diese Vermutung zu verifizieren, wurden analog zu den Experimenten mit *wt*- bzw. RGS-VDAC1 Untersuchungen des spannungsabhängigen *gatings* dieses Kanals durchgeführt. Die zentrale Frage war, ob das Protein bei hohem Membranpotenzial ($U_m > 30$ mV) noch in Zustände niedrigerer Leitfähigkeit wechseln konnte, oder ob dies durch eine an der Porenwand fixierte Helix unterbunden wurde.

Zunächst wurden Spannungsrampen zur Untersuchung des Kanals verwendet. Nachdem in mehreren 5,6 mHz-Rampen mit Spannungsmaxima von $U_{m,max} = \pm 60$ mV Aktivität beobachtet wurde, wurden zur Ermittlung kinetischer Parameter Messungen mit konstantem Potential U_m (*voltage clamp*) herangezogen.

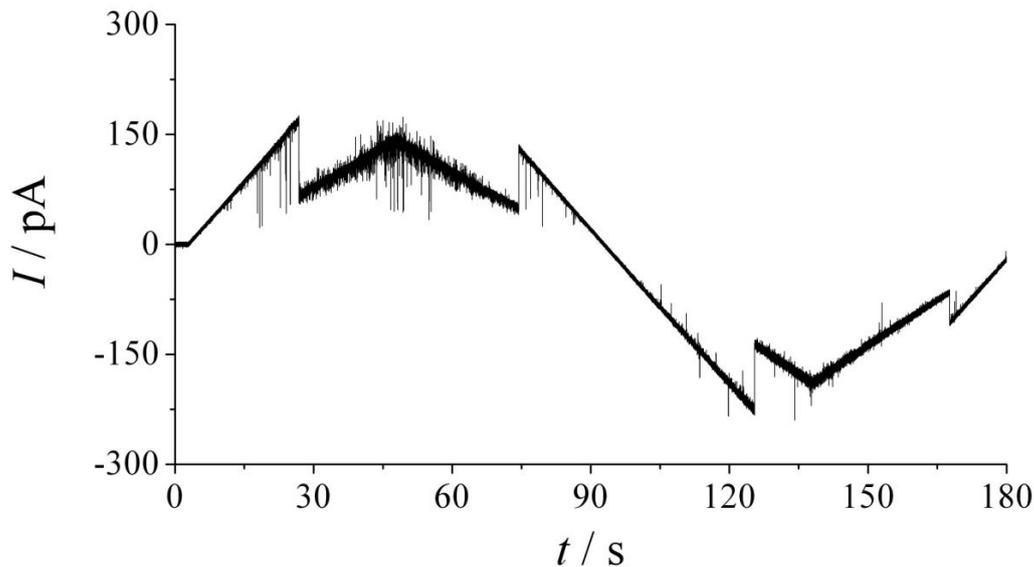


Abb. 4-55: Stromantwort einer V17C/A205C-VDAC1 enthaltenden Membran auf eine Spannungsrampe mit Spannungsmaxima von $U_{m,max} = \pm 60$ mV und einer Frequenz von $f = 5,6$ mHz. Die Anwesenheit des aktiven Proteins ist durch *gating*-Ereignisse zwischen einem offenen Zustand ($G_o = 5,1$ nS) und geschlossenen Zuständen ($G_{c1} = 2,2$ nS und $G_{c2} = 3,1$ nS) ersichtlich. Die Membran wurde präpariert durch das Spreiten eines Protein enthaltenden GUVs der Zusammensetzung DPhPC/Cholesterol 9:1 und gemessen in 1 M KCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7,4.

Die Stromantwort einer Spannungsrampe ist in **Abb. 4-55** gezeigt. Bei niedrigem Potential ist der offene Zustand mit einer Leitfähigkeit von $G_o = 5,1$ nS zu erkennen, bei erhöhtem positiven Potenzial wechselt der V17C/A205C-VDAC1 in einen geschlossenen Zustand der Leitfähigkeit $G_c = 2,2$ nS respektive $G_c = 3,1$ nS bei hohem negativen Potenzial.

Analog zu der natürlich vorkommenden *wt*-VDAC-Variante und der RGS-VDAC-Mutante wurde auch für die V17C/A205C-VDAC-Mutante in bereits beschriebener Weise (siehe Abschnitt 4.4.2) die spannungsabhängige Öffnungswahrscheinlichkeit bestimmt. Es wurden insgesamt 13 auf Spannungsrampen beruhende Signale mit einer Gesamtdauer von $t = 39$ min zur Auswertung herangezogen. Alle Signale zeigten jeweils Proteinaktivität wobei aufgrund der generell leicht erhöhten Leitfähigkeit des offenen Zustands (s. o.) ein *threshold value* von $G_{\text{thresh}} = 4,0$ nS für die Auswertung gewählt werden musste.

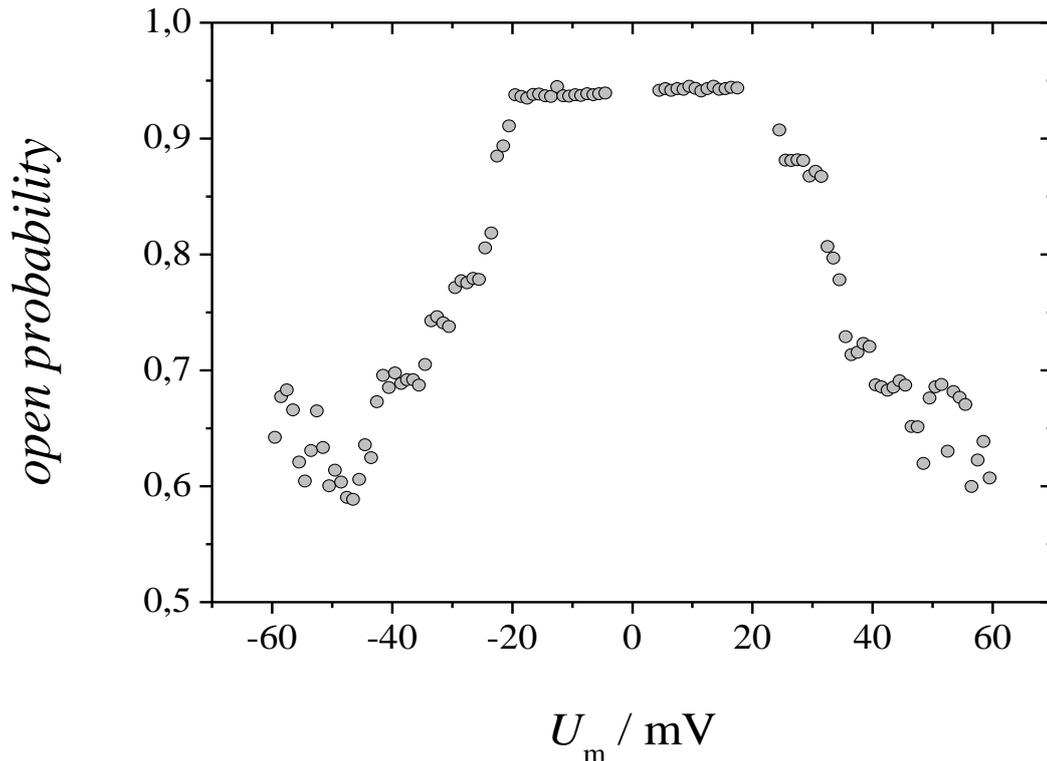


Abb. 4-56: Die spannungsabhängige Öffnungswahrscheinlichkeit des V17C/A205C-VDAC1, bestimmt nach Gleichung (4-7) aus 13 Stromsignalen mit einer Gesamtdauer von $t = 39$ min. Es wurden Spannungsrampen der Frequenz $f = 5,6$ mHz mit Spannungsmaxima von $U_{m,\max} = \pm 60$ mV zur Erzeugung der verwendeten Signale benutzt.

Auch bei der V17C/A205C-VDAC-Mutante fällt die Öffnungswahrscheinlichkeit ab Potenzialen von $U_m = \pm 30$ mV rapide auf $P_o = 57\%$ ab.

In **Abb. 4-57** ist das Ergebnis einer Messung unter *voltage clamp*-Bedingungen bei einem Membranpotenzial von $U_m = -60$ mV gezeigt. Da sich diese Membranpräparation als sehr stabil erwies, konnte bei konstant hoher Spannung über mehrere Minuten gemessen werden.

4. Ergebnisse

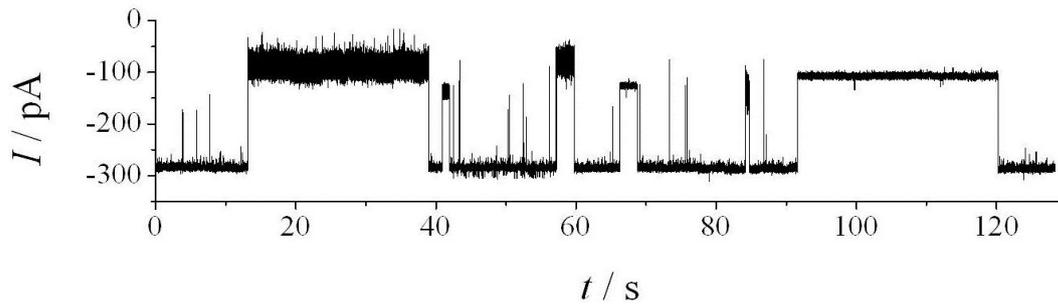


Abb. 4-57: Ein unter *voltage clamp* Bedingungen bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = -60$ mV aufgenommenes V17C/A205C-VDAC-Stromsignal. Das Protein wechselt zwischen einem offenen ($G_o = 4,7$ nS) und verschiedenen geschlossenen Zuständen ($G_{c1} = 1,8$ nS und $G_{c2} = 1,4$ nS). Die Membran wurde präpariert durch das Spreiten eines V17C/A205C-VDAC1 enthaltenden GUVs der Zusammensetzung DPhPC/Cholesterol 9:1 und gemessen in 1 M KCl, 1 mM $CaCl_2$, 5 mM HEPES, pH 7,4.

Die Basislinie bei $I = -286$ pA, was einer Leitfähigkeit von $G_o = 4,7$ nS entspricht, kennzeichnet den offenen Zustand des Proteins. Der Kanal wechselt innerhalb der 130 s nur siebenmal in einen weniger leitfähigen Zustand, für den sich mit $G_{c1} = 1,8$ nS und $G_{c2} = 1,4$ nS hauptsächlich zwei Leitfähigkeiten unterscheiden lassen.

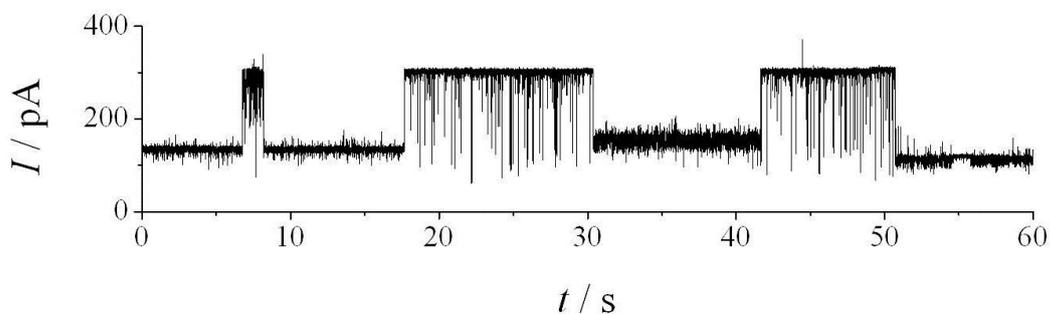


Abb. 4-58: Ein unter *voltage clamp* Bedingungen bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = +60$ mV aufgenommenes V17C/A205C-VDAC-Stromsignal. Das Protein wechselt zwischen einem offenen Zustand der Leitfähigkeit $G_o = 5,5$ nS und einem geschlossenen Zustand der Leitfähigkeit $G_c = 2,2$ nS. Die Membran wurde präpariert durch das Spreiten eines V17C/A205C-VDAC1 enthaltenden GUVs der Zusammensetzung DPhPC/Cholesterol 9:1 und gemessen in 1 M KCl, 1 mM $CaCl_2$, 5 mM HEPES, pH 7,4

Auch bei Anlegen eines positiven Membranpotenzials von $U_m = +60$ mV lässt sich wieder eine dem offenen Zustand zugehörige Leitfähigkeit von $G_o = 5,5$ nS von einer zweiten Leitfähigkeit mit $G_c = 2,2$ nS unterscheiden, die dem geschlossenen Zustand zugeordnet werden kann (**Abb. 4-58**). Aus beiden Abbildungen geht hervor, dass die

V17C/A205C-VDAC-Mutante ein *voltage gating* aufweist, welches identisch zu dem des *wt*-VDAC1 ist. Es zeigt sich, dass sich die Übergangsraten k der Zustandswechsel für die gezeigten Traces im Bereich von $k = 0,1 \text{ s}^{-1}$ bewegen. Wie bereits im Falle des *wt*-VDAC1s, wurde für die V17C/A205C-VDAC-Mutante ein Wert von $k = 0,1-2 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt, da auch Abschnitte leicht erhöhter Aktivität und daher höherer Übergangsraten detektiert wurden. Aufgrund der geringen Übergangsraten und der damit verbundenen geringen Statistik war keine genauere Bestimmung der kinetischen Parameter dieser Mutante möglich. Bei niedrigem Potenzial ($U_m = \pm 10 \text{ mV}$) aufgenommene Stromsignale zeigten keine Übergänge zwischen den beiden bekannten Niveaus und wiesen durchgehend Leitfähigkeiten auf, die einem geöffneten V17C/A205C-VDAC1 entsprachen (nicht gezeigt).

4.8 Das antimikrobielle Peptid Dermcidin

Eine Besonderheit der in Abschnitt 1.5.1 erläuterten Struktur des antimikrobiellen Peptids (AMP) Dermcidin (DCD) stellt die Beteiligung mehrerer Zinkionen dar.^[57] Diese sind nicht nur in der Lage, die negative Ladung des Peptids zu neutralisieren, sondern stabilisieren vor allem das aus drei Untereinheiten - welche ihrerseits aus jeweils zwei antiparallel angeordneten DCD-Monomeren bestehen - gebildete DCD-Hexamer (vgl. **Abb. 1-18**). Molekulardynamische (MD) Simulationen zeigen, dass diese Struktur ohne die Anwesenheit der Zinkionen nicht stabil ist, sondern bereits nach einer Simulationsdauer von $t = 100 \text{ ns}$ beginnt zu dissoziieren. Hierzu wurde die strukturelle Stabilität des DCD-Hexamers in einer der bakteriellen Membran nachempfundenen Lipidschicht aus Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerin (PG) im Verhältnis PE/PG 3:1^[130] mit und ohne Zinkionen simuliert (**Abb. 4-59**).

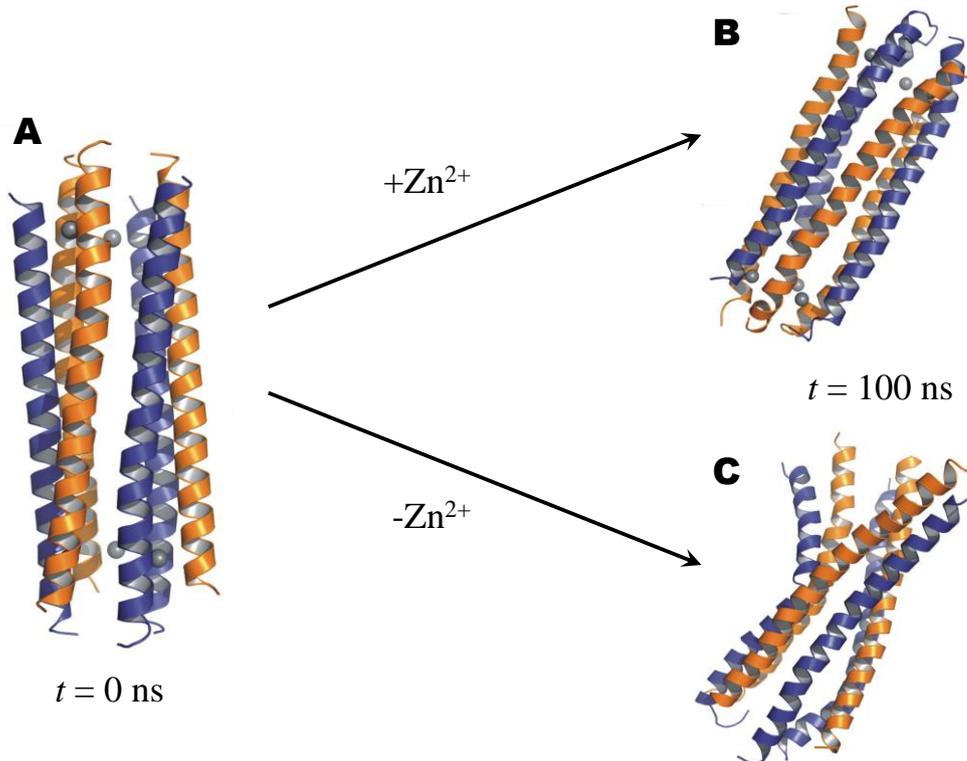


Abb. 4-59: Molekulardynamische Simulation des DCD-Hexamers (A) in einer Lipidschicht (nicht gezeigt) aus Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerin (PG) im Verhältnis PE/PG 3:1. In Anwesenheit von Zinkionen bleibt die Struktur über einen Simulationszeitraum von $t = 100$ ns stabil (B), während sie ohne Zinkionen bereits beginnt, zu dissoziieren (C).

Um die biologische Relevanz dieser Röntgenstruktur zu verifizieren, wurden elektrophysiologische Untersuchungen an artifiziellen Membranen durchgeführt. Hierbei wurde vor allem der Nachweis eines Einflusses von Zinkionen auf die postulierte membranperforierende Aktivität des DCDs angestrebt.

4.8.1 Elektrophysiologische Messungen in Abwesenheit von Zn^{2+}

Da auf Basis der Röntgenstruktur mithilfe von MD Simulationen eine theoretische Leitfähigkeit des hexameren DCD-Kanals von $G_{th} = (108 \pm 11)$ pS in 1 M NaCl gefunden wurde, wurden auch die elektrophysiologischen Untersuchungen in 1 M NaCl durchgeführt. Der pH-Wert wurde auf einen physiologisch relevanten Bereich von 7,1 mittels 5 mM HEPES und NaOH eingestellt. Die Membranen wurden durch das Spreiten von GUVs, bestehend aus DPhPC/Cholesterol im

Stoffmengenverhältnis 9:1, präpariert und mit dem Port-a-Patch Aufbau untersucht (vgl. Abschnitt 3.7). Aufgrund der geringen theoretisch vorausgesagten Leitfähigkeit des Proteins wurde ein hohes Transmembranpotenzial von $U_m = 100$ mV für die Experimente gewählt, da eventuelle Ereignisse so zu einem höheren und besser zu detektierenden Sprung im Stromsignal führen.

Insgesamt wurden sechs Membranen mit Widerständen von $R_m > 1$ G Ω in zinkfreier Pufferlösung (1 M NaCl, 5 mM HEPES, pH 7,1) präpariert. Zur Untersuchung der Proteinaktivität wurden anschließend verschiedene Volumina einer 100 μ M DCD-Stammlösung (DCD in 1 M NaCl, 5 mM HEPES, pH 7,1) zu den stabilen Membranen gegeben. Nur in zwei Fällen konnte nach der Zugabe von DCD Aktivität beobachtet werden, die sich in einer Schwankung im Stromsignal äußerte. **Abb. 4-60** zeigt das Signal einer Membran in Anwesenheit von 3 μ M DCD, gemessen in zinkfreiem Puffer.

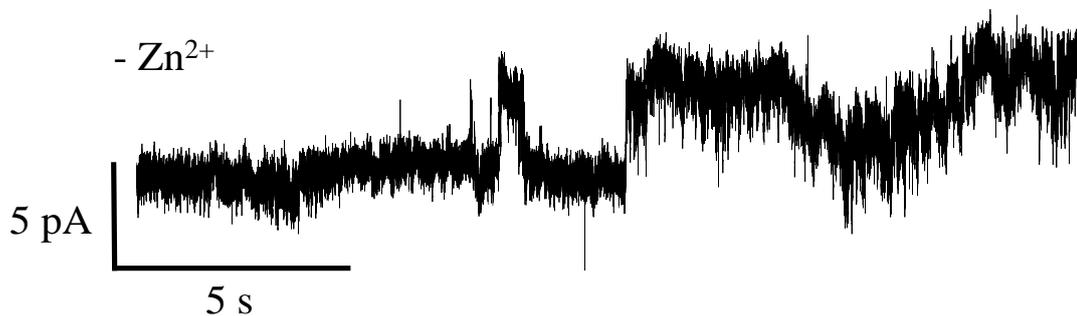


Abb. 4-60: Stromsignal einer Membran (DPhPC/Cholesterin 9:1) in Anwesenheit von 3 μ M DCD, gemessen in zinkfreiem Puffer (1 M NaCl, 5 mM HEPES, pH 7,1) bei einer Transmembrananspannung von $U_m = 100$ mV.

Zwar sind in diesen Aufnahmen mitunter neben Fluktuationen auch unterschiedliche diskrete Stromniveaus zu erkennen, diese weisen allerdings Amplituden willkürlicher Höhe auf und zeigen kein einheitliches Verhalten. Obwohl DCD in Konzentrationen von bis zu 20 μ M zugegeben wurde, konnte in keinem Experiment ein Reißen der Membran beobachtet werden.

4.8.2 Elektrophysiologische Messungen in Anwesenheit von 2 mM Zn^{2+}

Da in Abwesenheit von Zinkionen im Puffer keine definierte Proteinaktivität detektiert werden konnte, wurden weitere Experimente in mit Zinkionen gesättigtem Puffer durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden der Pufferlösung der Zusammensetzung 1 M NaCl und 5 mM HEPES Zinkchlorid zugesetzt. Dies ist zwar in Wasser leicht löslich, jedoch bildet sich sofort schwerlösliches Zinkhydroxid, welches die maximale Konzentration freier Zinkionen limitiert. Das Löslichkeitsprodukt von $Zn(OH)_2$ beträgt $K_L = 3 \cdot 10^{-17} \text{ mol}^3/\text{l}^3$,^[131] woraus sich bei $\text{pH} = 7,1$ eine theoretische Maximalkonzentration freier Zinkionen von $c_{\text{max}}(Zn^{2+}) = 1,89 \text{ mM}$ ergibt. Obwohl nur 2 mM $ZnCl_2$ zugesetzt wurden, wies der Puffer daher eine leichte Trübung auf und wurde routinemäßig vor Benutzung gefiltert, um ausgefallenes Zinkhydroxid zu entfernen. Da der pH-Wert aufgrund der Bildung von Zinkhydroxid abfällt, wurde er routinemäßig direkt vor einer Messung mit 1 M NaOH auf $\text{pH} = 7,1$ eingestellt.

Unter diesen Bedingungen wurden insgesamt 16 Membranen untersucht, wobei eine Aktivität des zugesetzten DCDs bei jeder dieser Membranpräparationen festgestellt wurde. Die verwendeten Proteinkonzentrationen lagen zwischen 850 nM und 10 μM und resultierten meistens im direkten Reißen der Membranen. In einigen Fällen konnte vor dem Wegreißen der Membran definierte Stufen im Stromsignal beobachtet werden (Abb. 4-61).

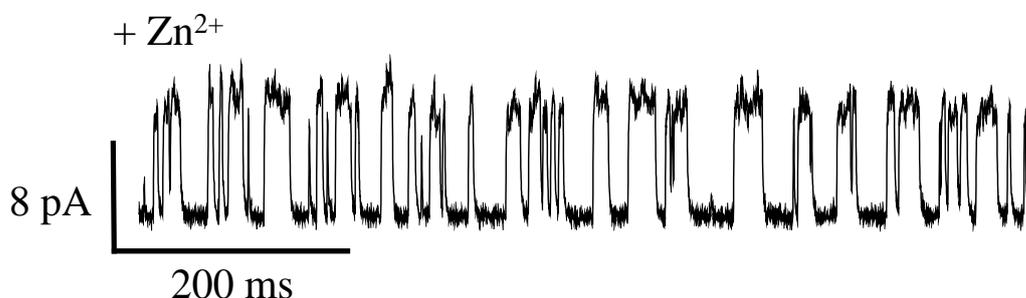


Abb. 4-61: Stromsignal einer Membran (DPhPC/Cholesterin 9:1) in Anwesenheit von 1,7 μM DCD, gemessen in 1 M NaCl, 2 mM $ZnCl_2$, 5 mM HEPES, $\text{pH} 7,1$), bei einer Transmembranspannung von $U_m = 100 \text{ mV}$.

Diese Stufen wurden mehrmals jeweils direkt nach der Zugabe von DCD zur Membranpräparation in zinkhaltiger Pufferlösung beobachtet. In **Abb. 4-62** ist dieser Effekt bei einer Proteinkonzentration von $c_{\text{DCD}} = 8,5 \mu\text{M}$ gezeigt.

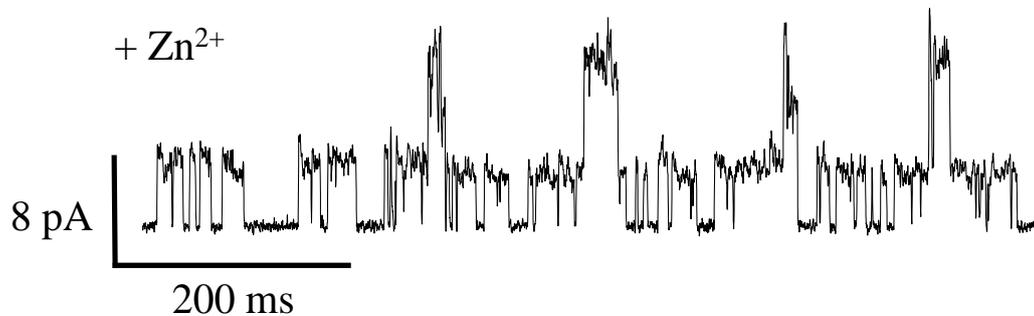


Abb. 4-62: Stromsignal einer Membran (DPhPC/Cholesterin 9:1) in Anwesenheit von $8,5 \mu\text{M}$ DCD, gemessen in 1 M NaCl , 2 mM ZnCl_2 , 5 mM HEPES , $\text{pH } 7,1$, bei einer Transmembranspannung von $U_m = 100 \text{ mV}$.

Hier können bei erhöhter Proteinkonzentration drei äquidistante Niveaus unterschieden werden, zwischen denen das Signal in schneller Folge wechselt.

Mithilfe der Software pClamp 9 wurden die genauen Amplituden von insgesamt 1009 der in **Abb. 4-61** gezeigten Ereignisse bestimmt (vgl. Abschnitt 3.6.2), anschließend nach Gleichung (3-7) in Leitfähigkeiten umgerechnet und in einem Histogramm aufgetragen (Abb. 4-63).

