





**Charakterisierung der Aktivität und Inhibition des  
rekombinanten, spannungsgesteuerten Protonenkanals H<sub>V</sub>1:  
Funktionelle Rekonstitution in unilamellare Vesikel**

**Dissertation**

zur Erlangung des

mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

*Doktor rerum naturalium*

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Chemie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Benjamin Gerdes

aus Bremervörde

Göttingen 2017



**Betreuungsausschuss:**

Prof. Dr. Claudia Steinem

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie

Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Michael Meinecke

European Neuroscience Institute

Georg-August-Universität Göttingen

**Mitglieder der Prüfungskommission:**

Referentin: Prof. Dr. Claudia Steinem

Korreferent: Prof. Dr. Michael Meinecke

**Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:**

Prof. Dr. Nils Brose

Molekulare Neurobiologie

Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin

Dr. Jochen Hub

Institut für Mikrobiologie und Genetik

Georg-August-Universität Göttingen

Dr. Sebastian Kruss

Institut für Physikalische Chemie

Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Silvio O. Rizzoli

Abteilung für Neuro- und Sinnesphysiologie

Universitätsmedizin Göttingen

**Tag der mündlichen Prüfung:** 08.12.2017



## **Erklärung**

Ich, Benjamin Gerdes, erkläre hiermit, dass meine Doktorarbeit mit dem Titel „Charakterisierung der Aktivität und Inhibition des rekombinanten, spannungsgesteuerten Protonenkanals H<sub>v</sub>1: Funktionelle Rekonstitution in unilamellare Vesikel“ selbstständig angefertigt wurde und keine anderen Quellen und Hilfen als angegeben verwendet wurden.

Göttingen, 2017

---

Benjamin Gerdes





Für meine geliebte Frau und zauberhaften Töchter

„Wenn man das Unmögliche ausgeschlossen hat, muss das, was übrig bleibt, die Wahrheit sein, so unwahrscheinlich sie auch klingen mag.“

(Sherlock Holmes)



## Abstract

The human voltage-gated proton channel (hH<sub>V</sub>1) regulates important physiological processes like the respiratory burst activity of white blood cells and the motility of spermatozoa by efflux of protons. Reconstitution of the recombinant full-length H<sub>V</sub>1 into small unilamellar vesicles provides a basis for studies of the electrophysiological properties and involved structural changes under well-defined conditions using a model membrane system.

In the first section a protocol for the heterologous expression of H<sub>V</sub>1 fusion protein from *Escherichia coli* and solubilization from inclusion bodies by SDS has been established. Successful protein purification performed by metal ion affinity chromatography was confirmed by SDS-PAGE. Correct protein folding was verified by CD-spectroscopy and protein characterization was completed by western blotting and mass spectrometry.

In the second section of this work the efficiency of detergent mediated reconstitution of H<sub>V</sub>1 in preformed unilamellar vesicles was analyzed by a pH-sensitive 9-amino-6-Chloro-2-methoxy (ACMA) fluorescence based proton flux assay. Effective reconstitution was accomplished by using cholesterol containing membranes reaching  $76 \pm 7\%$  of active proteoliposomes. Insertion of negative charged phospholipids allowed accelerating the proton translocation by accumulation of protons at the membrane surface. Furthermore the effect of temperature and of the potential channel inhibitor 2-guanidinebenzimidazole (2GBI) on the translocation rate were targeted.  $Q_{10}$ -value of 1.99 and dissociation constant  $K_D(2GBI) = 88 \pm 64 \mu\text{M}$  were determined and are in good agreement with the biophysical properties of native H<sub>V</sub>1 proton channels.

Modifying the assay by use of lipid coupled pH-sensitive fluorophore Oregon Green 488-DHPE (OG488) in membranes (POPC/POPS/Chol/OG488-DHPE, 54:25:20:1) allowed to correlate fluorescence intensity and intravesicular pH-shift. The pH-shift was quantified to be around 0.11 pH units leading to a conductance of 0.06 fS. This is conform to *in vitro* studies of heterologous expressed H<sub>V</sub>1.<sup>[1]</sup> The OG488-assay also allowed to estimate the  $K_D(2GBI) = 47 \pm 18 \mu\text{M}$  nearly as accurate as *in vivo* studies by Hong *et al.* do.<sup>[2]</sup>

In the third section effective preparation of tethered bilayer lipid membrane (tBLM) by spreading of proteoliposomes onto a mixed monolayer of dihydrocholesteryl (2-(2-(2-ethoxy)ethoxy)ethanethiol and 6-mercaptohexanol was established. Formation of the lipid bilayer was confirmed via impedance and surface-enhanced infrared absorption (SEIRA) spectroscopy. While characterization of the electrophysiological properties of the H<sub>V</sub>1 failed due to the indistinguishability of H<sub>V</sub>1 and blank measurement SEIRA spectroscopy verified  $\alpha$ -helical structure of the tBLM inserted H<sub>V</sub>1 channel. Thus providing the basis for further spectroelectrochemical studies in order to gain insight into the gating mechanism by drawing conclusion from voltage-dependent conformational changes of amid I band.



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Spannungsgesteuerte Membranproteine.....	5
1.1.1	Strukturelle Homologie spannungsgesteuerter Kanäle .....	6
1.2	Die Entdeckung des H <sub>V</sub> 1-Proteins: Ein historischer Rückblick .....	7
1.2.1	Biophysikalische Eigenschaften des H <sub>V</sub> 1-Protonenkanals .....	7
1.2.2	Beziehung zwischen Strukturelementen und der Funktion des H <sub>V</sub> 1-Kanals.....	8
1.2.3	Inhibition und Aktivierung des H <sub>V</sub> 1-Protonenkanals .....	16
1.2.4	Physiologische Relevanz des humanen Protonenkanals H <sub>V</sub> 1.....	18
2	Zielsetzung .....	19
3	Materialien und Methoden .....	21
3.1	Molekularbiologische Methoden .....	21
3.1.1	Plasmid Transformation