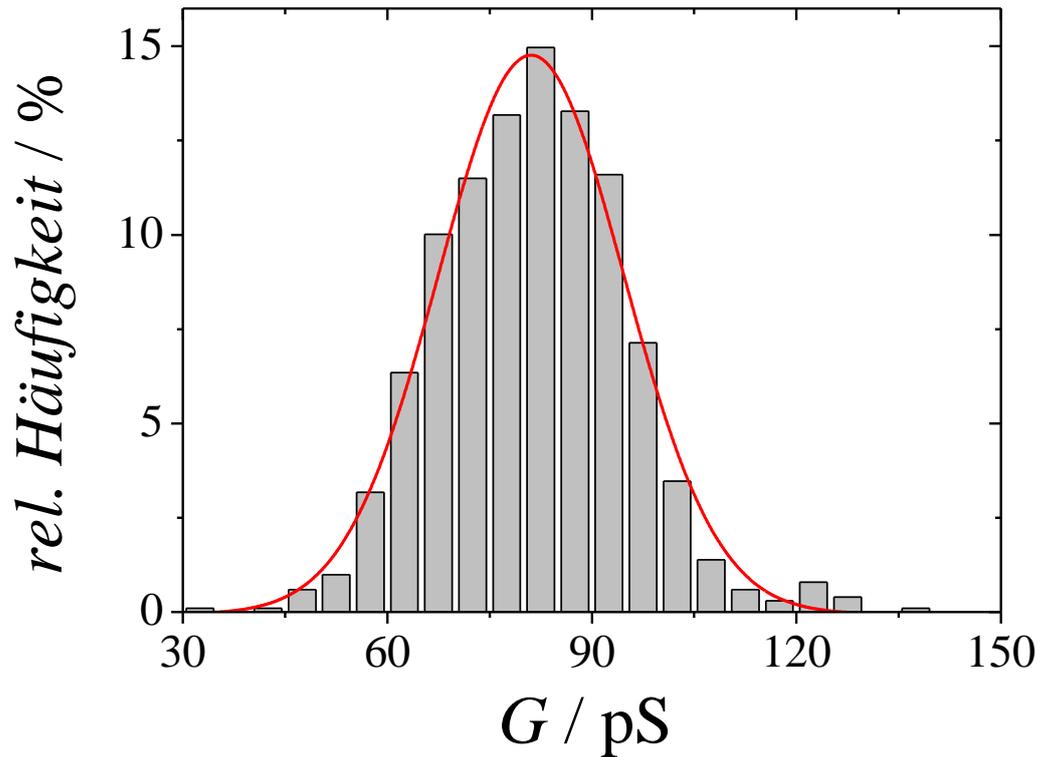


Abb. 4-63: Auftragung der ermitteltem Leitfähigkeiten von 1009 nach Zugabe von DCD detektierten Ereignissen. Die Anpassung einer Normalverteilung (rot) nach Gleichung (4-2) ergibt eine mittlere Leitfähigkeit von $G = (81 \pm 14)$ pS.

Die Anpassung einer Normalverteilung nach Gleichung (4-2) an die Daten ergab eine mittlere Leitfähigkeit von $G = (81 \pm 14)$ pS (Abb. 4-63, rot). Auch die Lebensdauern τ der einzelnen Ereignisse wurden bestimmt.

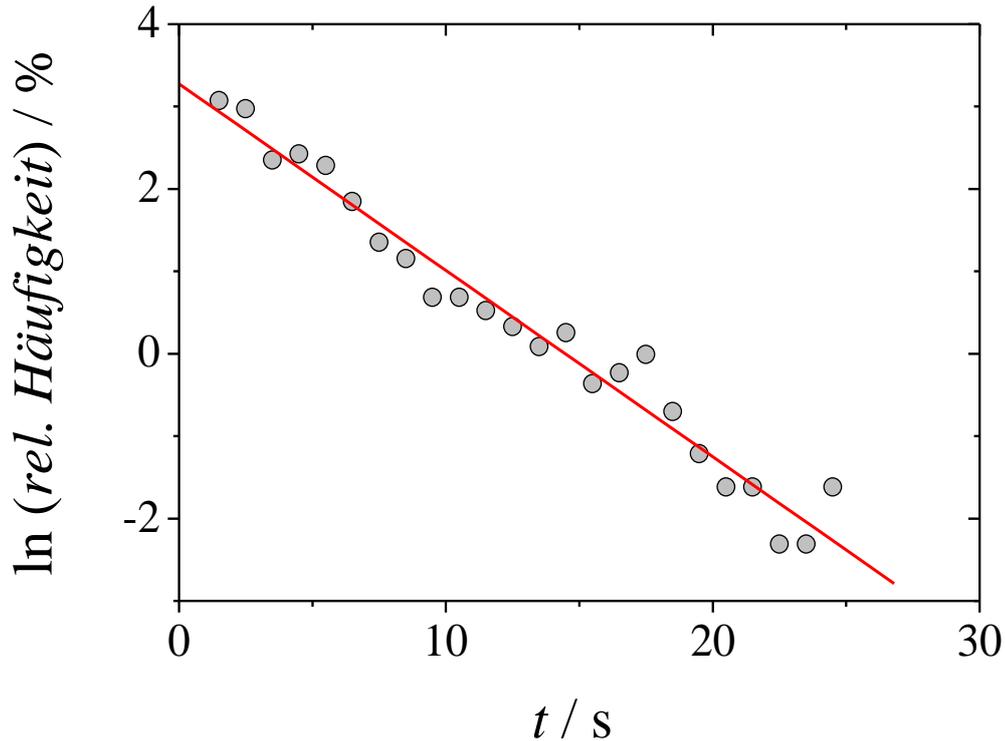


Abb. 4-64: Logarithmische Auftragung der Lebensdauern aller 1009 detektierten Ereignisse. Über die Anpassung einer Ausgleichsgeraden an die Datenpunkte ergibt sich eine mittlere Lebensdauer von $\tau = (4,4 \pm 0,2)$ ms.

Über die Anpassung einer Geraden an die linearisierten Daten konnte eine mittlere Lebensdauer von $\tau = (4,4 \pm 0,2)$ ms ermittelt werden.

Auch bei einem negativen Transmembranpotenzial von $U_m = -100$ mV wurden Messungen durchgeführt, um aus einem eventuell unterschiedlichen Verhalten des DCDs Rückschlüsse auf dessen Wirkungsmechanismus ziehen zu können. Insgesamt wurden hier unter Bedingungen, welche identisch zu den oben genannten waren, zehn Membranen präpariert, wobei in jedem Fall ein permeabilisierender Einfluss von DCD festgestellt werden konnte. Die verwendeten Proteinkonzentrationen wichen nicht von den vorher benutzten ab, allerdings konnten keine Stufen, wie die in Abb. 4-61 und Abb. 4-62 gezeigten, im Stromsignal detektiert werden, was auf eine Asymmetrie in der Wirkungsweise von DCD bezüglich des angelegten Potenzials schließen lässt.

4.8.3 Einfluss von Magnesiumionen auf die Aktivität von DCD

Da im menschlichen Schweiß, in dem DCD naturgemäß vorkommt, neben Zinkionen auch Magnesiumionen in relativ hoher Konzentration enthalten sind, wurde überprüft, ob Mg^{2+} einen vergleichbaren Einfluss auf die Aktivität von DCD hat, wie Zn^{2+} . Zu diesem Zweck wurde ein magnesiumhaltiger Puffer der Zusammensetzung 1 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, pH 7,1 hergestellt, wobei darauf geachtet wurde, jegliche Kontaminierung mit Zink zu vermeiden, indem alle benutzten Behältnisse vorher mit einer 100 mM EDTA Lösung ausgespült wurden. Die relativ hohe Mg^{2+} -Konzentration konnte gewählt werden, da $Mg(OH)_2$ mit einem Löslichkeitsprodukt von $K_L = 5,61 \cdot 10^{-12} \text{ mol}^3/\text{l}^3$ wesentlich leichter löslich als $Zn(OH)_2$ ist.^[131] Unter diesen Bedingungen wurden sechs verschiedene Membranen präpariert und bei einer Transmembranspannung von $U_m = 100 \text{ mV}$ mit DCD in Konzentrationen von bis zu $c_{DCD} = 40 \text{ }\mu\text{M}$ untersucht. Zwar konnte in drei Fällen ein Reißen der Membran beobachtet werden, jedoch waren hierzu Proteinkonzentrationen von $c_{DCD} > 20 \text{ }\mu\text{M}$ notwendig. Stufen im Stromsignal konnten in keinem Fall beobachtet werden, was ein Beweis für die Zinkspezifität der Aktivität von DCD ist.

4.8.4 H38A-DCD-Mutante mit modifizierter Zink-Bindungsstelle

Um weitere Hinweise auf die physiologische Relevanz der Zinkbindung in diesem Protein zu erhalten, wurden Messungen mit einer DCD-Mutante durchgeführt. In dieser H38A-DCD-Mutante wurde das für die Zinkbindung essenzielle Histidin-38 (Abb. 1-18 B) gegen ein Alanin ausgetauscht, welches als hydrophobe und apolare Aminosäure keine Ionenbindungsfähigkeit mehr aufweist. Weiterhin würde eine verminderte Aktivität der Mutante in zinkhaltigem Medium eine weitere Bestätigung der Zink-Spezifität des Proteinaufbaus geben, da Zink in der Natur bevorzugt von Histidinen kinetisch fest gebunden wird, was beispielweise für Magnesium (vgl. Abschnitt 4.8.3) nicht der Fall ist.^[132]

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden die Versuche mit dieser Mutante unter denen der Experimente zum *wild type*-DCD (Abschnitt 4.8.2) identischen

Bedingungen durchgeführt. Insgesamt wurden neun Lipidmembranen durch das Spreiten von GUVs auf einem Borsilikatchip hergestellt und im Port-a-Patch Aufbau elektrophysiologisch untersucht. Der zinkhaltige Puffer (1 M NaCl, 2 mM ZnCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,1) oberhalb des Chips wurde anschließend jeweils mit unterschiedlichen Mengen einer 100 µM H38A-DCD-Stammlösung versetzt. Da in einem Konzentrationsbereich, in welchem das *wt*-DCD Aktivität aufwies, keine membranperforierende Aktivität detektiert werden konnte, wurde die Proteinkonzentration der H38A-DCD-Mutante sukzessive auf bis zu $c_{\text{H38A-DCD}} = 100 \mu\text{M}$ gesteigert. In keinem Fall konnte ein Reißen einer Membran beobachtet oder irgendeine Form von Proteinaktivität detektiert werden, was die Bindung von Zink über diese spezifische Bindungsstelle und den fundamentale Einfluss dieses Vorgangs auf die Aktivität von DCD beweist.

5 Diskussion

5.1 Präparation porenüberspannender Membranen durch das Spreiten von Lipidvesikeln

Porenüberspannende Membranen (Abschnitt 1.6.3) bieten entscheidende Vorteile gegenüber den bisher hauptsächlich für elektrophysiologische Untersuchungen an Ionenkanälen eingesetzten *black lipid membranes* (BLMs, Abschnitt 1.6.1). Während beide Systeme die gleichzeitige Detektierbarkeit beider Membranseiten über wässrige Kompartimente ermöglichen, besitzen Membranen auf porösen Trägermaterialien aufgrund ihrer hohen Stabilität ein großes Potential hinsichtlich der Entwicklung von Biosensoren in der Wirkstoffforschung.^[133]

Im Rahmen dieser Arbeit sollte gezeigt werden, dass sich porenüberspannende Membranen auf porösen Aluminaten (Abschnitt 3.3) prinzipiell auch lösungsmittelfrei durch das Spreiten von *large unilamellar vesicles* (LUVs) herstellen lassen. Zwar war die Präparation prinzipiell möglich (Abschnitt 4.2.1), jedoch wurde in den meisten Fällen ein erheblicher Leckstrom und damit ein sehr geringer Membranwiderstand erhalten. Die verwendeten LUVs wurden mithilfe der Extrusion multilamellarer Vesikel durch Poren mit einem Durchmesser von $d = 1 \mu\text{m}$ in einer Polycarbonatmembran präpariert.^[73] Die Größenverteilung der erhaltenen LUVs wurde per *dynamic light scattering* (DLS) bestimmt, wobei sich der durchschnittliche Durchmesser eines Vesikels zu $d = (730 \pm 210) \text{ nm}$ ergab (**Abb. 5-1**).^[111]

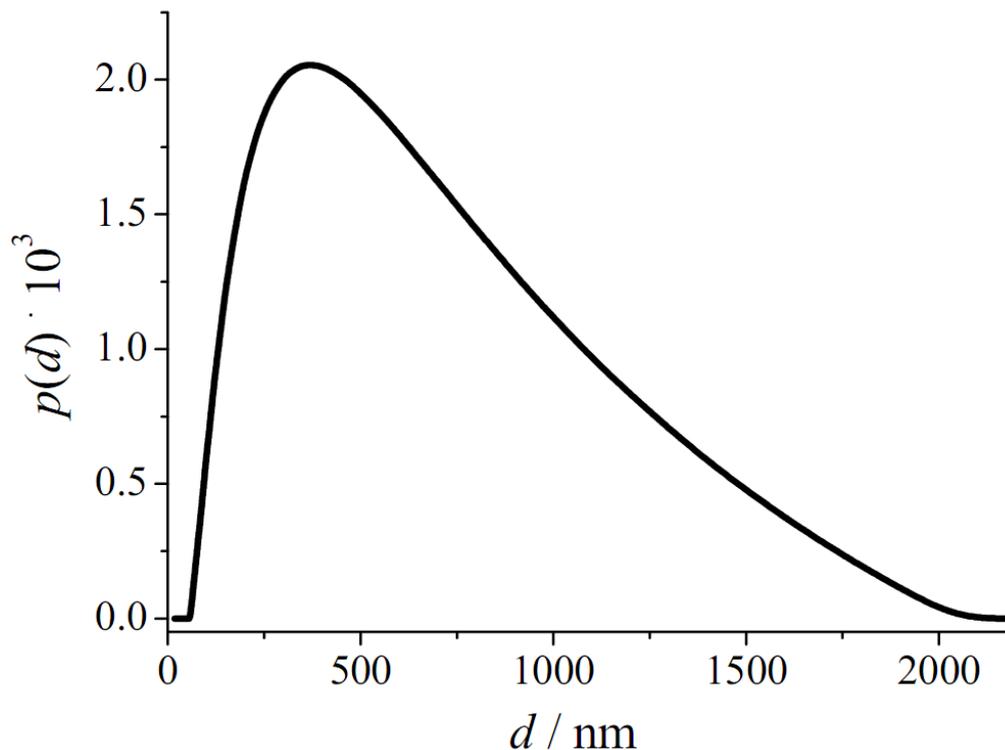


Abb. 5-1: Per *dynamic light scattering* bestimmte Verteilung der Durchmesser der zur Präparation porenüberspannender Membranen benutzten LUVs bestehend aus DPhPC/DOPC im Molverhältnis 6:4.^[111] Der durchschnittliche Vesikeldurchmesser beträgt $d = (730 \pm 210)$ nm.

Die Oberfläche eines durchschnittlichen Vesikels beträgt demnach:

$$A_0 = \pi \cdot d^2 = 1,674 \cdot 10^6 \text{ nm}^2 = 1,674 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2. \quad (5-1)$$

Der durchgängig poröse, also mit einer Membran zu überspannende Bereich der porösen Aluminate weist hingegen ein Fläche von $0,785 \text{ mm}^2$ auf, weshalb fast eine halbe Million gespreiteter LUVs notwendig wären, um diesen Bereich vollständig zu bedecken. Zwar sind in der zur Membranpräparation verwendeten LUV-Suspension genügend Vesikel vorhanden, doch bilden diese nach dem Spreiten gemeinsam keine durchgehende Lipiddoppelschicht, sondern isolierte Bereiche (*patches*) aus, die durch Fehlstellen unterbrochen sind.^[134]

Für optische Methoden, wie beispielweise die Fluoreszenzmikroskopie, kann dieser Nachteil umgangen werden, indem man sich nur auf die Bereiche konzentriert, die

ohne Fehlstellen von einer Membran überdeckt sind (*region of interest*, ROI). Auch bei elektrophysiologischen Untersuchungen an Ionenkanälen, die einen geschlossenen Zustand mit sehr geringer Restleitfähigkeit aufweisen (z. B. OmpF), ist ein Leckstrom prinzipiell unproblematisch, da er durch eine Basislinienkorrektur bereits während des Experiments kompensiert werden kann. Da das VDAC1-Protein allerdings einen geschlossenen Zustand besitzt, der eine erhebliche Restleitfähigkeit von $G_c = 2 \text{ nS}$ aufweist, können eventuell vorhandene Proteine nicht vom Leckstrom unterschieden werden. Daher wurde diese Art der lösungsmittelfreien Präparation porenüberspannender Membranen in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

5.2 Elektrophysiologische Untersuchung von Porinen in nano-BLMs

Es wurde weiterhin untersucht, ob sich BLMs auf Aluminaten, die Poren mit Durchmessern im Nanometerbereich enthalten (sog. nano-BLMs, Abschnitt 3.3.2), zur Charakterisierung von Porinen (Abschnitt 1.2.2) wie VDAC1 eignen. Im Gegensatz zur Präparation von porenüberspannenden Membranen durch das Spreiten von Lipidvesikeln (Abschnitt 5.1) enthalten diese Membranen zwar restliches organisches Lösungsmittel, allerdings zeichnen sie sich durch sehr hohe Membranwiderstände und daher sehr geringe Leckströme aus.

5.2.1 Das bakterielle Porin OmpF

Als Machbarkeitsnachweis (*proof of concept*) wurde zunächst das gut untersuchte und bereits in nano-BLMs charakterisierte^[11] bakterielle Porin OmpF (Abschnitt 1.3) in diese porenüberspannenden Membranen eingebracht. In *voltage clamp*-Experimenten (Abschnitt 3.6.2) wurde das spannungsabhängige Schließen dieses Ionenkanals untersucht. Für die einzelnen Monomere des OmpF-Trimers wurde eine durchschnittliche Leitfähigkeit von $G = (1,4 \pm 0,2) \text{ nS}$ ermittelt. Dieser Wert deckt sich exakt mit der bereits in nano-BLMs bestimmten Leitfähigkeit von $G = (1,4 \pm 0,2) \text{ nS}$ ^[11] und steht in guter Übereinstimmung mit der in der Literatur

5. Diskussion

angegebenen Leitfähigkeit von $G = 1,5 \text{ nS}$ pro Monomer.^[135] Die Integration von OmpF in nano-BLMs war demnach erfolgreich, was durch das Auftreten eines Proteintrimers, der beobachteten Spannungsabhängigkeit und der exakten Übereinstimmung der ermittelten Leitfähigkeiten mit der Literatur bewiesen wird.

Hiermit konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, die funktionelle Rekonstitution eines Porins über die Zugabe des Proteins in Detergenzmizellen (*o*-POE im Falle von OmpF bzw. LDAO im Falle von VDAC1) zu einer nano-BLM zu erreichen.

5.2.2 Das mitochondriale Porin VDAC1

Auch das mitochondriale Porin VDAC1 konnte in nano-BLMs eingebracht und elektrophysiologisch charakterisiert werden (Abschnitt 4.2.4). Ein fundamentales Problem von Einzelkanalmessungen am VDAC1 in nano-BLMs lag in der Abwesenheit einer klar definierbaren Basislinie zur Bestimmung der absoluten Leitfähigkeit aller Zustände des Proteins. Der sogenannte „geschlossene“ Zustand des hVADC1-Proteins weist zwar eine um bis zu 50 % geringere Leitfähigkeit als der offene Zustand auf, diese beträgt aber in 1 M Elektrolytlösungen immer noch ca. 2 nS. Diese für Kanalproteine sehr hohe Restleitfähigkeit war auch in diesem Aufbau auf Einzelkanalebene nicht vom Leckstrom der verwendeten nano-BLMs zu unterscheiden, weswegen nur zwischen den beiden Hauptzuständen unterschieden werden konnte.

Um dennoch Aussagen über die Öffnungswahrscheinlichkeit P_o anhand der in nano-BLMs gewonnenen Daten machen zu können, wurde die Zeit, die sich der Kanal im offenen Zustand befand, relativ zu der im geschlossenen Zustand verbrachten Zeit bestimmt. Für ein Transmembranpotenzial von $U_m = -50 \text{ mV}$ ergab sich eine Öffnungswahrscheinlichkeit von $P_o = 86 \%$, während für $U_m = -60 \text{ mV}$ ein Wert von $P_o = 80 \%$ ermittelt wurde. Bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = -30 \text{ mV}$ konnte aufgrund der wenigen detektierten Ereignisse kein aussagekräftiger Wert für P_o berechnet werden, der Kanal befand sich aber fast ausschließlich im offenen Zustand.

Sowohl die ermittelte Spannungsabhängigkeit der Öffnungswahrscheinlichkeit als auch die für VDAC1 charakteristischen Leitfähigkeitsdifferenzen der beobachteten Zustände lassen den Schluss zu, dass sich nano-BLMs prinzipiell zur elektrophysiologischen Charakterisierung dieses Ionenkanals eignen. Für die erforderlichen Experimente mit nur einem Kanal stellen sie allerdings nicht das ideale System dar, weshalb diese Untersuchungen mithilfe des Port-a-Patch Aufbaus weitergeführt wurden.

5.3 Spannungsabhängigkeit des VDAC1 auf Einzelkanalebene

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Modulation der Öffnungswahrscheinlichkeit des VDAC1-Proteins durch das Transmembranpotenzial auf Einzelkanalebene untersucht. Sowohl im Falle von porenüberspannenden Membranen, die durch das Spreiten von Lipidvesikeln präpariert wurden, als auch bei der Verwendung von nano-BLMs als Modellsystem wurden Leckströme der betreffenden Membranen detektiert, die im Bereich der durch ein VDAC-Protein auftretenden Ströme lagen. Da mithilfe des Port-a-Patch Aufbaus (Abschnitt 3.7) routinemäßig Membranen mit sehr geringer Restleitfähigkeit präpariert werden konnten (vgl. **Abb. 4-23**), wurde dieses Modellsystem zur weiteren Untersuchung des VDAC1 benutzt. Im Gegensatz zu fast allen bisher zum Phänomen der Spannungsabhängigkeit der Öffnungswahrscheinlichkeit des VDAC1 veröffentlichten Studien wurden somit Experimente auf Einzelkanalebene in lösungsmittelfreien Membranen durchgeführt (Abschnitt 3.7).

In **Abb. 5-2** ist die Öffnungswahrscheinlichkeit eines einzelnen Kanals in Abhängigkeit vom Transmembranpotenzial U_m gezeigt. Die Leitfähigkeit wurde nach Gleichung (4-7) aus insgesamt 185 hintereinander aufgenommenen Stromsignalen mit einer Gesamtdauer von 31 Minuten errechnet und mithilfe eines MatLab-Skripts ausgewertet (siehe Abschnitt 4.4.3).

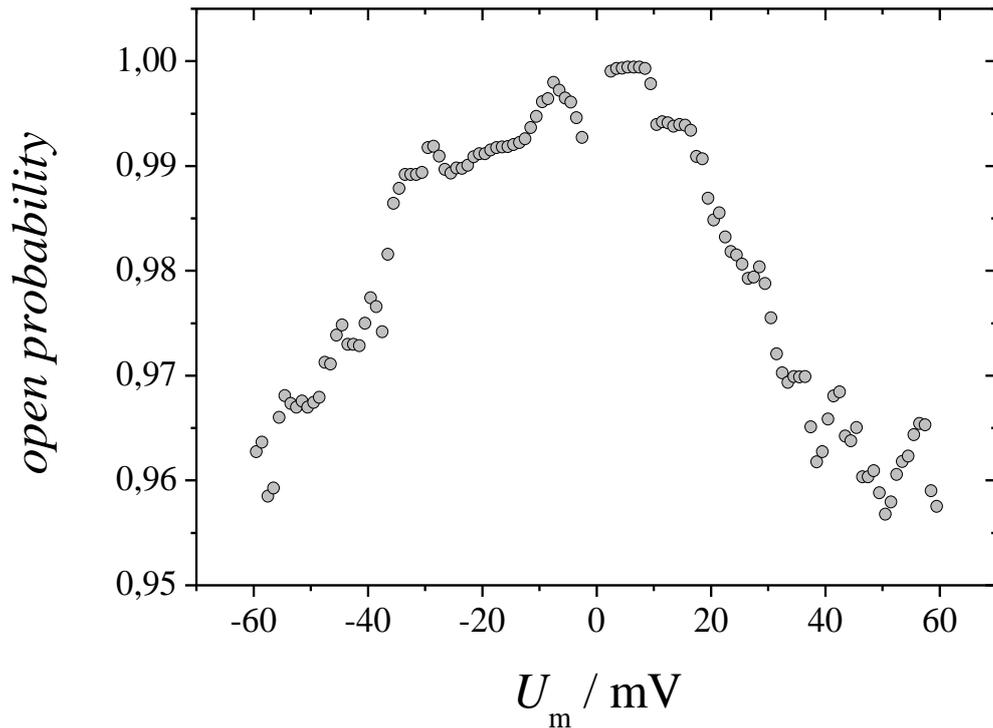


Abb. 5-2: Die Öffnungswahrscheinlichkeit eines einzelnen VDAC1-Proteins, errechnet nach Gleichung (4-7) aus 185 hintereinander aufgenommenen Stromsignalen mit einer Gesamtdauer von 31 Minuten.

Wie in Abschnitt 4.4.3 erläutert, ergibt sich die Wahrscheinlichkeit, den VDAC1 bei einem bestimmten Potenzial U_m im offenen Zustand (*open*, o) vorzufinden (*open probability*, P_o), aus dem Verhältnis der Datenpunkte, welche dem offenen Zustand entsprechen (n_{Go}) zu allen bei dieser Transmembranspannung aufgenommenen Datenpunkten (n):

$$P_o(U_m) = \frac{n_{Go}(U_m)}{n(U_m)}. \quad (5-2)$$

Für die Bestimmung der Öffnungswahrscheinlichkeit konnten keine Messungen bei konstantem Potenzial (*voltage clamp*, Abschnitt 3.6.2) benutzt werden, da VDAC1-Proteine bei erhöhtem Potenzial in den geschlossenen Zustand wechseln und dort verbleiben, bis eine Depolarisation der Membran sie wieder öffnet.^[118]

Bei allen zur Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der Öffnungswahrscheinlichkeit des VDAC1 durchgeführten Experimenten konnte jeweils zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass sich während der gesamten Aufnahmedauer genau ein VDAC1-Protein in der untersuchten Membran befand (siehe Abschnitt 4.5). Wurde dieser in einer lösungsmittelfreien Membran befindliche Ionenkanal über einen längeren Zeitraum beobachtet, so zeigte sich, dass er über 95% der Zeit im offenen Zustand vorlag und nicht zwangsläufig bei höherem Potential in den weniger leitfähigen geschlossenen Zustand wechselte. Der offene bzw. der geschlossene Zustand dieses Kanals konnte zu jedem Zeitpunkt zweifelsfrei zugeordnet werden, da die Restleitfähigkeit der Membran sehr gering war ($G_{\text{rest}} < 0,5 \text{ nS}$).

Die resultierende geringe Wahrscheinlichkeit eines Schließens des Kanals selbst bei hohen Spannungen ist in erster Linie darauf zurückzuführen, dass sich zwischen den detektierten Schließereignissen relativ lange Abschnitte in den aufgezeichneten Daten befanden, in denen keine Proteinaktivität, also ein Wechsel zwischen den beteiligten Zuständen, beobachtet wurde. Bei Experimenten an Membranproteinen und speziell bei Untersuchungen an Ionenkanälen werden im Allgemeinen nur die Abschnitte in den aufgezeichneten Daten ausgewertet, in denen Proteinaktivität detektiert wurde (sog. *bursts*). Dies ist insofern zulässig, da bei den standardmäßig durchgeführten Experimenten (BLM-Messungen, Abschnitt 1.6.1 oder *Patch clamp*-Messungen, Abschnitt 3.5) nicht unterschieden werden kann, ob ein bestimmtes Protein nicht anwesend ist oder sich inaktiv in der Membran befindet. Im Falle des VDAC1 wird diese Unterscheidung zusätzlich noch dadurch erschwert, dass auch der „geschlossene“ Zustand des Proteins eine verhältnismäßig hohe Leitfähigkeit ($G_c = 2 \text{ nS}$) besitzt und so nicht anhand eines hohen Membranwiderstands im Falle eines geschlossenen Proteins identifiziert werden kann.

In der Literatur wird vereinzelt explizit darauf hingewiesen, dass zur Auswertung von P_o des VDAC1 nur solche Datenstücke verwendet wurden, die Proteinaktivität beinhalten.^{[136],[137]} Von den 185 einzelnen Stromsignalen des in diesem Abschnitt beschriebenen Beispiels zeigten nur 33 (18 %) Proteinaktivität. Eine

5. Diskussion

Bestimmung der Öffnungswahrscheinlichkeit nur anhand dieser Signale ergab eine wesentlich stärker ausgeprägte Spannungsabhängigkeit des VDAC1 (**Abb. 5-3**).

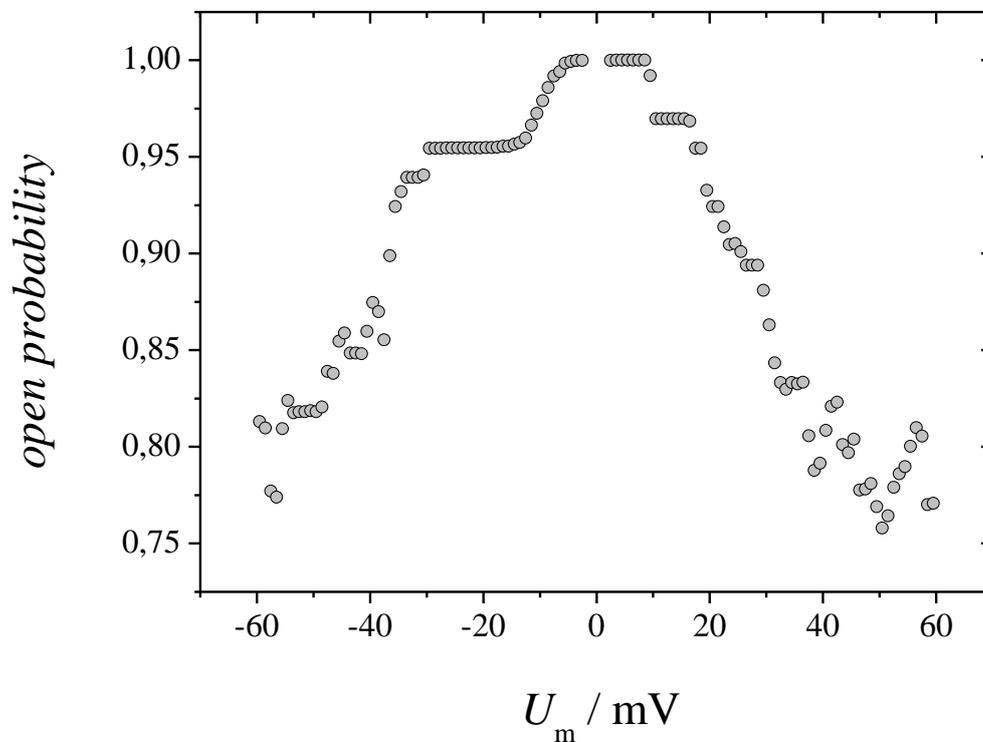


Abb. 5-3: Öffnungswahrscheinlichkeit des VDAC1 errechnet nach Gleichung (4-7) aus 33 Stromsignalen, welche Proteinaktivität zeigten. Bei insgesamt 185 hintereinander aufgenommenen Signalen entspricht dies einem Anteil von 18 % (5,5 min).

In diesem Fall sinkt die Öffnungswahrscheinlichkeit auf unter 80 % bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = \pm 60$ mV. Eine ähnliche Spannungsabhängigkeit von P_o wurde unter identischen Bedingungen auch für die weiterhin untersuchten RGS- und V17C/A205C-VDAC-Mutanten gefunden (siehe Abschnitt 4.6). Alle untersuchten VDAC-Varianten sind somit zwar eindeutig spannungsabhängig, schließen jedoch auf Einzelkanalebene keinesfalls zwangsläufig bei erhöhtem Potential. Das gezielte „Umschalten“ eines einzelnen Kanals von seinem offenen in seinen geschlossenen Zustand durch das Anlegen eines Transmembranpotenzials von $U_m > 30$ mV scheint somit *nicht* möglich zu sein.

5.3.1 Ermittlung der Spannungsabhängigkeit des VDAC1 auf Multikanalebene

Um zu überprüfen, ob die auf Einzelkanalebene beobachtete, nur geringe Spannungsabhängigkeit der Öffnungswahrscheinlichkeit des VDAC1 unter ansonsten identischen Bedingungen auch auf Multikanalebene auftritt, wurden auch Messungen mit mehreren beteiligten Ionenkanälen mithilfe des Port-a-Patch Aufbaus durchgeführt. Bei der standardmäßig in der Literatur verwendeten Methode zur Ermittlung der Spannungsabhängigkeit von P_o des VDAC1 werden Stromsignale ausgewertet, die an Membranen mit einer Vielzahl inkorporierter Ionenkanäle aufgenommen wurden. Die Parameter eines einzelnen Kanals sind so nicht mehr zugänglich, weshalb in diesem Fall keine Auswertung der Öffnungswahrscheinlichkeit eines einzelnen Kanals nach Gleichung (5-3) möglich ist. Im Allgemeinen wird das Stromsignal einer Membran mit vielen enthaltenen Kanäle nach Gleichung (3-7) in Leitfähigkeiten umgerechnet und P_o dann über Gleichung (5-3) bestimmt.^[138] Hierbei wird die niedrigste beobachtete Leitfähigkeit G_{min} per Definition einem Zustand zugeordnet, in dem alle beobachteten Kanäle in ihrem geschlossenen Zustand vorliegen. Die Wahrscheinlichkeit P_o , einen Kanal bei einem bestimmten Transmembranpotenzial U_m im offenen Zustand vorzufinden wird dann definiert als:

$$P_o(U_m) = \frac{G(U_m) - G_{min}}{G_{max} - G_{min}}. \quad (5-3)$$

Die spannungsabhängige Leitfähigkeit $G(U_m)$ fällt folglich definitionsgemäß, wie in **Abb. 5-4** gezeigt, bis auf Null ab.

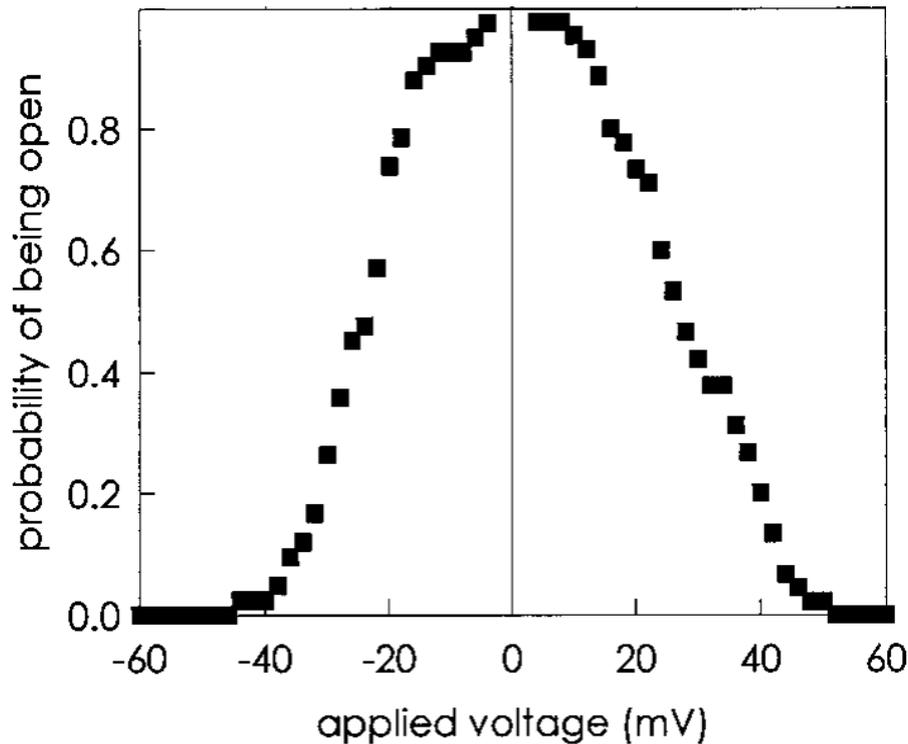


Abb. 5-4: Beispiel einer Auftragung zur Öffnungswahrscheinlichkeit von VDAC1 in Abhängigkeit von der Transmembranspannung ermittelt nach Gleichung (5-3).^[139]

Mithilfe des Port-a-Patch Aufbaus (Abschnitt 3.7) wurde auch das bereits in Kapitel 4.4.1 gezeigte Stromsignal einer Membran, die mehrere VDAC1-Proteine enthält, aufgenommen. Anhand dieser Aufnahme wurde überprüft, ob die Spannungsabhängigkeit der Öffnungswahrscheinlichkeit in diesem Fall ähnlich gering wie auf Einzelkanalebene ausfällt. Es wurde darauf geachtet, dass diese Messung unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde (Membran aus DPhPC/Cholesterol 9:1, Puffer: 1 M KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4), wie das Experiment, welches die in **Abb. 5-6** gezeigte geringe Spannungsabhängigkeit der Öffnungswahrscheinlichkeit des VDAC1 ergab. Das Transmembranpotenzial wurde mit 25 mV/s zunächst von $U_m = 0$ mV auf $U_m = -60$ mV abgesenkt und anschließend wieder in gleicher Weise erhöht.

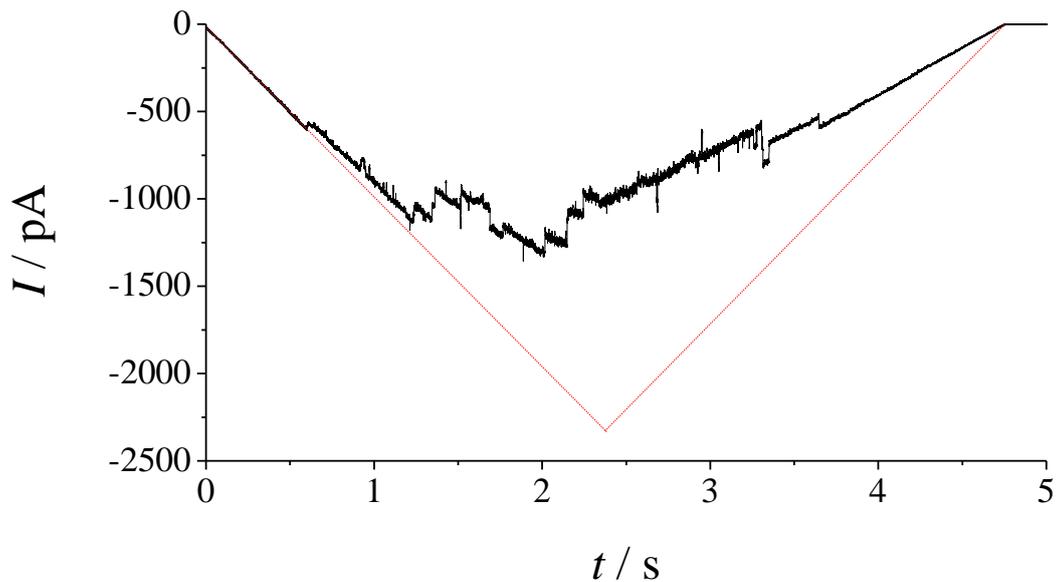


Abb. 5-5: Stromantwort einer Membran mit mehreren enthaltenen VDAC1-Molekülen. Die Transmembranspannung wurde innerhalb von $t = 2,4$ s von $U_m = 0$ mV auf $U_m = -60$ mV gesenkt und anschließend wieder auf $U_m = 0$ mV zurückgefahren. Das Schließen einzelner Kanäle äußert sich in einer stufenweisen Abnahme des Stroms als Reaktion auf ein erhöhtes Transmembranpotenzial. Der theoretische Stromverlauf ohne diese Schließereignisse ist in rot dargestellt. Puffer: 1 M KCl, 1 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7,4.

Eine Umrechnung dieser Stromkurve unter Berücksichtigung der jeweils anliegenden Transmembranspannung nach Gleichung (3-7) liefert die Leitfähigkeit der Membran an jedem Punkt der Kurve. Es ergibt sich eine maximale Leitfähigkeit von $G_{\max} = 38,2$ nS bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = -10$ mV und eine minimale Leitfähigkeit von $G_{\min} = 16,8$ nS bei $U_m = -60$ mV. Eine Auftragung der nach Gleichung (5-3) berechneten Wahrscheinlichkeit, den Kanal im offenen Zustand vorzufinden (P_o) ist in **Abb. 5-6** gezeigt. Zur besseren Übersicht wurde nur der Bereich von $t = 0-2,4$ s aus **Abb. 5-5** aufgetragen.

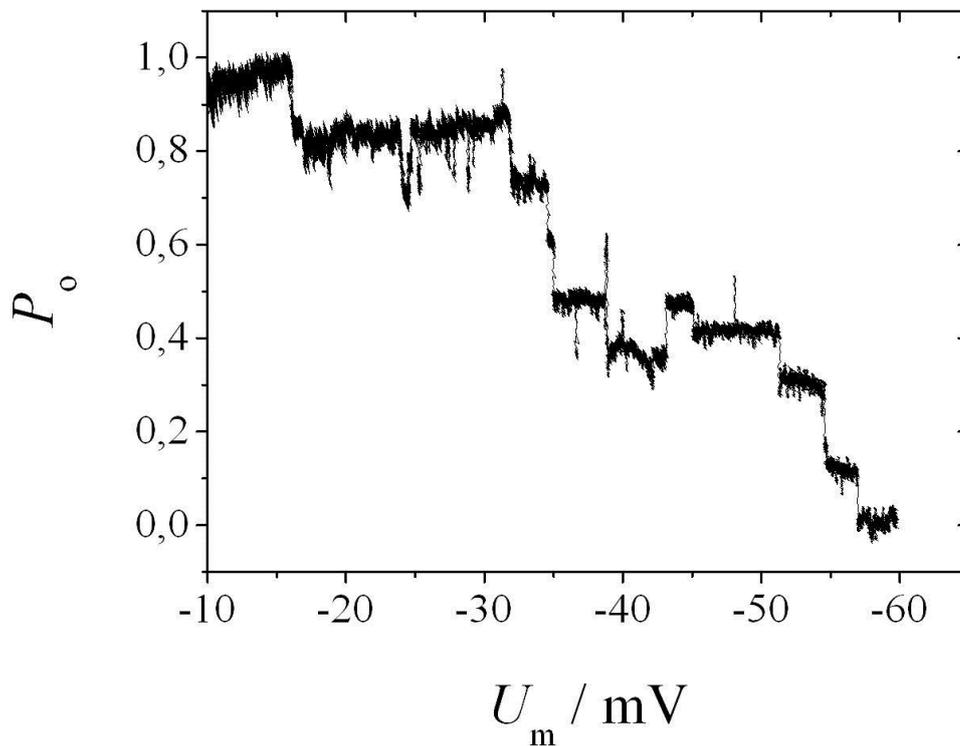


Abb. 5-6: Öffnungswahrscheinlichkeit P_o von VDAC1 in Abhängigkeit des Transmembranpotenzials U_m . Die Daten wurden durch Umrechnung des Stromsignals aus **Abb. 5-5** im Bereich von $t = 0$ -2,4 s nach Gleichung (3-7) und (5-3) erhalten.

Schon bei dieser Auftragung anhand der Daten nur eines Teils einer Aufnahme wird deutlich, dass sich P_o dieser Auswertung zufolge zwangsläufig im Bereich zwischen 1,0 und 0,0 bewegen muss. Die diskreten Sprünge in den Daten sind dem Schließen einzelner Kanäle in der Membran geschuldet. Werden mehrere Stromantworten ganzer Spannungsrampen mit einer geringeren Auflösung aufgetragen, so ergibt sich die typischerweise in der Literatur gezeigte Glockenkurve (**Abb. 5-4**).

Auch bei dem in **Abb. 5-6** gezeigten Beispiel ist eine Spannungsabhängigkeit zu erkennen, da bei niedrigem Potenzial die höchste und bei höchstem Potenzial die niedrigste Leitfähigkeit detektiert wurde. Allerdings wurde im gewählten Beispiel zusätzlich zu den für die Auftragung herangezogenen Leitfähigkeiten eine spannungsunabhängige Restleitfähigkeit von $G_{\text{rest}} = 21,4$ nS gemessen. Die Herkunft dieser Leitfähigkeit bleibt unklar und kann theoretisch auch von mehreren ebenfalls in der Membran anwesenden VDAC1-Proteinen stammen, die *nicht* auf die erhöhte Spannung reagiert haben.

Da sich das im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Verhalten des VDAC1 auf Multikanalebene genau mit dem in der Literatur beschriebenen deckt, kann davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Proteine voll funktionsfähig sind und sich der Port-a-Patch Aufbau prinzipiell zur Untersuchung dieser Ionenkanäle eignet.

5.4 Kooperative Effekte bei Ionenkanälen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte für *wild type*-VDAC1 und für zwei Mutanten gezeigt werden, dass die Proteine auf Einzelkanalebene prinzipiell spannungsabhängig in einen geschlossenen Zustand wechseln. Wird die Gesamtheit der aufgenommenen Daten, in denen sich ein einzelnes Protein zweifelsfrei in der Membran befindet, zur Auswertung herangezogen, ergibt sich nur eine sehr gering ausgeprägte Spannungsabhängigkeit der Öffnungswahrscheinlichkeit P_o (Abschnitt 5.3). Diese Abweichung von den bisher beschriebenen, überwiegend durch Experimente mit mehreren beteiligten VDAC1-Proteinen ermittelten Eigenschaften dieses Kanals, wirft die Frage auf, ob ein kooperativer Effekt die Grundlage für die beschriebene, sehr ausgeprägte Spannungsabhängigkeit der VDAC-Proteine *in vivo* sein könnte.

Ein kooperatives Verhalten zwischen Membranproteinen ist beispielweise von Ca^{2+} -Rezeptoren im Rahmen der Weiterleitung bestimmter Signale in höheren Organismen bekannt.^[140] Auch bei Chemorezeptoren wie der Histidinkinase CheA in *E. coli* wurde im Verlauf der Chemotaxis eine Kooperation zwischen einzelnen Proteinen beobachtet.^[141] Die Gruppierung von tausenden Proteinen zu einer Einheit scheint hier, ähnlich wie bei allosterischen Proteinen, eine wesentliche Verstärkung des eingehenden Signals und der darauf folgenden Reaktion zu bewirken.

Im Falle spannungsgesteuerter Ionenkanäle werden seit einigen Jahrzehnten kooperative Effekte diskutiert. Vor allem für die an der Weiterleitung eines Aktionspotenzials entlang von Axonen beteiligten, spannungssensitiven Na^+ - und K^+ -Kanälen wurde wiederholt die Bildung höherer Proteinoligomere als Basis der Erklärung bestimmter Effekte herangezogen. So wiesen Kiss *et al.* bereits 1985

5. Diskussion

darauf hin, dass die Öffnungswahrscheinlichkeit von Na^+ -Kanälen aus Neuroblastomzellen stark davon beeinflusst wird, ob weitere Kanäle in direkter Umgebung eines beobachteten Kanals vorhanden sind, oder nicht.^[142] Als Ursache dieses Effekts diskutierten die Autoren eine direkte Beeinflussung der Kanäle untereinander, was durch aktuelle Forschungsergebnisse noch vertieft wird.^[143] So kann beispielsweise das *in vivo* und *in vitro* beobachtete sehr schnelle Einsetzen eines Aktionspotenzials nicht auf Einzelkanalebene erklärt werden. Ein kooperativer Effekt zwischen vielen beteiligten Kanälen, der für eine veränderte Öffnungswahrscheinlichkeit verantwortlich gemacht wird, liefert hingegen eine durch Berechnungen anhand geeigneter Modelle gestützte Erklärung für dieses Phänomen.^[144] Ähnliche, auf kooperativem Verhalten vieler Kanäle beruhende Effekte wurden auch für spannungsgesteuerte Ca^{2+} -^[145] und HCN-Kanäle^[146] beschrieben.

Auch für VDAC1 wurde ein möglicher Unterschied zwischen Einzelkanalexperimenten und solchen mit mehreren beteiligten Kanälen in der Literatur beschrieben.^[21] In diesen Arbeiten wurde darauf hingewiesen, dass es im Falle von Untersuchungen an Membranen mit nur einem enthaltenen Protein sehr schwierig sei, eine für die weitere Auswertung ausreichende Statistik an Ereignissen zu erhalten. Aus diesem Grund gibt es kaum quantitative Aussagen über das Verhalten des VDAC1 auf Einzelkanalebene, es wird allerdings berichtet, dass der Kanal eine geringere Aktivität aufweise und über Zeiträume von Stunden im offenen oder geschlossenen Zustand vorliegen könne.^[147]

Einen weiteren Hinweis auf eine bevorzugt oligomere Anordnung von VDAC1-Proteinen liefert eine Analyse der Orientierung dieser Moleküle in Proteinkristallen.^[148] In diesen Kristallen, die in einer der natürlichen Umgebung nachempfundenen Lipidumgebung gezüchtet wurden, liegen die VDAC1-Proteine als untereinander fest assoziierte, antiparallele Dimere vor (**Abb. 5-7**).

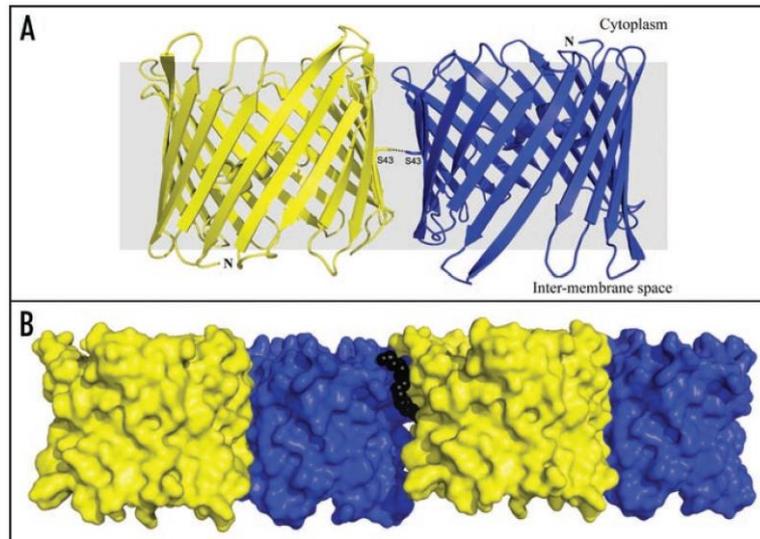


Abb. 5-7: A: Darstellung eines antiparallelen VDAC1-Dimers, welches in Proteinkristallen als bevorzugte Anordnung dieser Moleküle gefunden wurde.^[148] Die Monomere sind je nach Orientierung ihres N-Terminus in gelb (N-Terminus unten) bzw. in blau (N-Terminus oben) dargestellt. Neben stabilisierenden Van-der-Waals-Kräften wird eine Wasserstoffbrücke zwischen den Serin-43 Seitenketten beider Monomere postuliert. **B:** Darstellung der Van-der-Waals-Oberfläche mehrerer lateral angeordneter Monomere. Ein Monomer des zur Kristallisation benutzten Lipids Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) ist zusätzlich als schwarzes Kalottenmodell dargestellt.

Im Falle des mechanosensitiven Ionenkanals MscL wurden ebenfalls unterschiedliche Parameter im Verhalten des Kanals auf Einzel- und auf Multikanalebene festgestellt.^[149] Hier wird spekuliert, dass eine Stauchung bzw. Streckung des Proteins in der Membran und der damit einhergehende *hydrophobic mismatch* (vgl. **Abb. 1-20**) die direkte Membranumgebung und damit indirekt benachbarte Proteine beeinflusst (**Abb. 5-8**).^[62] Die Veränderung des Proteinvolumens eines Ionenkanals wird demzufolge durch die Membran weitergeleitet und beeinflusst indirekt durch die Modulation der Membran benachbarte Proteine.^[150]

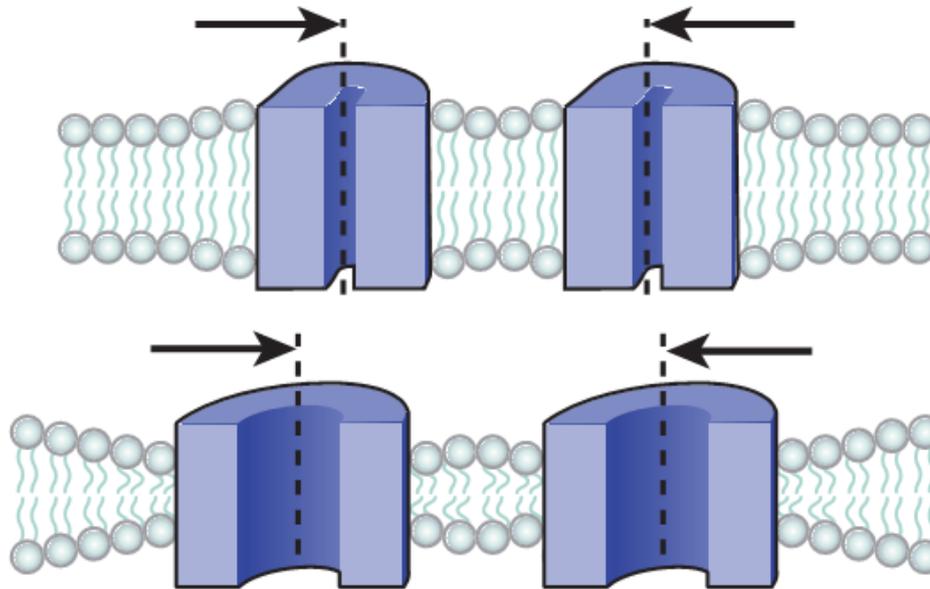


Abb. 5-8: Kooperatives Verhalten zweier Membranproteine.^[62] Die Veränderung des Volumen und/oder der Höhe eines Proteins beeinflusst die umgebende Membran, was im Falle direkt benachbarter Proteine eine Modulation weiterer Moleküle zur Folge hat.^[150]

Eine Theorie zum *gating* des VDAC1 befasst sich genau mit solch einer Volumenveränderung des Moleküls im Verlauf des Wechsels zwischen einem höher und einem niedriger leitfähigen Zustand. Da eine Bewegung der N-terminalen Helix des VDAC1 innerhalb des β -barrels nicht die alleinige Grundlage einer Leitfähigkeitsverminderung zu sein scheint (vgl. Abschnitt 4.7 und 5.7), wurde über eine das β -barrel stabilisierende Funktion dieses quer in der Pore liegenden Proteinabschnitts spekuliert.^[127] Tatsächlich zeigte sich in *molecular dynamics* (MD) Simulationen, dass ein VDAC1-Protein, dem diese Helix entfernt wurde [$\Delta(1-20)$ VDAC1], stark destabilisiert ist und entlang einer Achse, welche ungefähr durch die β -Faltblätter β_1 und β_9 verläuft, unter einer Membranspannung von 10 mN/m kollabiert.

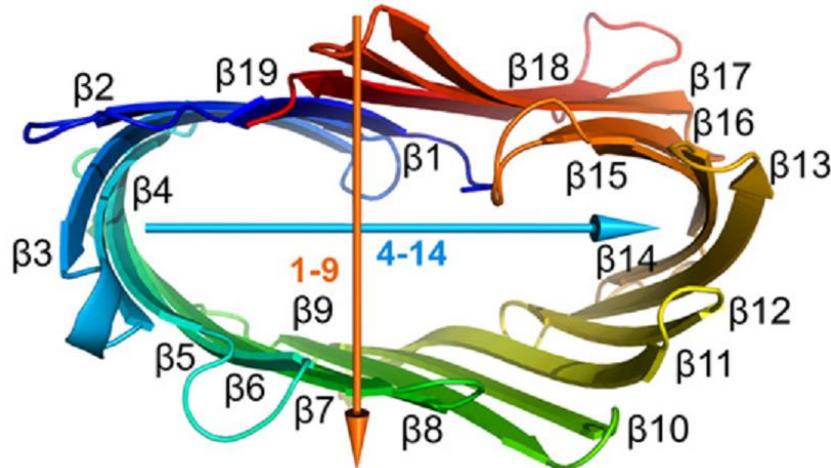


Abb. 5-9: *Molecular dynamics* (MD) Simulation eines VDAC1-Moleküls, welches keine stabilisierende N-terminale α -Helix enthält [$\Delta(1-20)$ VDAC1].^[127] Wird dieses Molekül in einer Membran bestehend aus DMPC (s. o.) einer Membranspannung von ca. 10 mN/ m ausgesetzt, so kollabiert das β -barrel entlang einer Achse, welche ungefähr durch die β -Faltblätter $\beta 1$ und $\beta 9$ verläuft (orange).

Diese Strukturveränderung des VDAC1-Moleküls würde für eine Kooperation mehrerer Proteine nach dem oben beschriebenen, anhand von Studien am MscL-Protein entwickelten Mechanismus sprechen.

5.4.1 Physiologische Relevanz von VDAC1-Oligomeren

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse und die in Abschnitt 5.4 erläuterten Zusammenhänge bekräftigen die Vermutung, dass die in der Literatur beschriebene starke Spannungsabhängigkeit der Öffnungswahrscheinlichkeit des VDAC1 auf einem kooperativen Effekt mehrerer Proteine beruht. Fragmente der äußeren Mitochondrienmembran (*outer mitochondrial membrane*, OMM) zeigen, wie eingangs erwähnt, eine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit (vgl. **Abb. 1-8**), was die Frage aufwirft, ob einem VDAC-Monomer überhaupt eine physiologische Relevanz *in vivo* zukommt.

Um zu ermitteln, ob VDAC1 als Monomer oder Proteinaggregat in einer nativen Mitochondrienmembran vorliegt, wurden rasterkraftmikroskopische Studien an OMM-Fragmenten durchgeführt. **Abb. 5-10** zeigt die Aufnahme einer OMM von Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*).^[151]

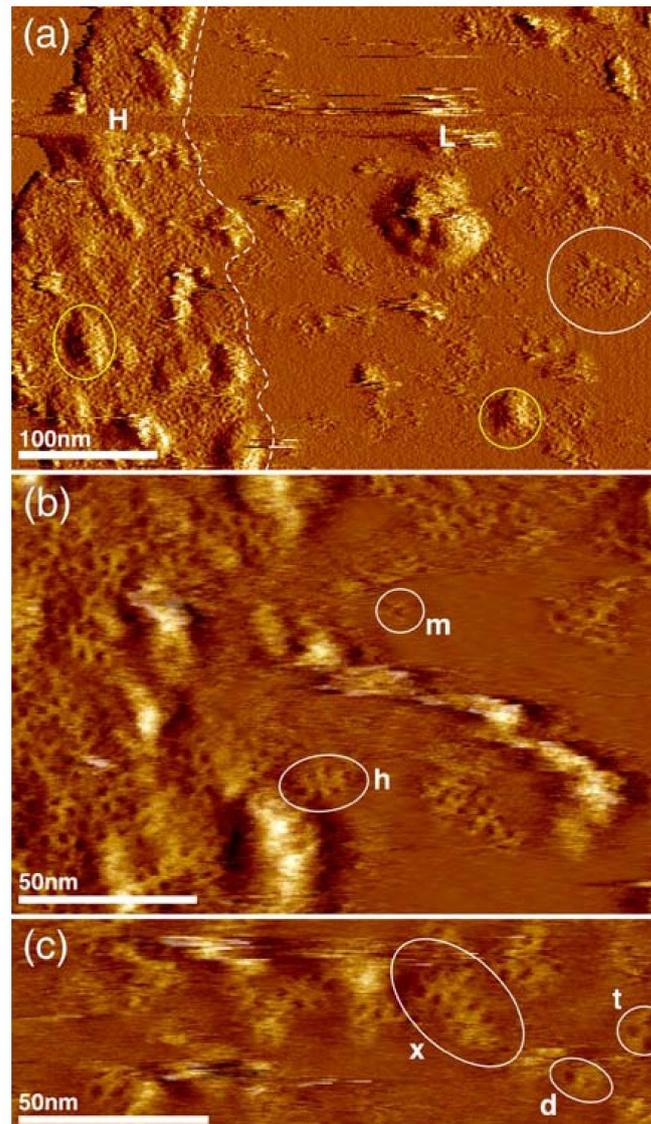


Abb. 5-10: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme der äußeren Mitochondrienmembran von *Saccharomyces cerevisiae*.^[151] A: Es existieren Bereiche geringer (*low*, L) und hoher (*high*, H) Dichte von VDAC1-Proteinen in der Membran. Die einzelnen VDAC1-Moleküle sind als dunkle Punkte erkennbar und liegen fast ausschließlich in oligomerer Form vor (weiß eingekreist), wobei mitunter eine leichte Ausstülpung der Membran im Bereich der Proteinaggregate zu erkennen ist (kleinere Kreise). B/C: Innerhalb der VDAC1-Oligomere lassen sich monomere (m), dimere (d), trimere (t) und hexamere (h) Formen, sowie höhere Aggregate (x) unterscheiden.

Es unterscheiden sich die Bereiche hoher VDAC1-Dichte von der ebenen umgebenden Lipidmembran. Die einzelnen Ionenkanäle sind als schwarze Punkte erkennbar, wobei sich monomere (selten), dimere, trimere und hexamere Anordnungen, sowie höhere Aggregate unterscheiden lassen.

In **Abb. 5-11** ist eine weitere im *contact mode* aufgenommene rasterkraftmikroskopische Abbildung der äußeren Mitochondrienmembran einer Kartoffelzelle gezeigt.^[152] Es ist die vermehrt auftretende hexamere Anordnung von jeweils sechs VDAC1-Kanälen zu erkennen.

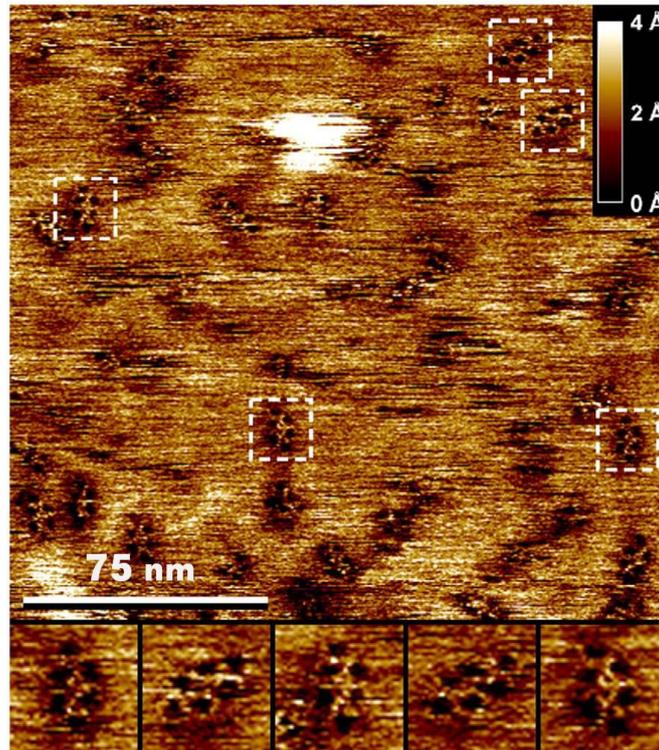


Abb. 5-11: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von VDAC1-Kanälen in der äußeren Mitochondrienmembran von *Solanum tuberosum*.^[152] Das Höhenprofil ist über eine Farbskala codiert (rechts oben), die einzelnen Kanäle erscheinen daher als schwarze Punkte innerhalb der Membran. Die fünf unten gezeigten, vergrößerten Ausschnitte haben eine Größe von jeweils (18 x 18) nm².

Bei Untersuchungen an VDAC1-Proteinkristallen per Transmissionselektronenmikroskopie wurden ebenfalls oligomere Strukturen gefunden,^[153] wobei ein VDAC1-Hexamer als Elementarzelle identifiziert werden konnte.^[154] Die genaue Analyse von VDAC1-Kristallstrukturen ergab, dass sich jeweils zwei VDAC1-Moleküle zu einem stabilen antiparallelen Dimer anordnen (siehe **Abb. 5-7**), welches seinerseits mit zwei weiteren Dimeren ein Hexamer bildet (**Abb. 5-12**).^[148]

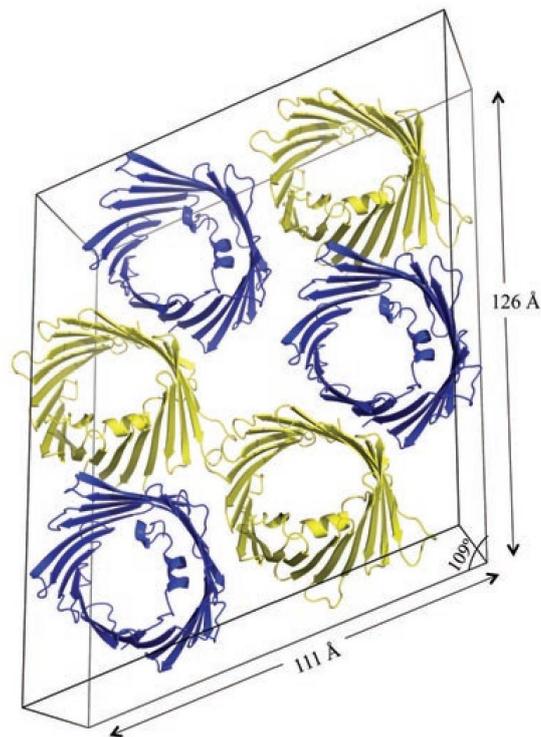


Abb. 5-12: Hexamere Anordnung von antiparallel zueinander orientierten VDAC1-Molekülen aus der OMM von *Mus musculus* als Elementarzelle des Proteinkristalls.^[148] Die einzelnen Monomere sind je nach Lage ihrer N-Termini blau (N-Terminus schaut nach hinten) bzw. gelb (N-Terminus schaut nach vorn) dargestellt.

Die physiologische Relevanz dieser VDAC-Oligomere wurde in biochemischen Studien bestätigt. Demnach sind hauptsächlich oligomere Formen dieses Proteins für die Ausschüttung von Cytochrom *c* während der Initiation der Apoptose^[155] (siehe Abschnitt 1.4.3) oder für die Interaktion mit anderen an der Apoptose beteiligten Proteinen verantwortlich.^[156]

Diese Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass es sich bei der *in vivo* hauptsächlich vorkommenden Anordnung des VDAC1 nicht um Monomere allein, sondern um Oligomere, insbesondere um Hexamere handelt.^[16] Dies könnte ein Grund für die Diskrepanz zwischen dem bisher - auch an Membranpräparationen und nicht nur an isolierten und wieder rekonstituierten Proteinen - beobachteten Verhalten des VDAC1 und dem in dieser Arbeit auf Einzelkanalebene ermittelten sein. Es muss daher in Frage gestellt werden, ob eine molekulare Erklärung der Spannungsabhängigkeit dieses Proteins auf Einzelkanalebene überhaupt möglich ist.

5.5 Einfluss von organischem Lösungsmittel

In neuerer Literatur finden sich zwar Hinweise auf eine weniger stark als bisher beschriebene Spannungsabhängigkeit des VDAC1 in hoch konzentrierten Pufferlösungen (1 M KCl),^[137] doch auch in diesen Fällen ist sie stärker ausgeprägt, als die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse es nahelegen. Diese Experimente wurden allerdings ausnahmslos an klassischen BLMs (Abschnitt 1.6.1), also stark lösungsmittelhaltigen Membranen durchgeführt. Das restliche in der Membran verbliebene Lösungsmittel beeinflusst nachweislich die Membrandicke,^[66] ihre Mechanik^[67] und damit letztlich auch die inkorporierten Membranproteine.^[69] Es ist also vorstellbar, dass der Einfluss der umgebenden Lipidmatrix auf ein Membranprotein gerade auf Einzelkanalebene besonders stark ausgeprägt ist. Zachariae *et al.* postulieren, dass der Vorgang des Wechsels in seinen weniger leitfähigen Zustand mit einer Deformation des gesamten β -barrels des VDAC1 einhergeht.^[127] Es wäre also denkbar, dass eine erhöhte Membranspannung einen Übergang des VDAC1 in seinen weniger leitfähigen Zustand begünstigen könnte. Unter physiologischen Bedingungen besitzen Membranen *in vivo* nur eine sehr geringe Membranspannung von 0,01-0,1 mN/m,^{[157],[158]} während lösungsmittelhaltige BLMs Werte von 3-5 mN/m^[159] oder mehr aufweisen.^[160] Dies könnte zwar eine Erklärung für die in klassischen BLMs beobachtete Spannungsabhängigkeit sein, würde aber das spannungsabhängige Verhalten von VDAC-Proteinen in nativen Membranfragmenten nicht erklären. Weiterhin weisen porenüberspannende Membranen auf hydrophob funktionalisierten Substraten tendenziell noch höhere Membranspannungen auf, als BLMs,^[68] die in nano-BLMs ermittelten Öffnungswahrscheinlichkeiten stimmten jedoch mit denen in lösungsmittelfreien Membranen überein (Abschnitt 5.2.2).

Prinzipiell ist es sehr schwer, den Einfluss von Lösungsmitteln auf ein Membranprotein genau zu quantifizieren. Da lösungsmittelhaltige Modellmembranen im Vergleich zu Zellmembranen *in vivo* jedoch generell eine zehn- bis hundertfach höhere Membranspannung aufweisen, sollte dieser Fakt bei der Bewertung der in

diesen Modellsystemen ermittelte Proteincharakteristika nicht unberücksichtigt bleiben.

5.6 Charakteristisches *fast gating* der RGS-VDAC-Mutante

5.6.1 Molekulare Ursache des *fast gatings*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Mutante des natürlich vorkommenden *wild type*-VDAC-Proteins elektrophysiologisch charakterisiert. Diese RGS-VDAC-Mutante wies aufgrund dreier zusätzlich eingefügter Aminosäuren einen modifizierten N-Terminus auf (**Abb. 5-13**).

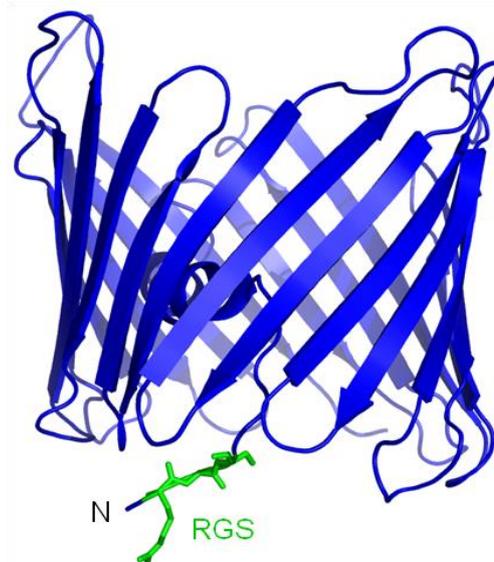


Abb. 5-13: 3D-Struktur der RGS-VDAC-Mutante. Die im Vergleich zu dem natürlich vorkommenden *wild type*-VDAC1 zusätzlich eingefügten Aminosäuren Arginin (R), Glycin (G) und Serin (S) sind grün hervorgehoben.

Neben dem auch für den *wt*-VDAC1 charakteristischen spannungsabhängigen *main gating* (Abschnitt 5.3) wurde bei dieser Mutante in elektrophysiologischen Experimenten mitunter ein weiteres *gating* beobachtet. Eine Untersuchung der Kinetik dieses zweiten *gatings* ergab hohe Übergangsraten zwischen den beteiligten Zuständen, weswegen es im Gegensatz zu dem bisher auch beim *wt*-VDAC1

beobachteten *main gating* als *fast gating* benannt wurde. Das *fast gating* überlagerte das *main gating* und trat sowohl im offenen, als auch im geschlossenen Hauptzustand des RGS-VDAC1 auf (Abschnitt 4.6.2).

Von anderen Proteinen vergleichbarer Struktur ist ein verändertes *gating* in Folge eines Austauschs bestimmter Aminosäuren bekannt. So wurde im bakteriellen Porin OmpC, welches dem OmpF und damit auch dem VDAC1 strukturell sehr ähnlich ist (vgl. Abschnitt 1.3 und 1.4), ein Arginin an entscheidender Position durch ein Cystein ersetzt. Genau wie OmpF liegt auch dieses Protein als Trimer in der äußeren Membran von *Escherichia coli* vor, wobei jedes Monomer aus einem durch diverse *loops* verengtes β -barrel besteht.^[161] Das betreffende Arginin-73 befindet sich in jedem der drei OmpC-Monomere in der Porenwand und ragt genau in diese hinein (Abb. 5-14).

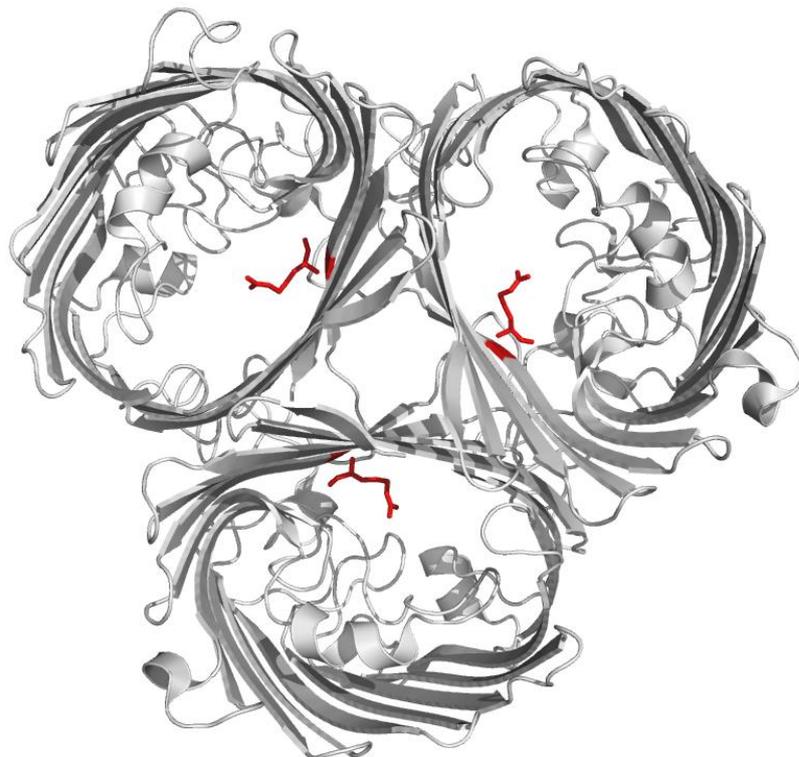


Abb. 5-14: Röntgenstruktur eines OmpC-Trimers aus der äußeren Membran des Bakteriums *Escherichia coli*, ermittelt mit einer Auflösung von 2,0 Å.^[161] Die Aminosäure Arginin-73 ist in jedem Monomer als rotes Stäbchenmodell gezeigt.

5. Diskussion

Aufgrund ihrer bei physiologischem pH-Wert positiven Ladung wurde vermutet, dass dieser Seitenkette eine entscheidende Rolle beim spannungsabhängigen *gating* des Kanals zukommt. Tatsächlich zeigte eine R73C-OmpC-Mutante eine signifikant erhöhte Leitfähigkeit und ein verändertes *gating*.^[162] Dieser Effekt konnte auch bei anderen Ionenkanälen beobachtet werden. So wurden beispielsweise in einem Porin aus *Haemophilus influenzae* Typ B (Hib Porin) die positiven Ladungen dreier Lysin-Seitenketten durch eine Modifikation mit Bernsteinsäureanhydrid neutralisiert.^[163] Auch hier wurde eine Veränderung der Leitfähigkeit und des *gatings* beobachtet.

Geladene Seitenketten von einzelnen Aminosäuren bilden gerade bei spannungsgesteuerten Ionenkanälen Strukturen, die auf ein anliegendes Potential reagieren und so als Spannungssensor dienen, oder eine entscheidende Rolle beim *gating* eines Kanals spielen.^[164] Auch wird für diese Effekte ein von den geladenen Aminosäureseitenketten erzeugtes Transversalfeld innerhalb der Proteinporen verantwortlich gemacht, welches den Transport von Ionen und anderen geladenen Molekülen kontrolliert.^[165] Simulationen der Moleküldynamik bestätigen diese Theorie z. B. im Fall von OmpF.^[166]

Für VDAC1 wurde ebenfalls in verschiedenen Simulationen gezeigt, dass sowohl die Leitfähigkeit, als auch die Selektivität des Kanals und das beobachtete *gating* von geladenen und polaren Aminosäuren des Proteins abhängt.^{[167],[168]} In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Griesinger (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) wurde daher mittels NMR untersucht, ob sich die bei der RGS-VDAC-Mutante eingefügte Modifikation des N-Terminus prinzipiell an einer Position befindet, die einen Einfluss auf das *gating* des Ionenkanals plausibel erklären könnte. Hierzu wurden ¹H,¹⁵N-TROSY (*transverse optimized relaxation spectroscopy*) Spektren von *wild type*- und RGS-VDAC1 aufgenommen und miteinander verglichen. In **Abb. 5-15** ist die Position der drei zusätzlich eingefügten Aminosäuren in grün gezeigt.

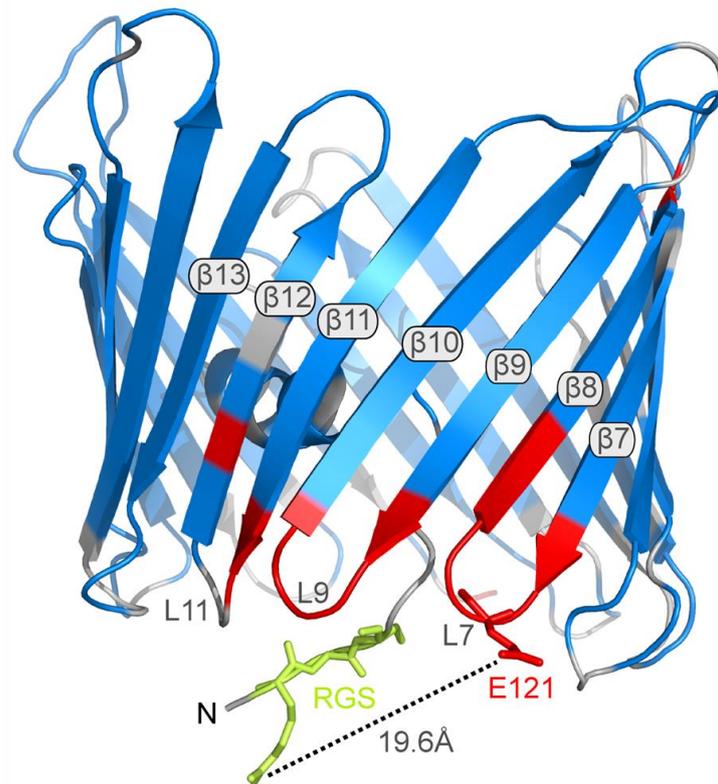


Abb. 5-15: Durch $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY Experimente bestimmte Position des modifizierten N-Terminus (grün) der RGS-VDAC1-Mutante. Bereiche des Proteins, in denen bei der RGS-VDAC-Mutante im Vergleich zum *wt*-VDAC1 eine Abweichung der Positionen der einzelnen Aminosäuren auftrat, sind rot dargestellt. Die größte Abweichung wurde bei der negativ geladenen Aminosäure Glutamat 121 gemessen, die $19,6 \text{ \AA}$ von der RGS-Modifikation entfernt ist (schwarz gestrichelte Linie).

Die RGS-Modifikation liegt direkt vor der Pore des Proteins und deformiert einige in der Nähe befindliche Proteinabschnitte (**Abb. 5-15**, rot). Der deutlichste Positionsunterschied tritt bei der negativ geladenen Aminosäure Glutamat 121 auf, die zusammen mit anderen Aminosäuren einen die β -Faltblätter $\beta 7$ und $\beta 8$ verbindenden *loop* bildet. Die Auslenkung dieser Aminosäure entgegengesetzter Ladung durch die RGS-Modifikation beweist die Anwesenheit eines Transversalfeldes direkt vor der Pore des RGS-VDAC1. Ein Einfluss dieser drei Aminosäuren, vor allem des Arginins, auf das *gating* des Proteins erscheint daher plausibel. Das RGS-Motiv ist über kleine und ungeladene Aminosäuren wie Alanin, Valin und Prolin mit der N-terminalen α -Helix verbunden (vgl. Primärstruktur des RGS-VDAC1, **Abb. 4-43**), was diesem Bereich ein hohes Maß an Beweglichkeit

verleiht. Dadurch wird ein schneller Positionswechsel des RGS-Motivs ermöglicht, was die gefundenen hohen Übergangsraten k des *fast gatings* erklären könnte.

5.6.2 Kinetische Analyse des VDAC-gatings

Die kinetische Analyse des beim RGS-VDAC1 beobachteten *fast gatings* wurde mithilfe der Software QuB durchgeführt (Abschnitt 4.6.2). Aus einem Signal mit konstanter Basislinie erzeugt der Algorithmus der Software idealisierte Daten und berechnet anschließend aus den jeweiligen Verweildauern des Signals in einem bestimmten Zustand (*dwell times*) die Übergangsraten zwischen diesen Zuständen.^[129] Ein Ionenkanal kann über N kinetische Zustände verfügen, die sich in M unterschiedlichen Leitfähigkeiten in Signal manifestieren. Die Anzahl der kinetischen Zustände müssen dem Programm durch ein kinetisches Modell manuell vorgegeben werden, wobei berücksichtigt werden muss, wie viele unterschiedliche Zustände biophysikalisch überhaupt sinnvoll sind. So können im Falle $M \leq N$ nicht direkt aus den verschiedenen Leitfähigkeiten ersichtliche kinetische Zustände durch das Verfahren des *Hidden Markov Modeling* identifiziert werden.^[169] Das Maß für die Güte der Übereinstimmung zwischen den vorgegebenen Daten und dem erstellten kinetischen Modell wird als *logarithmic likelihood* (LL) bezeichnet, deren Betrag mit wachsender Übereinstimmung zwischen Datensatz und Modell zunimmt.

Bei der Analyse des *main gatings* wurden diverse kinetische Modelle für die Bestimmung der Ratenkonstanten verwendet. Ausgehend von einem Modell mit zwei kinetischen Zuständen (entsprechend dem offenen und dem geschlossenen Zustand des Proteins) wurden Modelle mit bis zu sechs kinetischen Zuständen für die Analyse benutzt und miteinander verglichen. Die maximale *logarithmic likelihood* wurde allerdings für *wt*-VDAC1, RGS-VDAC1 und V17C/A205C-VDAC1 jeweils bei vollkommen unterschiedlichen Modellen erhalten. Schon die Leitfähigkeit des offenen Zustands des VDAC1 ist lediglich ungefähr bestimmbar, da sie in 1 M Elektrolytlösung zwischen $G_o = 3,9\text{-}5,0$ nS schwankt.^[21] Eine genaue Leitfähigkeit des geschlossenen Zustands kann hingegen gar nicht angegeben werden, da in jedem Experiment mehrere unterschiedliche Werte mit abweichender Permeabilität und Selektivität beobachtet werden.^{[170],[171]} Auch in dieser Arbeit wurden in allen

Experimenten jeweils diverse Leitfähigkeiten detektiert, die insgesamt dem geschlossenen Zustand zugerechnet wurden (z. B. **Abb. 4-57**). Da lediglich ein qualitativer Vergleich zwischen den kinetischen Ratenkonstanten des Wechsels zwischen dem offenen und dem geschlossenen Zustand der unterschiedlichen VDAC1-Varianten angestrebt wurde und mehr als zwei Zustände demnach nicht plausibel zu erklären waren, wurde ein einfaches Modell mit zwei kinetischen Zuständen für die Analyse verwendet.

Um das *fast gating* mit dem *main gating* vergleichen zu können, wurde auch hier ein kinetisches Modell mit einem dem geschlossenen und einem dem offenen Protein entsprechenden kinetischen Zustand benutzt.

5.6.3 Hinweise in der Literatur auf ein *fast gating* des VDAC1

In fast allen Veröffentlichungen, die sich mit dem Thema der Spannungsabhängigkeit des VDAC1-*gatings* beschäftigen, wird das Augenmerk ausschließlich auf das *main gating* mit seiner typischen, langsamen Kinetik gelegt. Nur wenige Studien berichten ebenfalls von einem *gating* mit geringerer Amplitude und hoher Übergangsrate, welches dem in dieser Arbeit untersuchten *fast gating* des RGS-VDAC1 ähnelt. Moran *et al.* beobachteten bei Studien, in denen sie das Verhalten von äußeren Mitochondrienmembranen aus Rattengehirn mit dem von VDAC1, extrahiert aus Rattenleber, verglichen, mitunter solch ein *gating* hoher Frequenz.^[172] In dieser Arbeit wurde spekuliert, dass diese Art von *gating* wahrscheinlich bisher schlicht nicht zeitlich aufgelöst und detektiert werden konnte. Eine tiefergehende Analyse dieses *gatings* und einen darauf basierenden Erklärungsansatz liefert diese Arbeit nicht. Auch eine weitere Veröffentlichung, die elektrophysiologische Studien an VDAC1, extrahiert aus Rinderherz- und Rattenleberzellen, zum Thema hat, berichtet von ansonsten nicht beschriebenem *gating* mit hohen Übergangsraten.^[173] Die Autoren vermuteten, dass dieses *gating* aufgrund seiner komplexen Charakteristik bisher nicht theoretisch untersucht wurde. Weiterhin wurde über einen zweiten *fast gating*-Mechanismus spekuliert, der sich vom Mechanismus des *main gating* auf molekularer Ebene unterscheidet. Als mögliche Ursache führen die Autoren N-terminale *loops* des VDAC1 an, die sich

5. Diskussion

temporär, entweder intra- oder intermolekular, vor die Pore des Proteins setzen könnten. Eine kinetische Analyse oder eine weitere Untersuchung des *gatings* und der Proteinstruktur, die diese Vermutung bekräftigen könnte, wurde auch in diesem Fall nicht durchgeführt.

Diese Beispiele legen die Vermutung nahe, dass ein *fast gating* auch in anderen Studien beobachtet, aber nicht analysiert und beschrieben wurde. In einer aktuellen Arbeit, welche sich mit der Kinetik des *main gating*s beschäftigt, wurde sogar explizit darauf hingewiesen, dass geladene Modifikationen am N-Terminus (beispielsweise zur Aufreinigung des Proteins) vermieden wurden, da diese das *gating* des VDAC1 beeinträchtigten.^[174] Die vorliegende Arbeit beschreibt daher zum ersten Mal einen plausiblen Mechanismus, der das *fast gating* auf molekularer Ebene erklärt.

5.7 Beteiligung einer Bewegung der N-terminalen Helix am *main gating* des VDAC1

Eine Theorie, die das *main gating* des VDAC1 auf molekularer Ebene erklärt, befasst sich mit der Bewegung der N-terminalen α -Helix innerhalb der Pore.^[14] Um diese These zu belegen, wurden im *wild type*-VDAC1 zwei Cysteine, eines in der Helix, eines in der Wand der Pore, in günstiger räumlicher Nähe per Punktmutation eingeführt. Die so unter geeigneten Bedingungen in der V17C/A205C-VDAC-Mutante ausgebildete Disulfidbrücke sollte die Bewegung der Helix einschränken und hypothetisch einen Einfluss auf das *gating*-Verhalten haben (Abschnitt 4.7). Diese Mutante war aber genau wie das natürlich vorkommende *wild type*-Protein in der Lage, bei hohem Membranpotenzial in einen Zustand niedrigerer Leitfähigkeit zu wechseln.

In einer Studie, die sich mit derselben Fragestellung befasst, wurden zwei Cysteine in etwas abweichender Position eingeführt, aber auch bei dieser L10C/A170C-VDAC-Mutante wurde keine Veränderung des spannungabhängigen

main gating festgestellt.^[136] Aufgrund dieser Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, dass eine Bewegung der N-terminalen Helix innerhalb der Pore allein der Grund für das beobachtete *main gating* sein kann.

Andere Arbeiten spekulieren daher, dass die Spannungsabhängigkeit des VDAC1 mit einer Translokation der Helix aus dem β -barrel heraus einher geht,^[23] oder eine strukturelle Reaktion des gesamten β -barrels im Zuge der Leitfähigkeitsverminderung stattfindet.^[175] Da das VDAC1-barrel aus 19, und damit einer ungeraden Anzahl von einzelnen β -Faltblättern besteht, verlaufen zwei von ihnen (β -1 und β -19) parallel zueinander, was unter bekannten Ionenkanalstrukturen einmalig ist und eine wesentliche Destabilisierung des β -barrels zur Folge hat. Die α -Helix hätte demnach primär eine stabilisierende Funktion für den offenen, also maximal leitfähigen Zustand des Kanals.^[127]

5.8 Asymmetrie des VDAC1-gatings

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten elektrophysiologischen Experimente am VDAC1 wurde in einigen Messungen eine deutliche Asymmetrie im Verhalten des Proteins beobachtet. Bei den in Abschnitt 4.2.4 beschriebenen, auf nano-BLMs durchgeführten Experimenten konnte nur bei negativem Transmembranpotenzial eine Proteinaktivität detektiert werden und auch das bei der RGS-VDAC-Mutante beobachtete *fast gating* mit hohen Übergangsraten trat nur bei negativem Transmembranpotenzial auf. Letzteres wurde bei verschiedenen, durch das lösungsmittelfreie Spreiten von Lipidvesikeln hergestellten Membranpräparationen beobachtet (siehe Abschnitt 4.6.1).

Eine Frage, die sich aus der beobachteten Asymmetrie im Verhalten des VDAC1 auf Einzelkanalebene ergibt, stellt sich bezüglich der Orientierung einzelner Monomere innerhalb der postulierten Anordnung des VDAC1 in oligomeren Strukturen in der mitochondrialen Membran. Da die allgemein akzeptierte molekulare Struktur dieses Proteins nicht vollkommen symmetrisch ist, wäre eine Asymmetrie seiner Reaktion z. B. hinsichtlich unterschiedlicher Richtungen eines applizierten Potenzials denkbar.

5. Diskussion

In der Literatur wird dieser für das Verhalten von VDAC1-Oligomeren *in vivo* entscheidende Punkt kontrovers diskutiert. In verschiedenen elektrophysiologischen Studien wurde auch auf Multikanalebene eine Asymmetrie in der Reaktion mehrerer VDAC1-Moleküle auf Transmembranpotenziale unterschiedlichen Vorzeichens festgestellt.^{[19],[137],[176]} Versuche, die Orientierung der einzelnen Moleküle z. B. durch den Einsatz spezifischer Antikörper festzustellen, lieferten keine eindeutigen und teils widersprüchliche Ergebnisse.^[177-180] Andererseits wurde bei Untersuchungen an Proteinkristallen von VDAC1 festgestellt, dass eine antiparallele Anordnung einzelner Monomere in oligomeren Strukturen die energetisch stabilste Struktur darstellt.^[148]

5.8.1 Asymmetrie der Interaktion des proapoptischen Proteins tBid mit VDAC1

Bei den in Abschnitt 4.5 besprochenen Experimenten zum Einfluss des proapoptischen Proteins tBid auf den VDAC1 wurde nach Zugabe von tBid zu einer VDAC1-enhaltenden Membran in Übereinstimmung mit der Literatur eine Destabilisierung des offenen Zustands des Kanals festgestellt.^[124]

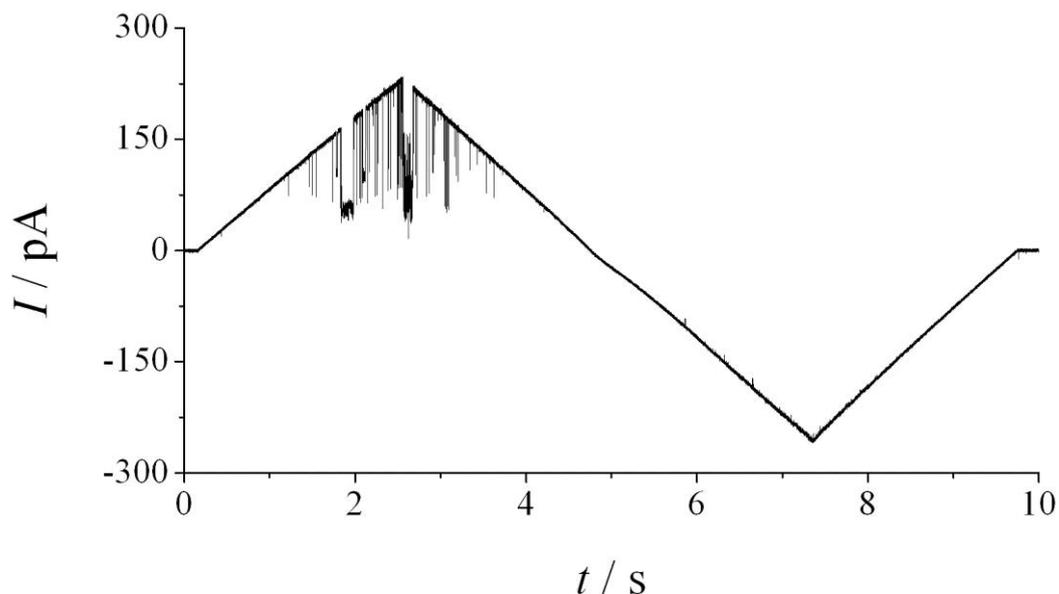


Abb. 5-16: Destabilisierung des offenen Zustands eines VDAC1 nach Zugabe des proapoptischen Proteins tBid ($c_{\text{tBid}} = 2,5 \mu\text{M}$). Dieses Phänomen trat nur bei erhöhtem Potential U_m positiven Vorzeichens auf, was einen Hinweis auf die Asymmetrie des

VDAC1-Moleküls gibt. Die Membran wurde durch das Spreiten von GUVs der Zusammensetzung DPhPC/Cholesterin 9:1 präpariert und in 1 M KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4 gemessen.

In dieser Membran, bestehend aus DPhPC und Cholesterin im Molverhältnis 9:1, befand sich genau ein einzelnes VDAC1-Molekül. Deutlich ist in **Abb. 5-16** zu erkennen, dass das Protein mit hoher Übergangsrate zwischen seinem offenen Zustand der Leitfähigkeit $G_o = 4,0$ nS und einem geschlossenen Zustand mit $G_c = 1,9$ nS wechselt. Dieses Phänomen wurde nur im Bereich erhöhten Potentials mit positivem Vorzeichen, nicht jedoch im Bereich mit anliegendem Transmembranpotential negativen Vorzeichens detektiert. Dieses Experiment wurde insgesamt dreimal an jeweils unterschiedlichen Membranpräparationen unter ansonsten identischen Bedingungen durchgeführt, wobei zweimal dieser Effekt beobachtet wurde. In der dritten Präparation war auch bei $c_{tBid} = 2,5$ μ M ein asymmetrisches Verhalten zu beobachten, hier wurde allerdings eine Destabilisierung des offenen Zustands bei erhöhtem Potential negativen Vorzeichens festgestellt (**Abb. 5-17**).

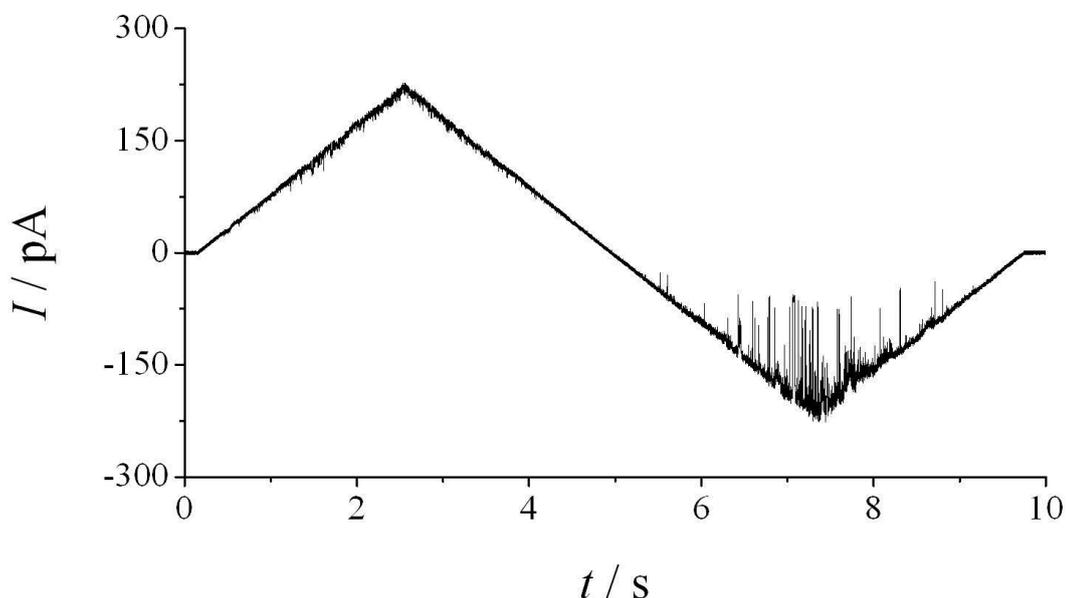


Abb. 5-17: Destabilisierung des offenen Zustands eines VDAC1 nach Zugabe des proapoptischen Proteins tBid ($c_{tBid} = 2,5$ μ M). Dieses Phänomen trat in diesem Fall nur bei erhöhtem Potential U_m negativen Vorzeichens auf. Die Membran wurde per Spreiten von GUVs der Zusammensetzung DPhPC/Cholesterin 9:1 präpariert und in 1 M KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4 gemessen.

5. Diskussion

Bei allen Experimenten wurde tBid jeweils zur selben Seite der Membranpräparation (*cis*-Seite des Aufbaus) gegeben. Es ist somit unwahrscheinlich, dass die beobachtete Asymmetrie vom tBid selbst hervorgerufen wurde. Würde tBid die Leitfähigkeit des VDAC1 verringern, indem es sich z. B. vor der Öffnung der Pore an das Protein bindet und so den Ionenfluss asymmetrisch beeinträchtigt, dürfte das in **Abb. 5-17** gezeigte Phänomen nicht auftreten.

Dieses Ergebnis unterstützt die Theorie, nach der tBid nicht direkt in Interaktion mit VDAC1 tritt, sondern einen indirekten Einfluss auf diesen Ionenkanal hat,^[181] indem es die Membrenumgebung in direkter Nähe zum VDAC1 moduliert.^[182]

5.9 Zinkabhängigkeit der Dermcidin-Aktivität

Die von einem Kooperationspartner (Prof. Zeth, MPIEB Tübingen) ermittelte Röntgenstruktur des antimikrobiellen Peptids Dermcidin (DCD) zeigt die Verbrückung von sechs α -helicalen DCD-Monomeren zu einem Hexamer über Zn^{2+} -Ionen (vgl. Abb. 1-18). Molekulardynamische Simulationen eines weiteren Kooperationspartners (Prof. de Groot, MPIBPC Göttingen) belegen, dass diese Struktur prinzipiell dazu geeignet ist, ein elektrisches bzw. elektrochemisches Potenzial an einer Lipidmembran abzubauen, indem es diese perforiert und damit eine antimikrobielle Wirkung erzielt (Abschnitt 1.5).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die physiologische Relevanz der vorgeschlagenen Struktur geklärt werden. Hierzu wurden elektrophysiologische Experimente unter zinkfreien Bedingungen sowie in Anwesenheit von Zn^{2+} -Ionen durchgeführt, um deren Einfluss auf die membranlysierende Aktivität dieses antimikrobiellen Peptids zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass DCD in Abwesenheit von Zinkionen nur eine schwach membranlysierende Wirkung besitzt (Abschnitt 4.8.1), während in Anwesenheit von Zn^{2+} in jedem Experiment eine Perforation der jeweiligen Membran beobachtet werden konnte (Abschnitt 4.8.2). Bei einem anliegenden

Transmembranpotenzial von $U_m = 100$ mV konnten weiterhin mitunter diskrete Stufen im Stromsignal detektiert werden, aus denen sich eine Leitfähigkeit des Dermcidins von $G_{DCD} = (81 \pm 14)$ pS in 1 M NaCl ergab, was nur geringfügig von der theoretisch auf Grundlage der Röntgenstruktur berechneten Leitfähigkeit von $G_{th} = (108 \pm 11)$ pS in 1 M NaCl abweicht. Durch weitere Experimente an einer H38A-DCD-Mutante mit modifizierter Zinkbindungsstelle oder in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen konnte schließlich die Zinkspezifität der Aktivität des DCDs bewiesen werden (Abschnitte 4.8.3 und 4.8.4).

In der Literatur findet sich in ersten Arbeiten zu diesem Peptid lediglich der Nachweis einer prinzipiell antibiotischen Wirkung des Dermcidins gegenüber Erregern wie *Escherichia coli* oder *Staphylococcus aureus*, während ein möglicher Mechanismus dieser Aktivität zunächst nicht betrachtet wurde.^[54] In weiterführenden Arbeiten wurde anhand von Experimenten an farbstoffgefüllten GUVs berichtet, dass DCD eine Lipidmembran nicht perforiert.^{[183],[184]} Diese Studien wurden allerdings ausschließlich in Phosphatpuffer oder HEPES-gepufferten einfachen Elektrolytlösungen durchgeführt, denen kein Zn^{2+} zugesetzt worden war. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde unter diesen Bedingungen nur eine sehr gering ausgeprägte membranlysierende Aktivität des DCDs festgestellt (*vide supra*).

Unter zinkhaltigen Bedingungen wurde hingegen eine explizit membranlysierende Aktivität festgestellt.^[44] Paulmann *et al.* spekulieren hier bereits über die Bildung von definierten Poren durch DCD, welche dann eine antimikrobielle Wirkung hervorrufen könnten. Durch CD-Experimente (Abschnitt 3.9) wurde auch hier von einer α -helicalen Struktur des DCDs bei Bindung an eine Membran berichtet und über die Ausbildung von DCD-Oligomeren unter Beteiligung von Zn^{2+} spekuliert. Weiterhin wurde mithilfe von *oriented circular dichroism* (OCD)-Experimenten^[185] festgestellt, dass die DCD-Helices sich auf der Membranoberfläche anreichern, was eine auch von anderen AMPs wie beispielsweise Magainin aus *Xenopus laevis* oder Cecropin aus *Hyalophora cecropia* bekannte Anordnung dieser Moleküle darstellt.^[186] Allerdings bleibt diese Veröffentlichung eine Struktur des aktiven AMPs und einen darauf basierenden genauen Mechanismus der antimikrobiellen Wirkung schuldig.

5. Diskussion

Zu diesem Thema durchgeführte Einzelkanalmessungen belegen zwar eine nachweisbare Aktivität des DCDs, die detektierten Sprünge im Stromsignal sind aber willkürlich verteilt und die für ein Transmembranpotenzial von $U_m = \pm 100$ mV angegebene Leitfähigkeit von $G_{DCD} = 20-30$ pS erscheint insgesamt zu gering für einen effektiven Abbau eines an der Membran vorhandenen Potenzials.^[187]

Während auch im Falle von Magaininen und Cecropinen lediglich ein Reißen der Membran detektiert und somit über einen genauen Mechanismus nur spekuliert werden kann,^{[50],[46]} konnte aufbauend auf bisherigen Ergebnissen mithilfe der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen elektrophysiologischen Ergebnisse sowie der Röntgenstruktur des DCDs und molekulardynamischen Studien zu ersten Mal ein detaillierter Mechanismus der Wirkungsweise eines AMPs entwickelt werden (Abb. 5-18).^[57]

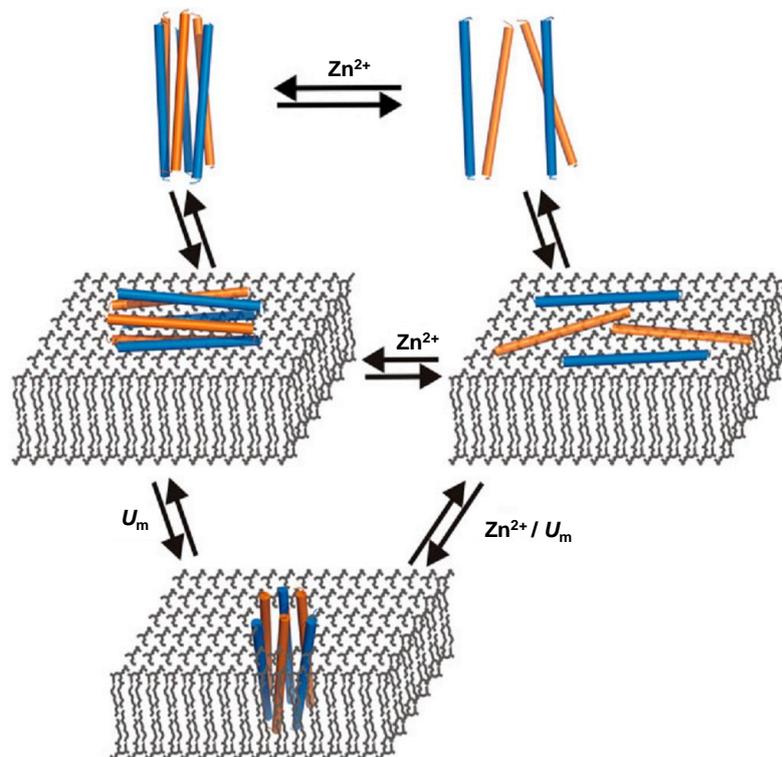


Abb. 5-18: Schematische Darstellung der Wirkungsweise des antimikrobiellen Peptids Dermcidin (DCD).^[57] Sowohl in Lösung (oben), als auch auf der Membranoberfläche (mitte) liegen DCD-Monomere im Gleichgewicht mit DCD-Hexameren vor, wobei letztere durch die Anwesenheit von Zn^{2+} -Ionen stabilisiert werden. Durch ein Transmembranpotenzial U_m kann ein Hexamer in die Membran eindringen und dort eine Pore nach dem *barrel-stave* Mechanismus ausbilden (unten).

Demnach bilden sich aus α -helicalen DCD-Monomeren zinkabhängig sowohl in Lösung, als auch senkrecht zur Membrannormalen auf ihr assoziierte DCD-Oligomere. NMR-spektroskopische Studien an mit ^{15}N markierten DCD Molekülen ^[188] zeigen, dass der Großteil der Monomere parallel zur Membranoberfläche an dieser assoziiert vorliegt,^[189] was im Einklang zu CD-spektroskopischen Studien steht.^[190] Erst die Anwesenheit eines Transmembranpotenzials U_m bewirkt eine Inkorporation einiger Hexamere in die Membran und damit einhergehend die Ausbildung von Poren nach dem *barrel-stave* Mechanismus (vgl. Abb. 1-17).^[191]

Eine Besonderheit bei der Ausbildung dieser funktionellen Poren stellt die ungewöhnliche Lage des DCD-Hexamers innerhalb der Membran dar. Extensive molekulardynamische Simulationen ergaben, dass ein DCD-Hexamer nicht senkrecht in der Membran sitzt, sondern sich zwischen der Proteinhauptachse und der Membrannormalen ein Winkel von ungefähr $\gamma = 30^\circ$ ergibt (Abb -2).^[57]

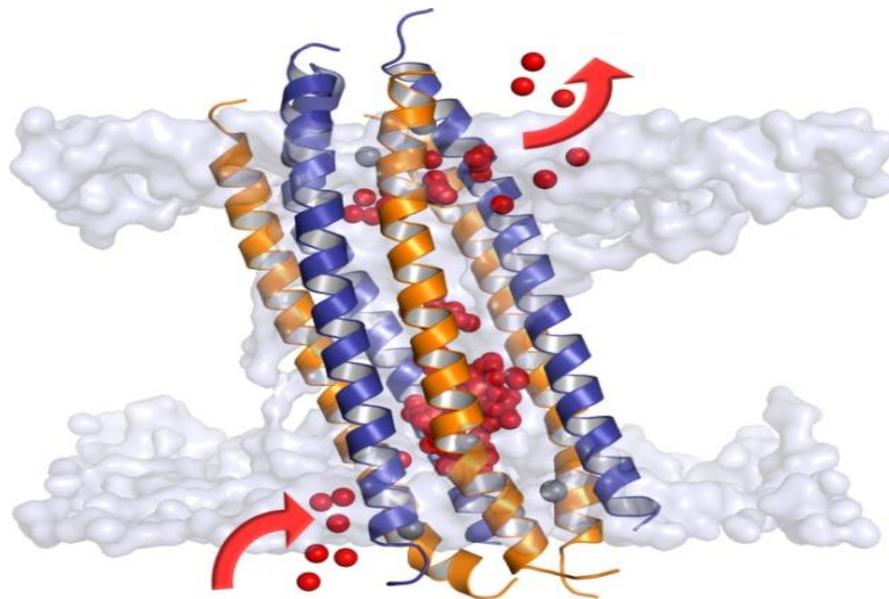


Abb. 5-19: Molekulardynamische Simulation der Lage eines DCD-Hexamers innerhalb einer Membran bestehend aus POPE/POPG (3:1).^[57] Das Hexamer sitzt nicht senkrecht in der Membran; zwischen der Proteinhauptachse und der Membrannormalen ergibt sich ein Winkel von ungefähr $\gamma = 30^\circ$. Ionen (rot) passieren die Pore auf ungewöhnliche Weise: über die polaren Lipidkopfgruppen vermittelt können sie durch Öffnungen an der Seite des Hexamers in dieses eindringen (rote Pfeile) und es schnell und effizient passieren.

5. Diskussion

Da ein DCD-Hexamer mit einer Länge von ca. $l = 8$ nm entlang seiner Hauptachse (siehe Abb. 1-18) deutlich zu lang für eine senkrechte Einlagerung in eine Lipidmembran mit einem Durchmesser von ungefähr $d = 5$ nm ist, erscheint diese Positionierung des Hexamers zur Reduktion eines *hydrophobic mismatch* (Abb. 1-20) plausibel. Eine weitere Konsequenz dieser speziellen Ausrichtung des Hexamers innerhalb der Membran ist ein vollkommen neuartiger und bisher noch nicht beschriebener Pfad, den Ionen durch die vom DCD gebildete Pore nehmen. Durch die leichte Neigung des gesamten Hexamers können Ionen - vermittelt durch die Kopfgruppen der umgebenden Lipide - durch Öffnungen in der Seitenwand des Kanals in dessen stark hydrophilen Innenraum gelangen (Abb. 5-19, rote Pfeile) und diesen daher besonders effektiv und schnell durchqueren.^[57] Dies würde die für einen Kanal dieser Dimension ungewöhnlich hohe Leitfähigkeit des DCDs erklären.

6 Zusammenfassung

6.1 Das mitochondriale Porin VDAC1

Die Isoform 1 des *voltage dependent anion channel* (VDAC1) ist das häufigste Protein der äußeren Mitochondrienmembran und gilt als entscheidender Mediator der mitochondrialen Atmung, welche den Austausch von Metaboliten wie ATP, ADP und NADH zwischen mitochondrialer Matrix und Zytosol umfasst. Dieser Ionenkanal wechselt in Abhängigkeit vom anliegenden Transmembranpotenzial U_m zwischen einem offenen Zustand hoher Leitfähigkeit bei niedrigem Potenzial ($U_m \leq 30$ mV) und einem geschlossenen Zustand mit halbiertes Leitfähigkeit bei hohem Potenzial, was einen Effekt auf fundamentale Prozesse in der Zelle hat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden elektrophysiologische Experimente am natürlich vorkommenden *wild type*-VDAC1 und zwei VDAC1-Mutanten durchgeführt, um ein tieferes Verständnis des Leitfähigkeitswechsels dieses Ionenkanals, des sogenannten *gatings*, zu erhalten. Von besonderer Bedeutung waren Experimente auf Einzelkanalebene, um, ausgehend von der bekannten Struktur des VDAC1, die molekularen Ursachen des *gatings* zu ergründen. Als Modellsystem dienten lösungsmittelfreie artifizielle Lipidmembranen, welche durch das Spreiten von proteinhaltigen Lipidvesikeln über einer Pore in einer Borsilikatfläche erzeugt wurden.

Auf Einzelkanalebene wurde in diesem Membransystem bei allen VDAC1-Varianten ein Wechsel zwischen einem offenen Hauptzustand der Leitfähigkeit $G_o = 4,0$ nS und einem geschlossenen Hauptzustand mit $G_c = 2,0$ nS in 1 M KCl detektiert. Die Öffnungswahrscheinlichkeit des VDAC1 nahm bei erhöhtem Potenzial positiven wie negativen Vorzeichens ab, allerdings lag ein einzelner Kanal auch bei $U_m \geq 30$ mV im Mittel zu über 90 % der Zeit im offenen Zustand vor.

6. Zusammenfassung

Eine VDAC1 Mutante mit den zusätzlich N-terminal eingefügten Aminosäuren Arginin (Einbuchstabencode R), Glycin (G) und Serin (S) zeigte neben dem bekannten Wechsel zwischen den Hauptzuständen (*main gating*) ein neuartiges, zusätzliches *gating*. Dieses für die RGS-VDAC1 Mutante charakteristische *fast gating* zeichnete sich durch eine geringere Leitfähigkeitsdifferenz von $\Delta G_{fg} = 0,5-1,2 \text{ nS}$ und wesentlich höhere Übergangsraten von $k_{fg} = 18-911 \text{ s}^{-1}$ zwischen den beteiligten Unterzuständen im Vergleich zu $k_{mg} = 0,1-2 \text{ s}^{-1}$ zwischen den Hauptzuständen aus. Eine kinetische Analyse ergab eine Spannungsabhängigkeit der Übergangsraten k dieses *fast gatings* in Form höherer Übergangsraten bei niedrigerem Potenzial. Die Anwesenheit eines vor allem durch die positive Ladung der zusätzlich eingefügten Aminosäure Arginin hervorgerufenen transversalen Felds vor der Pore des VDAC1 als mögliche Ursache des *fast gatings* konnte durch unterstützende NMR-spektroskopische Untersuchungen (Abteilung Prof. Griesinger, MPIBPC, Göttingen) nachgewiesen werden.

In einer zweiten Mutante wurde durch Punktmutationen eine Disulfidbrücke eingeführt, welche die Bewegung der in der Pore des VDAC1 liegenden α -Helix als mögliche Ursache des *main gatings* verhinderte. Eine elektrophysiologische Charakterisierung dieser V17C/A205C-VDAC1-Mutante ergab allerdings, dass dieses Protein genau wie der *wild type*-VDAC1 spannungsabhängig mit Übergangsraten von $k = 0,1-2 \text{ s}^{-1}$ bei hohem Potenzial vom offenen in den geschlossenen Hauptzustand des VDAC1-Proteins wechselte.

Die bisher in der Literatur diskutierte Bewegung der α -Helix innerhalb der VDAC1-Pore als alleinige molekulare Grundlage des *main gatings* kann somit ausgeschlossen werden. Für alle VDAC1-Varianten wurde auf Einzelkanalebene eine Spannungsabhängigkeit der Öffnungswahrscheinlichkeit ermittelt, die im Vergleich zu der bisher ausschließlich an VDAC1-Oligomeren oder Fragmenten der äußeren Mitochondrienmembran beobachteten sehr gering ausfällt. Dieses Ergebnis belegt einen prinzipiellen Unterschied der elektrophysiologischen Proteincharakteristika auf Einzel- und Multikanalebene.

Im Hinblick auf eine Automatisierung der elektrophysiologischen Experimente an diesem Protein wurde im Rahmen dieser Arbeit weiterhin der Beweis erbracht, dass VDAC1 prinzipiell in porenüberspannende Membranen auf porösen Aluminaten rekonstituiert werden kann.

6.2 Das antimikrobielle Peptid Dermcidin

Das Peptid Dermcidin (DCD) weist eine antimikrobielle Wirkung auf, die in der Perforation ansonsten stabiler Lipidmembranen und dem damit verbundenen Zusammenbruch eines kontrollierten Stoffaustauschs über die Membran besteht. Die von einem Kooperationspartner (Abteilung Prof. Zeth, MPIEB, Tübingen) ermittelte Röntgenstruktur dieses hochpotenten antimikrobiellen Peptids zeigt die Stabilisierung mehrerer Untereinheiten zu einem funktionalen DCD-Hexamer durch Zinkionen. Auf dieser Struktur basierende molekulardynamische Simulationen (Abteilung Prof. de Groot, MPIBPC, Göttingen) zeigen, dass dieses Hexamer ohne die Beteiligung von Zn^{2+} instabil ist und keine membranperforierende Aktivität besitzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mithilfe elektrophysiologischer Experimente die Frage beantwortet, welchen Einfluss Zinkionen auf die Aktivität von DCD besitzen. Hierzu wurden lösungsmittelfreie Membranen durch das Spreiten von Lipidvesikeln über einer Pore in einer Borsilikatfläche erzeugt und diese anschließend mit DCD inkubiert.

Unter zinkfreien Bedingungen wurde eine sehr geringe und unspezifische Aktivität von DCD festgestellt, während in Anwesenheit von 2 mM Zn^{2+} eine membranperforierende Wirkung des DCD beobachtet wurde. In einigen Messungen konnte zusätzlich Proteinaktivität in Form diskreter Stufen in den aufgezeichneten Stromsignalen detektiert werden. Die hieraus berechnete Leitfähigkeit eines DCD-Kanals von $G = (81 \pm 14)$ pS in 1 M NaCl lag in der Größenordnung der anhand molekulardynamischer Simulationen errechneten Leitfähigkeit des Hexamers von $G_{th} = (108 \pm 11)$ pS in 1 M NaCl.

6. Zusammenfassung

Wurden die Zinkionen unter ansonsten identischen Versuchsbedingungen gegen Magnesiumionen ausgetauscht, konnte ebenfalls keine Proteinaktivität festgestellt werden. Als zusätzlicher Beweis der Zinkabhängigkeit der DCD-Aktivität wurde weiterhin eine DCD Mutante untersucht, bei der eine entscheidende Zinkbindungsstelle durch eine Punktmutation deaktiviert wurde. Diese H38A-DCD Mutante zeigte auch in Anwesenheit von 2 mM Zn^{2+} keine membranperforierende Aktivität.

Insgesamt konnte der Beweis einer Zinkspezifität der Aktivität des antimikrobiellen Peptids DCD erbracht werden, was die physiologische Relevanz der ermittelten Röntgenstruktur belegt.

7 Literaturverzeichnis

- [1] S. W. Chiu, M. Clark, V. Balaji, S. Subramaniam, H. L. Scott, E. Jakobsson, Incorporation of surface tension into molecular dynamics simulation of an interface: a fluid phase lipid bilayer membrane, *Biophys. J.* **1995**, *69*, 1230–1245.
- [2] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, **2008**.
- [3] T. H. Ji, M. Grossmann, I. Ji, G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 17299–17302.
- [4] F. Bezanilla, Voltage-gated ion channels, *IEEE Trans. Nanobioscience* **2005**, *4*, 34–48.
- [5] S. D. Dyall, M. T. Brown, P. J. Johnson, Ancient invasions: from endosymbionts to organelles, *Science* **2004**, *304*, 253–257.
- [6] S. Jarosławski, K. Duquesne, J. N. Sturgis, S. Scheuring, High-resolution architecture of the outer membrane of the Gram-negative bacteria *Roseobacter denitrificans*, *Mol. Microbiol.* **2009**, *74*, 1211–1222.
- [7] H. Nikaido, M. Vaara, Molecular basis of bacterial outer membrane permeability, *Microbiol. Rev.* **1985**, *49*, 1–32.
- [8] D. Balasubramaniam, A. Arockiasamy, P. D. Kumar, A. Sharma, S. Krishnaswamy, Asymmetric pore occupancy in crystal structure of OmpF porin from *Salmonella typhi*, *J. Struct. Biol.* **2012**, *178*, 233–244.
- [9] C. Danelon, A. Suenaga, M. Winterhalter, I. Yamato, Molecular origin of the cation selectivity in OmpF porin: single channel conductances vs. free energy calculation, *Biophys. Chem.* **2003**, *104*, 591–603.
- [10] G. E. Schulz, The structure of bacterial outer membrane proteins, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1565*, 308–317.
- [11] E. K. Schmitt, M. Vroenenraets, C. Steinem, Channel Activity of OmpF Monitored in Nano-BLMs, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 2163–2171.

7. Literaturverzeichnis

- [12] M. Bayrhuber, T. Meins, M. Habeck, S. Becker, K. Giller, S. Villinger, C. Vonrhein, C. Griesinger, M. Zweckstetter, K. Zeth, Structure of the human voltage-dependent anion channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 15370–15375.
- [13] J. Song, M. Colombini, Indications of a common folding pattern for VDAC channels from all sources, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1996**, *28*, 153–161.
- [14] R. Ujwal, D. Cascio, J.-P. Colletier, S. Faham, J. Zhang, L. Toro, P. Ping, J. Abramson, The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 17742–17747.
- [15] S. Hiller, R. G. Garces, T. J. Malia, V. Y. Orekhov, M. Colombini, G. Wagner, Solution Structure of the Integral Human Membrane Protein VDAC-1 in Detergent Micelles, *Science* **2008**, *321*, 1206–1210.
- [16] K. Zeth, M. Thein, Porins in prokaryotes and eukaryotes: common themes and variations, *Biochem. J.* **2010**, *431*, 13–22.
- [17] S. J. Schein, M. Colombini, A. Finkelstein, Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria, *J. Membr. Biol.* **1976**, *30*, 99–120.
- [18] M. Colombini, C. A. Mannella, VDAC, The early days, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1818*, 1438–1443.
- [19] C. M. M. Carneiro, P. G. Merzlyak, L. N. Yuldasheva, L. G. Silva, F. P. Thinnes, O. V. Krasilnikov, Probing the volume changes during voltage gating of Porin 31BM channel with nonelectrolyte polymers, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1612*, 144–153.
- [20] B. Shanmugavadivu, H.-J. Apell, T. Meins, K. Zeth, J. H. Kleinschmidt, Correct Folding of the β -Barrel of the Human Membrane Protein VDAC Requires a Lipid Bilayer, *J. Mol. Biol.* **2007**, *368*, 66–78.
- [21] M. Colombini, Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC, *J. Membr. Biol.* **1989**, *111*, 103–111.
- [22] M. Colombini, Measurement of VDAC permeability in intact mitochondria and in reconstituted systems, *Methods Cell Biol.* **2007**, *80*, 241–260.

-
- [23] S. Geula, D. Ben-Hail, V. Shoshan-Barmatz, Structure-based analysis of VDAC1: N-terminus location, translocation, channel gating and association with anti-apoptotic proteins, *Biochem. J.* **2012**, *444*, 475–485.
- [24] M. Colombini, E. Blachly-Dyson, M. Forte, VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane, *Ion Channels* **1996**, *4*, 169–202.
- [25] E. Blachly-Dyson, S. Peng, M. Colombini, M. Forte, Selectivity changes in site-directed mutants of the VDAC ion channel: structural implications, *Science* **1990**, *247*, 1233–1236.
- [26] V. Shoshan-Barmatz, D. Mizrahi, VDAC1: from structure to cancer therapy, *Front Oncol* **2012**, *2*, 164.
- [27] V. Shoshan-Barmatz, V. de Pinto, M. Zweckstetter, Z. Raviv, N. Keinan, N. Arbel, VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death, *Mol. Aspects Med.* **2010**, *31*, 227–285.
- [28] H. Zaid, S. Abu-Hamad, A. Israelson, I. Nathan, V. Shoshan-Barmatz, The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death, *Cell Death Differ.* **2005**, *12*, 751–760.
- [29] A. Godbole, J. Varghese, A. Sarin, M. K. Mathew, VDAC is a conserved element of death pathways in plant and animal systems, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1642*, 87–96.
- [30] S. Abu-Hamad, S. Sivan, V. Shoshan-Barmatz, The expression level of the voltage-dependent anion channel controls life and death of the cell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 5787–5792.
- [31] V. Shoshan-Barmatz, D. Ben-Hail, VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target, *Mitochondrion* **2012**, *12*, 24–34.
- [32] Y. Tsujimoto, T. Nakagawa, S. Shimizu, Mitochondrial membrane permeability transition and cell death, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1757*, 1297–1300.
- [33] C. P. Baines, C. P. Baines, The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2009**, *46*, 850–857.
- [34] N. Keinan, D. Tyomkin, V. Shoshan-Barmatz, Oligomerization of the mitochondrial protein voltage-dependent anion channel is coupled to the induction of apoptosis, *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30*, 5698–5709.
-

7. Literaturverzeichnis

- [35] W. Tan, M. Colombini, VDAC closure increases calcium ion flux, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 2510–2515.
- [36] K. W. Kinnally, P. M. Peixoto, S.-Y. Ryu, L. M. Dejean, Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both?, *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1813*, 616–622.
- [37] M. H. Harris, C. B. Thompson, The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability, *Cell Death Differ.* **2000**, *7*, 1182–1191.
- [38] M. G. Vander Heiden, X. X. Li, E. Gottlieb, R. B. Hill, C. B. Thompson, M. Colombini, Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 19414–19419.
- [39] J. C. Lai, W. Tan, L. Benimetskaya, P. Miller, M. Colombini, C. A. Stein, A pharmacologic target of G3139 in melanoma cells may be the mitochondrial VDAC, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 7494–7499.
- [40] W. Tan, Y.-H. Loke, C. A. Stein, P. Miller, M. Colombini, Phosphorothioate oligonucleotides block the VDAC channel, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 1184–1191.
- [41] W. Tan, J. C. Lai, P. Miller, C. A. Stein, M. Colombini, Phosphorothioate oligonucleotides reduce mitochondrial outer membrane permeability to ADP, *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **2007**, *292*, C1388-97.
- [42] D. Hanahan, R. A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
- [43] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature* **2002**, *415*, 389–395.
- [44] M. Paulmann, T. Arnold, D. Linke, S. Özdirekcan, A. Kopp, T. Gutschmann, H. Kalbacher, I. Wanke, V. J. Schuenemann, M. Habeck et al., Structure-activity analysis of the dermcidin-derived peptide DCD-1L, an anionic antimicrobial peptide present in human sweat, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 8434–8443.
- [45] K. Bush, P. Courvalin, G. Dantas, J. Davies, B. Eisenstein, P. Huovinen, G. A. Jacoby, R. Kishony, B. N. Kreiswirth, E. Kutter et al., Tackling antibiotic resistance, *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 894–896.
-

-
- [46] C. D. Fjell, J. A. Hiss, R. E. W. Hancock, G. Schneider, Designing antimicrobial peptides: form follows function, *Nat Rev Drug Discov* **2012**, *11*, 37–51.
- [47] R. E. W. Hancock, H.-G. Sahl, Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1551–1557.
- [48] A. Arouri, M. Dathe, A. Blume, Peptide induced demixing in PG/PE lipid mixtures: a mechanism for the specificity of antimicrobial peptides towards bacterial membranes?, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 650–659.
- [49] K. Matsuzaki, Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1462*, 1–10.
- [50] K. A. Brogden, Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 238–250.
- [51] C. Landon, H. Meudal, N. Boulanger, P. Bulet, F. Vovelle, Solution structures of stomoxyn and spinigerin, two insect antimicrobial peptides with an alpha-helical conformation, *Biopolymers* **2006**, *81*, 92–103.
- [52] Z. Oren, Y. Shai, Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides, *Biopolymers* **1998**, *47*, 451–463.
- [53] R. Gläser, J. Harder, H. Lange, J. Bartels, E. Christophers, J.-M. Schröder, Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection, *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 57–64.
- [54] B. Schittek, R. Hipfel, B. Sauer, J. Bauer, H. Kalbacher, S. Stevanovic, M. Schirle, K. Schroeder, N. Blin, F. Meier et al., Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands, *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 1133–1137.
- [55] K. A. Brogden, A. J. de Lucca, J. Bland, S. Elliott, Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 412–416.
- [56] A. Eissa, V. Amodeo, C. R. Smith, E. P. Diamandis, Kallikrein-related peptidase-8 (KLK8) is an active serine protease in human epidermis and sweat and is involved in a skin barrier proteolytic cascade, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 687–706.
-

7. Literaturverzeichnis

- [57] C. Song, C. Weichbrodt, E. S Salnikov, M. Dynowski, B. O Forsberg, B. Bechinger, C. Steinem, B. L. de Groot, U. Zachariae, K. Zeth et al., Crystal structure and functional mechanism of a human antimicrobial membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 4586–4591.
- [58] A. L. Hopkins, C. R. Groom, Opinion: The druggable genome, *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1*, 727–730.
- [59] Y. Zhao, W. Zhang, Y. Kho, Y. Zhao, Proteomic Analysis of Integral Plasma Membrane Proteins, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1817–1823.
- [60] J. U. Bowie, Solving the membrane protein folding problem, *Nature* **2005**, *438*, 581–589.
- [61] D. M. Engelman, Membranes are more mosaic than fluid, *Nature* **2005**, *438*, 578–580.
- [62] R. Phillips, T. Ursell, P. Wiggins, P. Sens, Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function, *Nature* **2009**, *459*, 379–385.
- [63] O. S. Andersen, R. E. Koeppe, Bilayer Thickness and Membrane Protein Function: An Energetic Perspective, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2007**, *36*, 107–130.
- [64] P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Wescott, Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution, *J. Phys. Chem.* **1963**, *67*, 534–535.
- [65] O. Gaßmann, *Dissertation*, Georg-August-Universität, Göttingen, **2010**.
- [66] J. P. Dilger, The thickness of monoolein lipid bilayers as determined from reflectance measurements, *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *645*, 357–363.
- [67] I. Mey, M. Stephan, E. K. Schmitt, M. M. Müller, M. Ben Amar, C. Steinem, A. Janshoff, Local membrane mechanics of pore-spanning bilayers, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7031–7039.
- [68] M. Kocun, T. D. Lazzara, C. Steinem, A. Janshoff, Preparation of solvent-free, pore-spanning lipid bilayers: modeling the low tension of plasma membranes, *Langmuir* **2011**, *27*, 7672–7680.
- [69] A. M. Seddon, P. Curnow, P. J. Booth, Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1666*, 105–117.

-
- [70] M. Montal, P. Mueller, Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1972**, *69*, 3561–3566.
- [71] D. D. Lasic, The mechanism of vesicle formation, *Biochem. J.* **1988**, *256*, 1–11.
- [72] L. Saunders, J. Perrin, D. Gammack, Ultrasonic irradiation of some phospholipid sols, *J. Pharm. Pharmacol.* **1962**, *14*, 567–572.
- [73] R. C. MacDonald, R. I. MacDonald, B. P. Menco, K. Takeshita, N. K. Subbarao, L. R. Hu, Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1061*, 297–303.
- [74] M. I. Angelova, D. S. Dimitrov, Liposome electroformation, *Faraday Discuss. Chem. Soc* **1986**, *81*, 303.
- [75] N. Kahya, Protein-protein and protein-lipid interactions in domain-assembly: lessons from giant unilamellar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 1392–1398.
- [76] W. Römer, C. Steinem, Impedance analysis and single-channel recordings on nano-black lipid membranes based on porous alumina, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 955–965.
- [77] S. Tristram-Nagle, D. J. Kim, N. Akhuzada, N. Kucerka, J. C. Mathai, J. Katsaras, M. Zeidel, J. F. Nagle, Structure and water permeability of fully hydrated diphytanoylPC, *Chem. Phys. Lipids* **2010**, *163*, 630–637.
- [78] H. Lindsey, N. O. Petersen, S. I. Chan, Physicochemical characterization of 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in model membrane systems, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *555*, 147–167.
- [79] C. H. Hsieh, S. C. Sue, P. C. Lyu, W. G. Wu, Membrane packing geometry of diphytanoylphosphatidylcholine is highly sensitive to hydration: phospholipid polymorphism induced by molecular rearrangement in the headgroup region, *Biophys. J.* **1997**, *73*, 870–877.
- [80] B. Schuster, S. Weigert, D. Pum, M. Sára, U. B. Sleytr, New Method for Generating Tetraether Lipid Membranes on Porous Supports, *Langmuir* **2003**, *19*, 2392–2397.
- [81] E. K. Schmitt, *Dissertation*, Georg-August-Universität, Göttingen, **2009**.
-

7. Literaturverzeichnis

- [82] Z. V. Leonenko, E. Finot, H. Ma, T. E. S. Dahms, D. T. Cramb, Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 3783–3793.
- [83] X. Liang, G. Mao, K. Y. S. Ng, Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy, *J Colloid Interface Sci* **2004**, *278*, 53–62.
- [84] O. Jessensky, F. Müller, U. Gösele, Self-organized formation of hexagonal pore arrays in anodic alumina, *Appl. Phys. Lett.* **1998**, *72*, 1173.
- [85] H. Masuda, K. Fukuda, Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina, *Science* **1995**, *268*, 1466–1468.
- [86] K. Nielsch, J. Choi, K. Schwirn, R. B. Wehrspohn, U. Gösele, Self-ordering Regimes of Porous Alumina: The 10 Porosity Rule, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 677–680.
- [87] F. Li, L. Zhang, R. M. Metzger, On the Growth of Highly Ordered Pores in Anodized Aluminum Oxide, *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 2470–2480.
- [88] V. P. Parkhutik, V. I. Shershulsky, Theoretical modelling of porous oxide growth on aluminium, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **1992**, *25*, 1258–1263.
- [89] C. Carnarius, *Dissertation*, Georg-August-Universität, Göttingen, **2012**.
- [90] F. Keller, M. S. Hunter, D. L. Robinson, Structural Features of Oxide Coatings on Aluminum, *J. Electrochem. Soc.* **1953**, *100*, 411.
- [91] A. P. Li, F. Müller, A. Birner, K. Nielsch, U. Gösele, Hexagonal pore arrays with a 50–420 nm interpore distance formed by self-organization in anodic alumina, *J. Appl. Phys.* **1998**, *84*, 6023.
- [92] K. Raiber, A. Terfort, C. Benndorf, N. Krings, H. Strehblow, Removal of self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold by plasma cleaning, *Surf Sci* **2005**, *595*, 56–63.
- [93] H. Ron, S. Matlis, I. Rubinstein, Self-Assembled Monolayers on Oxidized Metals. 2. Gold Surface Oxidative Pretreatment, Monolayer Properties, and Depression Formation, *Langmuir* **1998**, *14*, 1116–1121.

-
- [94] E. K. Schmitt, M. Nurnabi, R. J. Bushby, C. Steinem, Electrically insulating pore-suspending membranes on highly ordered porous alumina obtained from vesicle spreading, *Soft Matter* **2008**, *4*, 250.
- [95] H. G. Coster, J. R. Smith, The molecular organisation of bimolecular lipid membranes. A study of the low frequency Maxwell-Wagner impedance dispersion, *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *373*, 151–164.
- [96] S. Ringer, A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart, *J. Physiol. (Lond.)* **1883**, *4*, 29-42.3.
- [97] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *J. Physiol. (Lond.)* **1952**, *117*, 500–544.
- [98] J. M. Berg, L. Stryer, J. L. Tymoczko, *Biochemie*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, **2007**.
- [99] C. Fernández, K. Wüthrich, NMR solution structure determination of membrane proteins reconstituted in detergent micelles, *FEBS Lett.* **2003**, *555*, 144–150.
- [100] T. Raschle, S. Hiller, T.-Y. Yu, A. J. Rice, T. Walz, G. Wagner, Structural and functional characterization of the integral membrane protein VDAC-1 in lipid bilayer nanodiscs, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17777–17779.
- [101] C. Schmidt, M. Mayer, H. Vogel, A Chip-Based Biosensor for the Functional Analysis of Single Ion Channels, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3267–3270.
- [102] A. Brüggemann, M. George, M. Klau, M. Beckler, J. Steindl, J. C. Behrends, N. Fertig, High quality ion channel analysis on a chip with the NPC technology, *Assay Drug Dev Technol* **2003**, *1*, 665–673.
- [103] A. M. Feltham, M. Spiro, Platinized platinum electrodes, *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 177–193.
- [104] L. Whitmore, B. A. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases, *Biopolymers* **2008**, *89*, 392–400.
- [105] G. Snatzke, Chiroptische Methoden in der Stereochemie, Teil I, *Chem. Unserer Zeit* **1981**, *15*, 78–87.
-

7. Literaturverzeichnis

- [106] N. Greenfield, G. D. Fasman, Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation, *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108–4116.
- [107] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1751*, 119–139.
- [108] H. Engelhardt, T. Meins, M. Poynor, V. Adams, S. Nussberger, W. Welte, K. Zeth, High-Level Expression, Refolding and Probing the Natural Fold of the Human Voltage-Dependent Anion Channel Isoforms I and II, *J. Membr. Biol.* **2007**, *216*, 93–105.
- [109] N. Sreerama, S. Y. Venyaminov, R. W. Woody, Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 370–380.
- [110] L. Whitmore, B. A. Wallace, DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W668-73.
- [111] E. K. Schmitt, C. Weichbrodt, C. Steinem, Impedance analysis of gramicidin D in pore-suspending membranes, *Soft Matter* **2009**, *5*, 3347.
- [112] A. T. A. Jenkins, R. J. Bushby, N. Boden, S. D. Evans, P. F. Knowles, Q. Liu, R. E. Miles, S. D. Ogier, Ion-Selective Lipid Bilayers Tethered to Microcontact Printed Self-Assembled Monolayers Containing Cholesterol Derivatives, *Langmuir* **1998**, *14*, 4675–4678.
- [113] W. G. Scaife, The relative permittivity of the n alkanes from n pentane to n decane as a function of pressure and temperature, *J. Phys. A: Gen. Phys.* **1972**, *5*, 897–903.
- [114] R. Benz, O. Fröhlich, P. Läger, M. Montal, Electrical capacity of black lipid films and of lipid bilayers made from monolayers, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *394*, 323–334.
- [115] D. David Colquhoun in: Ogden (Ed.) *Microelectrode techniques. The Plymouth Workshop handbook*. Chapter 6: Practical analysis of single channel records, Company of Biologists, Cambridge, **1994**.
- [116] D. Freedman, P. Diaconis, On the histogram as a density estimator: L² theory, *Z. Wahrscheinlichkeitstheorie verw. Gebiete* **1981**, *57*, 453–476.
- [117] S. W. Provencher, A Fourier method for the analysis of exponential decay curves, *Biophys. J.* **1976**, *16*, 27–41.
-

-
- [118] T. K. Rostovtseva, S. M. Bezrukov, VDAC inhibition by tubulin and its physiological implications, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1818*, 1526–1535.
- [119] A. Dominguez, A. Fernandez, N. Gonzalez, E. Iglesias, L. Montenegro, Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques, *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 1227.
- [120] K. W. Herrmann, Non-Ionic--Cationic Micellar Properties of Dimethyldoecylamine Oxide, *J. Phys. Chem.* **1962**, *66*, 295–300.
- [121] M. C. Wei, T. Lindsten, V. K. Mootha, S. Weiler, A. Gross, M. Ashiya, C. B. Thompson, S. J. Korsmeyer, tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c, *Genes Dev.* **2000**, *14*, 2060–2071.
- [122] R. Eskes, S. Desagher, B. Antonsson, J. C. Martinou, Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 929–935.
- [123] S. J. Korsmeyer, M. C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K. J. Oh, P. H. Schlesinger, Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c, *Cell Death Differ.* **2000**, *7*, 1166–1173.
- [124] T. K. Rostovtseva, B. Antonsson, M. Suzuki, R. J. Youle, M. Colombini, S. M. Bezrukov, Bid, but not Bax, regulates VDAC channels, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13575–13583.
- [125] G. Kudla, S. Montessuit, R. Eskes, C. Berrier, J. C. Martinou, A. Ghazi, B. Antonsson, The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 22713–22718.
- [126] L. Yan, Q. Miao, Y. Sun, F. Yang, tBid forms a pore in the liposome membrane, *FEBS Lett.* **2003**, *555*, 545–550.
- [127] U. Zachariae, R. Schneider, R. Briones, Z. Gattin, J.-P. Demers, K. Giller, E. Maier, M. Zweckstetter, C. Griesinger, S. Becker et al., β -Barrel Mobility Underlies Closure of the Voltage-Dependent Anion Channel, *Structure* **2012**, *20*, 1540–1549.
-

7. Literaturverzeichnis

- [128] B.-H. Juang, L. Rabiner, The segmental K-means algorithm for estimating parameters of hidden Markov models, *IEEE Trans Acoust* **1990**, *38*, 1639–1641.
- [129] F. Qin, A. Auerbach, F. Sachs, Estimating single-channel kinetic parameters from idealized patch-clamp data containing missed events, *Biophys. J.* **1996**, *70*, 264–280.
- [130] K. Murzyn, T. Róg, M. Pasenkiewicz-Gierula, Phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 1091–1103.
- [131] *CRC handbook of chemistry and physics. A ready-reference book of chemical and physical data : 2006-2007*, CRC Press, Boca Raton, **op. 2006**.
- [132] E.-I. Ochiai, Uniqueness of zinc as a bioelement: Principles and applications in bioinorganic chemistry III, *J. Chem. Educ.* **1988**, *65*, 943.
- [133] C. Steinem, A. Janshoff, Modellmembranen auf Oberflächen. Verankert und doch mobil, *Chem. Unserer Zeit* **2008**, *42*, 116–127.
- [134] T. D. Lazzara, C. Carnarius, M. Kocun, A. Janshoff, C. Steinem, Separating attoliter-sized compartments using fluid pore-spanning lipid bilayers, *ACS Nano* **2011**, *5*, 6935–6944.
- [135] E. M. Nestorovich, C. Danelon, M. Winterhalter, S. M. Bezrukov, Designed to penetrate: time-resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 9789–9794.
- [136] O. Tejjido, R. Ujwal, C.-O. Hillerdal, L. Kullman, T. K. Rostovtseva, J. Abramson, Affixing N-terminal α -helix to the wall of the voltage-dependent anion channel does not prevent its voltage gating, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 11437–11445.
- [137] M. T. Eddy, T.-C. Ong, L. Clark, O. Tejjido, P. C. A. van der Wel, R. Garces, G. Wagner, T. K. Rostovtseva, R. G. Griffin, Lipid Dynamics and Protein-Lipid Interactions in 2D Crystals Formed with the β -Barrel Integral Membrane Protein VDAC1, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6375–6387.
- [138] U. R. Wunder, M. Colombini, Patch clamping VDAC in liposomes containing whole mitochondrial membranes, *J. Membr. Biol.* **1991**, *123*, 83–91.

-
- [139] M. Zizi, C. Byrd, R. Boxus, M. Colombini, The voltage-gating process of the voltage-dependent anion channel is sensitive to ion flow, *Biophys. J.* **1998**, *75*, 704–713.
- [140] M. Falcke, Reading the patterns in living cells - the physics of Ca²⁺ signaling, *Adv. Phys.* **2004**, *53*, 255–440.
- [141] V. Sourjik, H. C. Berg, Functional interactions between receptors in bacterial chemotaxis, *Nature* **2004**, *428*, 437–441.
- [142] T. Kiss, K. Nagy, Interaction between sodium channels in mouse neuroblastoma cells, *Eur. Biophys. J.* **1985**, *12*, 13–18.
- [143] A. I. Undrovinas, I. A. Fleidervish, J. C. Makielski, Inward sodium current at resting potentials in single cardiac myocytes induced by the ischemic metabolite lysophosphatidylcholine, *Circ. Res.* **1992**, *71*, 1231–1241.
- [144] B. Naundorf, F. Wolf, M. Volgushev, Unique features of action potential initiation in cortical neurons, *Nature* **2006**, *440*, 1060–1063.
- [145] M. F. Navedo, E. P. Cheng, C. Yuan, S. Votaw, J. D. Molkenin, J. D. Scott, L. F. Santana, Increased coupled gating of L-type Ca²⁺ channels during hypertension and Timothy syndrome, *Circ. Res.* **2010**, *106*, 748–756.
- [146] J. P. Dekker, G. Yellen, Cooperative gating between single HCN pacemaker channels, *J. Gen. Physiol.* **2006**, *128*, 561–567.
- [147] T. K. Rostovtseva, N. Kazemi, M. Weinrich, S. M. Bezrukov, Voltage Gating of VDAC Is Regulated by Nonlamellar Lipids of Mitochondrial Membranes, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 37496–37506.
- [148] R. Ujwal, D. Cascio, V. Chaptal, P. Ping, J. Abramson, Crystal packing analysis of murine VDAC1 crystals in a lipidic environment reveals novel insights on oligomerization and orientation, *Channels (Austin)* **2009**, *3*, 167–170.
- [149] T. Ursell, K. C. Huang, E. Peterson, R. Phillips, Cooperative gating and spatial organization of membrane proteins through elastic interactions, *PLoS Comput. Biol.* **2007**, *3*, e81.
- [150] P. Sens, L. Johannes, P. Bassereau, Biophysical approaches to protein-induced membrane deformations in trafficking, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, *20*, 476–482.
-

7. Literaturverzeichnis

- [151] R. P. Gonçalves, N. Buzhynskyy, V. Prima, J. N. Sturgis, S. Scheuring, Supramolecular assembly of VDAC in native mitochondrial outer membranes, *J. Mol. Biol.* **2007**, *369*, 413–418.
- [152] B. W. Hoogenboom, K. Suda, A. Engel, D. Fotiadis, The supramolecular assemblies of voltage-dependent anion channels in the native membrane, *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 246–255.
- [153] L. Thomas, E. Kocsis, M. Colombini, E. Erbe, B. L. Trus, A. C. Steven, Surface topography and molecular stoichiometry of the mitochondrial channel, VDAC, in crystalline arrays, *J. Struct. Biol.* **1991**, *106*, 161–171.
- [154] C. A. Mannella, Conformational changes in the mitochondrial channel protein, VDAC, and their functional implications, *J. Struct. Biol.* **1998**, *121*, 207–218.
- [155] R. Zalk, A. Israelson, E. S. Garty, H. Azoulay-Zohar, V. Shoshan-Barmatz, Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria, *Biochem. J.* **2005**, *386*, 73–83.
- [156] T. J. Malia, G. Wagner, NMR structural investigation of the mitochondrial outer membrane protein VDAC and its interaction with antiapoptotic Bcl-xL, *Biochemistry* **2007**, *46*, 514–525.
- [157] J. Dai, M. P. Sheetz, X. Wan, C. E. Morris, Membrane tension in swelling and shrinking molluscan neurons, *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 6681–6692.
- [158] J. Wolfe, P. L. Steponkus, Mechanical properties of the plasma membrane of isolated plant protoplasts, *Plant Physiol.* **1983**, *71*, 276–285.
- [159] G. M. W. Cook, W. R. Redwood, A. R. Taylor, D. A. Haydon, The molecular composition of black hydrocarbon films in aqueous solutions, *Kolloid-Z. u. Z. Polymere* **1968**, *227*, 28–37.
- [160] V. S. Rudnev, L. N. Ermishkin, L. A. Fonina, Rovin YuG, The dependence of the conductance and lifetime of gramicidin channels on the thickness and tension of lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *642*, 196–202.
- [161] A. Baslé, G. Rummel, P. Storici, J. P. Rosenbusch, T. Schirmer, Crystal structure of osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å, *J. Mol. Biol.* **2006**, *362*, 933–942.

-
- [162] A. H. Delcour, J. Adler, C. Kung, A single amino acid substitution alters conductance and gating of OmpC porin of *Escherichia coli*, *J. Membr. Biol.* **1991**, *119*, 267–275.
- [163] M. A. Arbing, D. Dahan, D. Boismenu, O. A. Mamer, J. W. Hanrahan, J. W. Coulton, Charged residues in surface-located loops influence voltage gating of porin from *Haemophilus influenzae* type b, *J. Membr. Biol.* **2000**, *178*, 185–193.
- [164] F. Bezanilla, The voltage sensor in voltage-dependent ion channels, *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 555–592.
- [165] P. van Gelder, N. Saint, P. Phale, E. F. Eppens, A. Prilipov, R. van Boxtel, J. P. Rosenbusch, J. Tommassen, Voltage sensing in the PhoE and OmpF outer membrane porins of *Escherichia coli*: role of charged residues, *J. Mol. Biol.* **1997**, *269*, 468–472.
- [166] W. Im, B. Roux, Ion permeation and selectivity of OmpF porin: a theoretical study based on molecular dynamics, Brownian dynamics, and continuum electrodiffusion theory, *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 851–869.
- [167] K. I. Lee, H. Rui, R. W. Pastor, W. Im, Brownian dynamics simulations of ion transport through the VDAC, *Biophys. J.* **2011**, *100*, 611–619.
- [168] H. Rui, K. I. Lee, R. W. Pastor, W. Im, Molecular dynamics studies of ion permeation in VDAC, *Biophys. J.* **2011**, *100*, 602–610.
- [169] F. Qin, A. Auerbach, F. Sachs, Hidden Markov modeling for single channel kinetics with filtering and correlated noise, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1928–1944.
- [170] D. Gincel, S. D. Silberberg, V. Shoshan-Barmatz, Modulation of the voltage-dependent anion channel (VDAC) by glutamate, *J. Bioenerg. Biomembr.* **2000**, *32*, 571–583.
- [171] T. Hodge, M. Colombini, Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels, *J. Membr. Biol.* **1997**, *157*, 271–279.
- [172] O. Moran, M. Sciancalepore, G. Sandri, E. Panfili, R. Bassi, C. Ballarin, M. C. Sorgato, Ionic permeability of the mitochondrial outer membrane, *Eur. Biophys. J.* **1992**, *20*, 311–319.
-

7. Literaturverzeichnis

- [173] G. Báthori, I. Szabó, I. Schmehl, F. Tombola, A. Messina, V. de Pinto, M. Zoratti, Novel aspects of the electrophysiology of mitochondrial porin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *243*, 258–263.
- [174] B. Mertins, G. Psakis, W. Grosse, K. C. Back, A. Salisowski, P. Reiss, U. Koert, L.-O. Essen, Flexibility of the N-Terminal mVDAC1 Segment Controls the Channel's Gating Behavior, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47938.
- [175] S. Villinger, R. Briones, K. Giller, U. Zachariae, A. Lange, B. L. de Groot, C. Griesinger, S. Becker, M. Zweckstetter, Functional dynamics in the voltage-dependent anion channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 22546–22551.
- [176] E. J. Marques, C. M. Carneiro, A. S. Silva, O. V. Krasilnikov, Does VDAC insert into membranes in random orientation?, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1661*, 68–77.
- [177] V. de Pinto, G. Prezioso, F. Thinner, T. A. Link, F. Palmieri, Peptide-specific antibodies and proteases as probes of the transmembrane topology of the bovine heart mitochondrial porin, *Biochemistry* **1991**, *30*, 10191–10200.
- [178] S. Stanley, J. A. Dias, D. D'Arcangelis, C. A. Mannella, Peptide-specific antibodies as probes of the topography of the voltage-gated channel in the mitochondrial outer membrane of *Neurospora crassa*, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 16694–16700.
- [179] B. M. McDonald, M. M. Wydro, R. N. Lightowlers, J. H. Lakey, Probing the orientation of yeast VDAC1 in vivo, *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 739–742.
- [180] F. P. Thinner, Trouble in VDAC field by putative inconsistencies of early antibody labelling studies, *Channels (Austin)* **2009**, *3*, 379–380.
- [181] S. M. Bezrukov, Functional consequences of lipid packing stress, *Curr Opin Colloid Interface Sci* **2000**, *5*, 237–243.
- [182] R. F. Epand, J.-C. Martinou, M. Fornallaz-Mulhauser, D. W. Hughes, R. M. Epand, The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32632–32639.
- [183] H. Steffen, S. Rieg, I. Wiedemann, H. Kalbacher, M. Deeg, H.-G. Sahl, A. Peschel, F. Götz, C. Garbe, B. Schitteck, Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill

-
- microorganisms irrespective of their charge, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 2608–2620.
- [184] I. Senyürek, M. Paulmann, T. Sinnberg, H. Kalbacher, M. Deeg, T. Gutschmann, M. Hermes, T. Kohler, F. Götz, C. Wolz et al., Dermcidin-derived peptides show a different mode of action than the cathelicidin LL-37 against *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 2499–2509.
- [185] Y. Wu, H. W. Huang, G. A. Olah, Method of oriented circular dichroism, *Biophys. J.* **1990**, *57*, 797–806.
- [186] B. Bechinger, Insights into the mechanisms of action of host defence peptides from biophysical and structural investigations, *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 306–314.
- [187] J. M. Kralj, D. R. Hochbaum, A. D. Douglass, A. E. Cohen, Electrical spiking in *Escherichia coli* probed with a fluorescent voltage-indicating protein, *Science* **2011**, *333*, 345–348.
- [188] C. Aisenbrey, B. Bechinger, Tilt and rotational pitch angle of membrane-inserted polypeptides from combined ¹⁵N and ²H solid-state NMR spectroscopy, *Biochemistry* **2004**, *43*, 10502–10512.
- [189] L. S. Batchelder, C. H. Niu, D. A. Torchia, Methyl reorientation in polycrystalline amino acids and peptides: a deuteron NMR spin-lattice relaxation study, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2228–2231.
- [190] C. Aisenbrey, P. Bertani, B. Bechinger, Solid-state NMR investigations of membrane-associated antimicrobial peptides, *Methods Mol. Biol.* **2010**, *618*, 209–233.
- [191] M. N. Melo, R. Ferre, M. A. R. B. Castanho, Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations, *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 245–250.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Aufbau einer Lipiddoppelschicht.....	1
Abb. 1-2: Schematische Darstellung der Zellmembran einer menschlichen Zelle.	2
Abb. 1-3: Schematische Darstellung der verschiedenen Arten des Transports von Molekülen über eine Membran.....	4
Abb. 1-4: Schematische Darstellung der möglichen Wirkungsweise des <i>voltage sensors</i> eines spannungsgesteuerten Ionenkanals.....	6
Abb. 1-5: Struktur des Porins OmpF aus der äußeren Zellmembran des Bakteriums <i>Salmonella typhi</i>	7
Abb. 1-6: Kanalaktivität eines OmpF- Trimers in einer porenüberspannenden Membran bestehend aus DPhPC.....	8
Abb. 1-7: Struktur der Isoform 1 des <i>voltage dependent anion channels</i> (VDAC1)..	10
Abb. 1-8: Stromantwort einer BLM bestehend aus Asolectin mit enthaltenen Membranfragmenten aus <i>Paramecium aurelia</i>	12
Abb. 1-9: Sprünge im Stromsignal nach Zugabe von VDAC1 zu einer Membran bestehend aus Phosphatidylcholin/Cholesterin im Verhältnis 3:1 (w/w).....	13
Abb. 1-10: Leitfähigkeitsamplituden der detektierten Sprünge im Signal einer Membran bestehend aus DPhPC nach Zugabe von VDAC1.....	14
Abb. 1-11: Zu einer Membran wurde bei einem anliegenden Transmembranpotenzial von $U_m = 10$ mV VDAC1 gegeben.....	15
Abb. 1-12: Mögliche Ursache des <i>voltage gatings</i> des VDAC1	16

Abb. 1-13: Übersicht der wichtigsten Funktionen, die VDAC1 als zentrales Transportprotein der äußeren Mitochondrienmembran vermutlich übernimmt.....	18
Abb. 1-14: Zusammenfassung der gängigsten Theorien zur Initialisierung der Apoptose infolge der Ausschüttung von Cytochrom <i>c</i> (Cyt <i>c</i>) aus dem Intermembranraum des Mitochondriums ins Zytosol	19
Abb. 1-15: Theorie zur Selektivität von kationischen AMPs gegenüber bakteriellen Membranen.....	22
Abb. 1-16: Möglicher Mechanismus der antimikrobiellen Wirkung von AMPs	23
Abb. 1-17: Möglicher Mechanismus der Porenbildung innerhalb einer Lipidmembran nach dem <i>barrel-stave</i> Mechanismus	24
Abb. 1-18: Struktur der aktiven Konformation des AMPs Dermcidin (DCD).....	26
Abb. 1-19: Verteilung von polaren bzw. geladenen Aminosäureseitenketten und hydrophoben Seitenketten im DCD-Hexamer.....	27
Abb. 1-20: Schematische Darstellung zur Verdeutlichung des Effekts von unterschiedlicher Dicke des hydrophoben Bereichs von Lipidmembran und inkorporiertem Membranprotein (<i>hydrophobic mismatch</i>).....	29
Abb. 1-21: Schematische Darstellung des Ausdünnens einer BLM.....	30
Abb. 3-1: Strukturformel von DPhPC.	35
Abb. 3-2: Strukturformel von DOPC.....	36
Abb. 3-3: Strukturformel von Cholesterol.....	36
Abb. 3-4: Schematische Darstellung der bei der Herstellung poröser Aluminate auftretenden Prozesse	38
Abb. 3-5: Schematische Darstellung des zum Auflösen verbliebenen Barriereoxids verwendeten Aufbaus	41
Abb. 3-6: Strukturformel von CPEO3.	42
Abb. 3-7: Schematische Darstellung der Präparation porenüberspannender Membranen per <i>painting</i> -Technik	43

Abb. 3-8: Nyquist-Diagramm zur Veranschaulichung des Zusammenhangs zwischen dem Wirkwiderstand (Z^e), dem Blindwiderstand (Z^{im}), dem Phasenwinkel φ und dem Betrag der Impedanz $ Z $	45
Abb. 3-9: Ideales Bode-Diagramm der elektrischen Eigenschaften einer Membran mit $R_m = 1 \text{ M}\Omega$ und $C_m = 0,3 \text{ }\mu\text{F}$	47
Abb. 3-10: Ersatzschaltbild einer Membran	48
Abb. 3-11: Schematische Darstellung des Ablaufs eines <i>patch clamp</i> -Experiments.	50
Abb. 3-12: Schematischer Aufbau eines <i>patch clamp</i> -Experiments an einer artifiziellen Lipidmembran.	51
Abb. 3-13: Aufbau eines Einzelkanalexperiments im Falle poröser Aluminate als Substrat für die Membranpräparation	52
Abb. 3-14: Sprünge im detektierten Stromsignal, aufgenommen bei einer Transmembranspannung von $U_m = -50 \text{ mV}$	53
Abb. 3-15: Manuelle Vorgabe zweier Niveaus zur anschließenden automatischen Auswertung der Sprünge im Signal	54
Abb. 3-16: Präparation einer Membran mithilfe des Port-a-Patch Aufbaus	55
Abb. 3-17: Erzeugung eines zirkular polarisierten Lichtstrahls.....	58
Abb. 3-18: Charakteristischer Verlauf der molaren Elliptizität verschiedener sekundärer Strukturelemente in Proteinen.....	60
Abb. 4-1: CD-Spektrum von frisch aufgetautem VDAC1 in LDAO-Mizellen	63
Abb. 4-2: CD-Spektren von VDAC1 in LDAO-Mizellen	64
Abb. 4-3: Impedanzspektrum eines porösen Aluminats mit partiell geöffneten Porenböden	67
Abb. 4-4: Zeitlicher Verlauf des Betrags der Impedanz $ Z $ beim Aufbau einer Membran durch Vesikelspreiten	68
Abb. 4-5: Impedanzspektrum der durch Vesikelspreiten präparierten Membran.....	69

Abb. 4-6: Der Membranwiderstand R_m in Abhängigkeit von der Zeit als Maß der Langzeitstabilität der durch Vesikelspreiten präparierten Membran	70
Abb. 4-7: Zeitlicher Verlauf des Betrags der Impedanz $ Z $, gemessen bei einer festen Frequenz von $f = 1$ MHz.....	71
Abb. 4-8: Impedanzspektrum der durch Auftrag einer 20 mM Lösung von DPhPC in <i>n</i> -Dekan/ <i>n</i> -Oktan 1:1 (v/v) präparierten Membran	72
Abb. 4-9: Stromsignal einer Membran in Anwesenheit eines Trimers des Membranproteins OmpF ($c_{\text{OmpF}} = 70$ nM)	74
Abb. 4-10: Auftragung der Datenpunkte des in Abb. 4-9 gezeigten Stromsignals in einem Histogramm	75
Abb. 4-11: Auftragung der der Datenpunkte des in Abb. 4-9 gezeigten Stromsignals in einem Histogramm	76
Abb. 4-12: Sprünge im detektierten Stromsignal in Anwesenheit von 30 nM VDAC1	78
Abb. 4-13: Verteilung der Leitfähigkeiten von 7808 ausgewerteten Ereignissen gemessen bei $U_m = -50$ mV	79
Abb. 4-14: Analyse des aus 7808 detektierten Ereignissen bei $U_m = -50$ mV erhaltenen offenen Zustands des VDAC1	80
Abb. 4-15: Logarithmische Auftragung der Lebensdauern des offenen Zustands t_{open} bei $U_m = -50$ mV.....	81
Abb. 4-16: Auftragung der Lebensdauern des offenen Zustands t_{open} bei $U_m = -50$ mV.....	82
Abb. 4-17: Verteilung der Leitfähigkeiten von 289 ausgewerteten Ereignissen gemessen bei $U_m = -60$ mV	83
Abb. 4-18: Auftragung der Lebensdauern des offenen Zustands t_{open} bei $U_m = -60$ mV.....	84
Abb. 4-19: Verteilung der Leitfähigkeiten von 89 ausgewerteten Ereignissen gemessen bei $U_m = -30$ mV	85

Abb. 4-20: Stromsignale, aufgenommen an einer Membran der Zusammensetzung DPhPC/Cholesterol 9:1, welche einen einzelnen VDAC1 enthielt. Die Signale wurden bei einem konstanten Transmembranpotenzial von $U_m = 20$ mV (oben) und $U_m = 60$ mV (unten) aufgenommen. Puffer: 1 M KCl, 1 mM CaCl ₂ , 5 mM HEPES, pH 7,4.....	86
Abb. 4-21: Zeitlicher Verlauf der applizierten Transmembranspannung U_m am Beispiel eines Dreiecksspannungspulses mit maximaler Amplitude von $U_{m,max} = \pm 60$ mV und einer Frequenz von $f = 100$ mHz.....	87
Abb. 4-22: Detektierte Stromantwort auf die in Abb. 4-21 gezeigte Spannungsrampe, gemessen an einer Membran der Zusammensetzung DPhPC/Cholesterol 9:1, welche eine einzelnes VDAC1-Protein enthielt.....	88
Abb. 4-23: Stromantwort einer Membran ohne enthaltenes Protein auf eine angelegte Spannungsrampe mit einer Frequenz von $f = 100$ mHz und einer Amplitude von $U_m = \pm 60$ mV	89
Abb. 4-24: Stromantwort einer Membran mit einem rekonstituierten VDAC1-Molekül	90
Abb. 4-25: Stromantwort einer Membran mit einem enthaltenen VDAC1-Molekül	91
Abb. 4-26: Stromantwort einer Membran mit mehreren enthaltenen VDAC1-Molekülen	92
Abb. 4-27: Stromantwort einer Membran mit zwei oder drei enthaltenen VDAC1-Proteinen.	93
Abb. 4-28: Durchlichtmikroskopische Aufnahme einer GUV-Suspension (DPhPC/Cholesterol 9:1), hergestellt in 1 M Sorbitlösung, in Reinstwasser	95
Abb. 4-29: Stromantwort einer Membran mit einem enthaltenen VDAC1	96
Abb. 4-30: Auftragung der über die Membran applizierten Spannung U_m in Abhängigkeit von der Zeit	97

Abb. 4-31: Stromantwort einer Membran, bestehen aus DPhPC/Cholesterol 9:1 mit einem enthaltenen VDAC1 auf das in Abb. 4-30 gezeigte Spannungssignal, aufgetragen in Abhängigkeit von der Zeit.....	98
Abb. 4-32: Auftragung der ersten 0,5 s und der letzten 0,5 s des in Abb. 4-30 gezeigten Spannungssignals	98
Abb. 4-33: Detailausschnitt der in Abb. 4-31 gezeigten Stromkurve.....	99
Abb. 4-34: Aus den Datenpunkten der ersten und letzten jeweils 0,15 s des Stromsignals wurden die Mittelwerte der Strom- bzw. Zeitdaten errechnet.....	100
Abb. 4-35: Stromantwort einer Membran mit einem enthaltenen VDAC1	101
Abb. 4-36: Die Öffnungswahrscheinlichkeit des VDAC1	102
Abb. 4-37: Öffnungswahrscheinlichkeit des VDAC1	103
Abb. 4-38: Nachweis der VDAC1-Aktivität in einer Membran.....	104
Abb. 4-39: Destabilisierung des offenen Zustands eines VDAC1-Moleküls durch Zugabe des proapoptotischen Proteins tBid	105
Abb. 4-40: Wechsel der Leitfähigkeit eines VDAC1-Moleküls von $G_o = 4,0$ nS auf $G_c = 1,7$ nS.....	106
Abb. 4-41: Einfluss des proapoptotischen Proteins tBid auf ein VDAC1-Molekül	107
Abb. 4-42: Zwei für den <i>wt</i> -VDAC1 charakteristische Stromsignale, aufgenommen bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = -50$ mV und $U_m = -40$ mV.....	108
Abb. 4-43: Primärstruktur des VDAC1-Moleküls.....	109
Abb. 4-44: Stromantwort einer Membran der Zusammensetzung DPhPC/Cholesterol 9:1 mit einem rekonstituierten RGS-VDAC1 auf eine 100 mHz Spannungsrampe mit Spannungsmaxima von $U_{m,max} = \pm 60$ mV	110
Abb. 4-45: Die spannungsabhängige Öffnungswahrscheinlichkeit des RGS-VDAC1, ermittelt nach Gleichung (4-7) aus 198 hintereinander aufgenommenen Stromsignalen.....	111

Abb. 4-46: Stromantwort einer RGS-VDAC1 enthaltenden Membran auf eine Spannungsrampe mit Spannungsmaxima von $U_{m,max} = \pm 60$ mV und einer Frequenz von $f = 5,6$ mHz	112
Abb. 4-47: Detailausschnitt des in Abb. 4-46 gezeigten RGS-VDAC-Stromsignals	113
Abb. 4-48: Stromantwort einer RGS-VDAC1 enthaltenden Membran auf eine Spannungsrampe mit Spannungsmaxima von $U_{m,max} = \pm 60$ mV und einer Frequenz von $f = 5,6$ mHz	113
Abb. 4-49: Detailausschnitt des in Abb. 4-48 gezeigten RGS-VDAC1-Stromsignals	114
Abb. 4-50: Detailausschnitt eines unter <i>voltage clamp</i> -Bedingungen bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = -50$ mV aufgenommenen RGS-VDAC-Stromsignals.....	115
Abb. 4-51: Detailausschnitt des in Abb. 4-50 gezeigten RGS-VDAC-Traces im Bereich des <i>fast gatings</i>	116
Abb. 4-52: Logarithmische Auftragung der Lebensdauern τ des <i>fast gating</i> -Zustands geringerer Leitfähigkeit (c) des RGS-VDAC1-Proteins.....	117
Abb. 4-53: Logarithmische Auftragung der Lebensdauern τ des <i>fast gating</i> -Zustands höherer Leitfähigkeit (o) des RGS-VDAC1-Proteins.....	118
Abb. 4-54: Position der bei der V17C/A205C-VDAC-Mutante artifiziiell eingefügten Disulfidbrücke	120
Abb. 4-55: Stromantwort einer V17C/A205C-VDAC1 enthaltenden Membran auf eine Spannungsrampe mit Spannungsmaxima von $U_{m,max} = \pm 60$ mV und einer Frequenz von $f = 5,6$ mHz	121
Abb. 4-56: Die spannungsabhängige Öffnungswahrscheinlichkeit des V17C/A205C-VDAC1.....	122
Abb. 4-57: Ein unter <i>voltage clamp</i> Bedingungen bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = -60$ mV aufgenommenes V17C/A205C-VDAC-Stromsignal	123

Abb. 4-58: Ein unter <i>voltage clamp</i> Bedingungen bei einem Transmembranpotenzial von $U_m = +60$ mV aufgenommenes V17C/A205C-VDAC-Stromsignal	123
Abb. 4-59: Molekuldynamische Simulation des DCD-Hexamers	125
Abb. 4-60: Stromsignal einer Membran (DPhPC/Cholesterin 9:1) in Anwesenheit von 3 μ M DCD.....	126
Abb. 4-61: Stromsignal einer Membran (DPhPC/Cholesterin 9:1) in Anwesenheit von 1,7 μ M DCD.....	127
Abb. 4-62: Stromsignal einer Membran (DPhPC/Cholesterin 9:1) in Anwesenheit von 8,5 μ M DCD, gemessen in 1 M NaCl, 2 mM ZnCl ₂ , 5 mM HEPES, pH 7,1, bei einer Transmembranstranspannung von $U_m = 100$ mV.	128
Abb. 4-63: Auftragung der ermitteltem Leitfähigkeiten von 1009 nach Zugabe von DCD detektierten Ereignissen	129
Abb. 4-64: Logarithmische Auftragung der Lebensdauern aller 1009 detektierten Ereignisse	130
Abb. 5-1: Per <i>dynamic light scattering</i> bestimmte Verteilung der Durchmesser der zur Präparation porenüberspannender Membranen benutzten LUVs.....	134
Abb. 5-2: Die Öffnungswahrscheinlichkeit eines einzelnen VDAC1-Proteins.....	138
Abb. 5-3: Öffnungswahrscheinlichkeit des VDAC1	140
Abb. 5-4: Beispiel einer Auftragung zur Öffnungswahrscheinlichkeit von VDAC1 in Abhängigkeit von der Transmembranstranspannung.....	142
Abb. 5-5: Stromantwort einer Membran mit mehreren enthaltenen VDAC1-Molekülen	143
Abb. 5-6: Öffnungswahrscheinlichkeit P_o von VDAC1 in Abhängigkeit des Transmembranpotenzials U_m	144
Abb. 5-7: Darstellung eines antiparallelen VDAC1-Dimers, welches in Proteinkristallen als bevorzugte Anordnung dieser Moleküle gefunden wurde.....	147
Abb. 5-8: Kooperatives Verhalten zweier Membranproteine.....	148

Abb. 5-9: <i>Molecular dynamics</i> (MD) Simulation eines VDAC1-Moleküls, welches keine stabilisierende N-terminale α -Helix enthält [$\Delta(1-20)$ VDAC1].....	149
Abb. 5-10: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme der äußeren Mitochondrienmembran von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	150
Abb. 5-11: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von VDAC1-Kanälen in der äußeren Mitochondrienmembran von <i>Solanum tuberosum</i>	151
Abb. 5-12: Hexamere Anordnung von antiparallel zueinander orientierten VDAC1-Molekülen aus der OMM von <i>Mus musculus</i>	152
Abb. 5-13: 3D-Struktur der RGS-VDAC-Mutante	154
Abb. 5-14: Röntgenstruktur eines OmpC-Trimers.....	155
Abb. 5-15: Durch ^1H , ^{15}N -TROSY Experimente bestimmte Position des modifizierten N-Terminus der RGS-VDAC1-Mutante	157
Abb. 5-16: Destabilisierung des offenen Zustands eines VDAC1 nach Zugabe des proapoptotischen Proteins tBid	162
Abb. 5-17: Destabilisierung des offenen Zustands eines VDAC1 nach Zugabe des proapoptotischen Proteins tBid ($c_{\text{tBid}} = 2,5 \mu\text{M}$).....	163
Abb. 5-18: Schematische Darstellung der Wirkungsweise des antimikrobiellen Peptids Dermcidin (DCD)	166
Abb. 5-19: Molekulardynamische Simulation der Lage eines DCD-Hexamers innerhalb einer Membran.....	167

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: Anteil bestimmter Sekundärstrukturelemente an der Gesamtstruktur von VDAC1	65
Tabelle 4-2: Spannungsabhängigkeit des beim RGS-VDAC1 beobachteten <i>fast gateings</i>	119

8.3 MatLab-Skript zur Auswertung von Stromsignalen basierend auf Spannungsrampen

In dieser Form nur für Rampen/Traces mit 10 s Dauer und 50 kHz Samplingrate verwendbar (500.000 Datenpunkte). Die ca. 0,15 s Vor- bzw. 0,25 s Nachlauf ohne angelegtes Potential zur Grundlinienkorrektur gibt die Software Clampex vor, die Rampen selbst sind insgesamt genau 9600 ms, also 480.000 Datenpunkte lang.

```
1   filePattern = fullfile('', '*.abf');
2   abfFiles = dir(filePattern);
3   inkrement=2000;
4   Threshold=3;
5   offsetX=zeros(2,1);
6   offsetY=zeros(2,1);
7   Ggesamt=zeros(500000,1);
8   OSgesamt=zeros(500000,1);
9   SummeG=zeros(240000,1);
10  SummeOS=zeros(240000,1);
11  Spannungsachse=zeros(240000,1);
12  Spannungsachsegrob=zeros(240000/inkrement,1);
13  Ggemittelt=zeros(240000/inkrement,1);
14  OSgemittelt=zeros(240000/inkrement,1);

15  for n = 1:length(abfFiles)
16      datei = [abfFiles(n).name];
17      raw= abf2load(datei);
18      U=raw(:,3);
19      offsetX(1,1)=7500/2+1;
20      offsetX(2,1)=496251;
21      offsetY(1,1)=mean(I(1:7500));
22      offsetY(2,1)=mean(I(492500:500000));
23      offsetGerade=polyfit(offsetX,offsetY,1);
24      for Datenpunkt=1:500000
25          I(Datenpunkt)=I(Datenpunkt)-
                (offsetGerade(1)*Datenpunkt+offsetGerade(2));
26          if U(Datenpunkt)~=0
27              G=I(Datenpunkt)/U(Datenpunkt);
28              Ggesamt(Datenpunkt,1)=Ggesamt(Datenpunkt,1)+G;
29              if G>Threshold
30                  OSgesamt(Datenpunkt)=OSgesamt(Datenpunkt)+1;
31              end
32          end
33      end

34  Ggesamt=Ggesamt/length(abfFiles);
35  OSgesamt=OSgesamt/length(abfFiles);

36  for h=1:120000
37      SummeG(h,1)=Ggesamt(367500-h,1)+Ggesamt(367500+h,1);
```

```

38  SummeG(h+120000,1)=Ggesamt(7499+h,1)+Ggesamt(7501+240000-h,1);
39  SummeOS(h,1)=OSgesamt(367500-h,1)+OSgesamt(367500+h,1);
40  SummeOS(h+120000,1)=OSgesamt(7499+h,1)+OSgesamt(7501+240000-
    h,1);
41  end

42  SummeG=SummeG/2;
43  SummeOS=SummeOS/2;

44  for l=1:240000/inkrement
45  Ggemittelt(l,1)=mean(SummeG(((l-1)*inkrement)+1:l*inkrement));
46  OSgemittelt(l,1)=mean(SummeOS(((l-
    1)*inkrement)+1:l*inkrement));
47  end

48  for k=1:240000
49  Spannungsachse(k)=-60+0.0005*(k-1);
50  end

51  for w=1:(240000/inkrement)
52  Spannungsachsegrob(w)=-60-
    ((240/(480000/inkrement))/2)+(240/(480000/inkrement))*w;
52  End

```

8.4 Symbolverzeichnis

A	Fläche
A_a	aktive Fläche
c	Konzentration
C	elektrische Kapazität
C_m	elektrische Kapazität einer Lipidmembran
C_s	spezifische Kapazität
d	Dicke
e	Elementarladung

E	Redoxpotenzial
\vec{E}	elektrische Feldstärke
E_{280}	Extinktion bei $\lambda = 280$ nm
f	Frequenz
f_c	Grenzfrequenz eines Bessel-Filters
G	Leitfähigkeit
G_c	Leitfähigkeit eines geschlossenen Membranproteins
G_o	Leitfähigkeit eines offenen Membranproteins
h	Plancksches Wirkungsquantum
I	elektrischer Strom
i	imaginäre Einheit
$I(\omega, t)$	Wechselstrom
k	Ratenkonstante
K_L	Löslichkeitsprodukt
M	molare Masse
\vec{m}	magnetisches Übergangsmoment
n	Anzahl
P_o	Öffnungswahrscheinlichkeit

Q	elektrische Ladung
R	elektrischer Widerstand
R_{el}	elektrischer Widerstand eines Elektrolyten
R_{m}	elektrischer Widerstand einer Lipidmembran
t	Zeit
t_{d}	Totzeit eines Bessel-Filters
U	elektrische Spannung
$U(\omega, t)$	Wechselspannung
U_{m}	Transmembranpotenzial
Z	Impedanz (Wechselstromwiderstand)
$ Z $	Betrag der Impedanz (Scheinwiderstand)
δ	Intervallgröße
ε	Extinktionskoeffizient
ε_0	elektrische Feldkonstante (Permittivität des Vakuums)
ε_{r}	Permittivität
Θ	Elliptizität
λ	Wellenlänge elektromagnetischer Strahlung
$\vec{\mu}$	elektrisches Übergangsmoment

ν	Frequenz elektromagnetischer Strahlung
σ	Standardabweichung
τ	Lebensdauer
$\varphi(\omega)$	frequenzabhängiger Phasenwinkel
Φ_B	magnetischer Fluss
ω	Kreisfrequenz

8.5 Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
A/D	analog/digital
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	antimikrobielles Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-X _L	ein antiapoptotisches Protein
Bis/Tris	Bis(2-hydroxymethyl)-amino-tris(hydroxymethyl)-methan
BLM	<i>black lipid membrane</i>
CD	Cirkulardichroismus

CMC	<i>critical micellar concentration</i>
CPEO3	Cholesterylpolyethylenoxythiol
Cyt <i>c</i>	Cytochrom <i>c</i>
DCD	Dermcidin, ein antimikrobielles Peptid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
egg-PC	Lipidgemisch, extrahiert aus Eigelb
EIS	elektrochemische Impedanzspektroskopie
G-Protein	Guaninnukleotid bindendes Protein
GRS	<i>glycine rich sequence</i>
GUV	<i>giant unilamellar vesicle</i>
HCN-Kanal	<i>hyperpolarisation activated, cyclic nucleotide-gated cation channel</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMM	<i>hidden Markov model</i>
IF	<i>interface</i>
IMM	innere Mitochondrienmembran
LDAO	<i>n</i> -Dodecyl- <i>N,N</i> -dimethylamin- <i>N</i> -oxid
LUV	<i>large unilamellar vesicle</i>

MD	<i>molecular dynamics</i>
MscL	<i>mechanosensitive channel of large conductance</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
OMM	äußere (<i>outer</i>) Mitochondrienmembran
OmpF	<i>outer membrane protein</i> , Isoform F
<i>o</i> -POE	<i>n</i> -Octylpolyoxyethylen
PC	Phosphatidylcholin
PDB-ID	Identifikationsnummer der <i>protein data bank</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
PS	Phosphatidylserin
ROI	<i>region of interest</i>
SUV	<i>small unilamellar vesicle</i>
tBid	ein proapoptotisches Protein
TDT	Tetradekanthiol
v/v	Verhältnis: Volumen zu Volumen
VDAC1	<i>voltage dependent anion channel</i> , Isoform 1

8. Anhang

Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Mucosol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid <i>p.a.</i>	Carl Roth, Karlsruhe
<i>n</i> -Dekan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>n</i> -Oktan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>ortho</i> -Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Oxalsäure-Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Quecksilber(II)chlorid	Merck, Darmstadt
Salzsäure (1 M)	Merck, Darmstadt
Stickstoff	Linde, München
Zinkchlorid	AppliChem, Darmstadt

8.7 Geräte

Einzelkanalexperimente:

A/D-Wandler DIGIDATA 1322A	Axon Instruments, Union City, CA, USA
Axopatch 200B Amplifier	Axon Instruments, Union City, CA, USA
NPC-1 Chips, 3-5 M Ω	Nanion Technologies, München
Port-a-Patch	Nanion Technologies, München

Impedanzspektroskopie:

Impedance Analyser SI 1260 Solartron Instruments, Farnborough, UK

Dielectric Interface 1296 Solartron Instruments, Farnborough, UK

Durchlicht-Hellfeldmikroskopie:

BX 51 Systemmikroskop Olympus, Hamburg

GUV-Elektroformation:

Frequenzgenerator 33220A Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA

CD-Spektroskopie:

Spectropolarimeter J-810 Jasco, Groß-Umstadt

Ätzapparatur (Aluminate):

Source Meter 2400 Keithley Instruments, Cleveland, OH, USA

Power Supply PS 280 DC Tektronix, Beaverton, OR, USA

Sputteranlage:

Sputter Coater 108 auto Cressington, Watfort, UK

Thickness Controller mtm 20 Cressington, Watfort, UK

Sonstige Geräte:

Feinwaage Adventurer OHAUS, Pine Brook, NJ, USA

Feinwaage CP225D Sartorius, Göttingen

8. Anhang

Plasma Cleaner PDC 32 G-2	Harrick Plasma, Ithaca, NY, USA
pH-Meter Calimatic 766	Knick, Berlin
Reinstwasseranlage MilliQ A10	Millipore, Billerica, MA, USA
Ultraschallbad Sonorex RK 255 H	Bandelin, Berlin
Vakuumtrockenschrank VD 23	Binder, Tuttlingen

Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. Claudia Steinem möchte ich mich sehr herzlich für die in allen Belangen interessante und lehrreiche Zeit während meiner Doktorarbeit bedanken. Ein - diplomatisch ausgedrückt - etwas anspruchsvolleres Protein in einem sehr ambitionierten Versuchsaufbau untersuchen zu wollen birgt doch gelegentlich ein nicht zu unterschätzendes Frustrationspotenzial für alle Beteiligten. Ich glaube aber, dass wir beide letztlich einiges über den VDAC1 und nicht zuletzt die Mechanismen einer wissenschaftlichen Kooperation dazugelernt haben.

Herrn Prof. Dr. Schroeder danke ich für die Übernahme des Korreferats und die hilfreichen Vorschläge im Rahmen der *Thesis Committees*.

Auch allen weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission spreche ich meinen herzlichen Dank für die Übernahme dieser zeitraubenden Aufgabe aus.

Karin Giller und der Abteilung von Herrn Prof. Dr. Griesinger am MPI danke ich sehr für die im Rahmen der SFB 803-Kooperation zur Verfügung gestellten VDAC1-Proteine.

Bei Prof. Dr. Zeth, Dr. Zachariae und Prof. Dr. de Groot bedanke ich mich für die erfolgreiche Kooperation bei der Ergründung der Dermcidin-Aktivität.

Der Firma Nanion-Technologies, und hier vor allem Dr. Mohammed Kreir und Dr. Nils Fertig, danke ich sehr für die kurzfristig und komplett unbürokratisch eröffnete Möglichkeit, eine mehrtägige Lehrstunde in Sachen Port-a-Patch zu erhalten.

Jacek Kozuch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Hildebrandt von der TU Berlin danke ich für die interessante Einführung in die SEIRA-Spektroskopie und nicht zuletzt für die lustigen Tage (und Nächte) in Berlin. Schade, dass der VDAC1 sich auch hier als äußerst widerspenstig erwiesen hat.

Jutta danke ich für die viele Hilfe und die geduldigen Erklärungen aller im Laboralltag auftauchenden Probleme, während ich meiner liebsten Lieblingssekretärin Marianne sehr für alle organisatorischen Hilfen danke. Ohne euch würde nicht nur ich hier langsam verrückt werden!

Meinem Masterstudenten und Kumpel Ole danke ich sehr für die Hilfe bei meinen eigenen Experimenten. Gibt es eigentlich irgendein naturwissenschaftlich-mathematisches Gebiet, in dem du dich *nicht* hervorragend auskennst? Kaum zu glauben, der Bengel. Ich würde es dir sogar gönnen, dass der SV Werder auch in nächster Zeit die Klasse hält. Das soll mir recht sein, solange er dem großen Hamburger Sportverein (HSV) nicht die zukünftig sicherlich konstant zu erwartenden internationalen Plätze streitig macht.

Den anderen Kollegen aus unserer Ecke im Labor 32 Corinna und Daniel, aber auch Lando dem Whisky-Fachmann und dem kompletten AK Steinem danke ich für sehr angenehme Messzeiten im Kaffeeraum, gediegene Weihnachtsfeiern und spaßige Ausflüge. Schade, dass gemeinsames Kegeln und Skat-Kloppen gerade erst im Begriff sind, eine nette AK Steinem-Tradition zu werden.

Den Sportsfreuden aus dem AK Stalke sei für die entspannenden und trotzdem teils nervlich sehr belastenden Trainingsstunden in der Mittagspause gedankt. Was wäre ein durchschnittlicher Arbeitstag nur ohne den doppelten Löhler, den Bon Shot, den Hamster und Krok-Shot, Aspirin, Dachstörer, Rauscher oder den *long range*-Deuerlein mit zwei Henn auf der nach oben offenen Wock-Skala? Er wäre trist und grau...

Meinen göttinger Kumpels Fink, Reent, Jakob, Gerrit, Christian, Arno und all den anderen danke ich für sehr entspannte Stunden im MP, beim Picknick, beim Spieleabend oder einfach beim perspektivlos Rumhängen. Es war mir eine Ehre, Jungs! Auch Jassi und der jungen Horde danke ich für eine wirklich lustige Zeit und so manche Spiele-Inspiration.

Dem Weltgeist in Verbindung mit den Betreibern der Comedy-Seite 9gag danke ich recht herzlich für das Erscheinenlassen einer grotesk behaarten Rentnerin in eindeutiger Pose auf meinen Bildschirm, just in jener Sekunde, in der Frau Prof. Steinem mit bestem Blick auf dieses Arrangement mein Büro betrat... Haha, DAS war lustig.

Ein nicht in Worte zu fassender Dank gebührt meinen Freunden aus Lüneburg und natürlich meiner Familie. Ohne diesen bedingungslosen Rückhalt in allen Situationen wäre ich komplett aufgeschmissen gewesen, vor allem wenn es mal wieder sehr stressig zugeht im lieben Labor.

DANKE!

Lebenslauf

von

Conrad Michael Weichbrodt

Diplom-Chemiker

Groner Straße 60

37073 Göttingen

Tel.: 0173 - 2449123

E-mail: cweichb@gwdg.de

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 29.03.1982

Geburtsort: Lüneburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulbildung

1988-1992 Besuch der Anne-Frank-Schule (Grundschule), Lüneburg

1992-1994 Besuch der Orientierungsstufe Kaltenmoor, Lüneburg

1994-2001 Besuch des Gymnasiums Wilhelm-Raabe-Schule, Lüneburg

06/2001 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

08/2001-05/2002 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz, Ortsverein Lüneburg

Studium

- 10/2002-11/2008 Studium der Chemie (Diplom) an der Georg-August-Universität, Göttingen
- 10/2004 Erwerb des Vordiploms im Fach Chemie (Gesamtnote: „gut“)
- 09/2005-09/2006 Studium an der Universitat Autònoma de Barcelona, Arbeitskreis Prof. Dr. Virgili, im Rahmen eines einjährigen ERASMUS-Aufenthalts
- 02/2008-08/2008 Diplomarbeit zum Thema „*Quantifizierung der Interaktion von Annexin A2t und PIP₂ mittels Quarzmikrowaagetechnik unter Berücksichtigung des Einflusses von Cholesterin*“ im Arbeitskreis Prof. Dr. Steinem, Georg-August-Universität, Göttingen (Note: 1,0)
- 11/2008 Diplom in Chemie (Gesamtnote: „sehr gut“)

Dissertation

- 01/2009-04/2013 Promotion zum Thema „*Elektrophysiologische Charakterisierung des mitochondrialen Porins VDAC1 und des antimikrobiellen Peptids Dermcidin in lösungsmittelfreien Modellmembranen*“ im Arbeitskreis Prof. Steinem, Georg-August-Universität, Göttingen
- 04/2013 Abschluss: *doctor rerum naturalium* (Gesamtnote: „*magna cum laude*“)

Publikationen

- [1] C. Weichbrodt, S. Villinger, R. Schneider, K. Giller, M. Wegstroth, M. Etkorn, A. Lange, M. Zweckstetter, C. Griesinger, S. Becker, C. Steinem, Modification of the N-terminal helix of hVDAC1 alters its gating kinetics, *submitted*.
- [2] C. Song, C. Weichbrodt, E. S. Salnikov, M. Dynowski, B. O. Forsberg, B. Bechinger, C. Steinem, B. L. de Groot, U. Zachariae, K. Zeth, Crystal structure and functional mechanism of a human antimicrobial membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, 110 (12), 4586.
- [3] E. K. Schmitt, C. Weichbrodt, C. Steinem, Impedance analysis of gramicidin D in pore-suspending membranes, *Soft Matter* **2009**, 5, 3347.

Beiträge auf wissenschaftlichen Fachtagungen

- 02/2010 **Vortrag** zum Thema “*Electrophysiological Investigation of human VDAC1 in Pore-spanning Membranes*”, SFB 803 Winterschool 2010, Hofgeismar.
- 03/2010 **Posterbeitrag** zum Thema “*Electrophysiological Investigation of the VDAC1 Ion-Channel*”, 12th JCF Frühjahrssymposium, Göttingen.
- 10/2010 **Posterbeitrag** zum Thema “*Electrophysiological Investigation of the VDAC1 Ion-Channel*”, Annual Meeting of the DGfB 2010, Bochum.
- 08/2011 **Posterbeitrag** zum Thema “*Electrophysiological Investigation of different hVDAC1 Ion-Channels via Planar Patch Clamp*”, 8th European Biophysics Congress, Budapest, Ungarn.
- 03/2012 **Vortrag** zum Thema “*Electrophysiological Investigation of the Mitochondrial Ion Channel hVDAC1 on a single channel level*”, SFB 803 Winterschool 2012, Kloster Drübeck.
- 09/2012 **Posterbeitrag** zum Thema “*Modification of the N-terminal α -helix of the hVDAC1 Ionchannel Influences its Gating Behavior*”, Annual Meeting of the DGfB 2012, Göttingen.

Lehrtätigkeit

- 01/2009-06/2012 Leitung des Praktikums „Organische Chemie für Fortgeschrittene“ für Lehramtskandidaten (Planung und Betreuung: Seminar inkl. Vortrag, Saalpraktikum, Klausur)
- 05/2009-07/2012 Betreuung des Seminars und des Saalpraktikums im Rahmen des Kurses „Chemie für Mediziner“
- 04/2012-08/2012 Betreuung des Seminars zur Grundvorlesung in organischer Chemie (Chemie Bachelor-Studiengang)
- 2009-2012 Betreuung von Diplom- bzw. Masterabschlussarbeiten

Mitgliedschaften

- Seit 2009 Deutsche Gesellschaft für Biophysik e. V. (DGfB)

Kenntnisse, Fähigkeiten

- Fremdsprachen: - Englisch (fließend)
 - Spanisch (gut)
 - Französisch (Grundkenntnisse)
- EDV-Kenntnisse: - MS-Office
 - Origin / MatLab
 - Clampfit / Clampex / QuB
 - Bildbearbeitung (Gimp, ImageJ)
- Methoden: - *planar patch clamp* (Port-a-Patch)
 - Elektrophysiologie an *black lipid membranes*
 - elektrochemische Impedanzspektroskopie
 - Quarzmikrowaage-technik
 - Fluoreszenzmikroskopie (u. A. Konfokalmikroskopie)
 - Circular dichroismus-Spektroskopie
 - UV/Vis-Spektroskopie
 - poröse Substrate / Oberflächenfunktionalisierung

Soft skills

- 12/2009 Workshop zu Thema „Führungsexzellenz“, Dr. Silvie Klein-Franke, Ideas and Skills, München/Innsbruck
- 04/2011 Workshop zum Thema „Strategische Kompetenz im Selbstmanagement - Selbstmarketing“, Alexander Moritz, Berlin
- Sonstiges: ehrenamtlicher Gruppenleiter (Jugendgruppenleiterausweis) im Rahmen verschiedener Konfirmationskurse (Kirchengemeinde St. Stephanus, Lüneburg) und internationaler Summer Camps (CISV, Lüneburg)

Hiermit bestätige ich die Richtigkeit aller Angaben:

Datum

Unterschrift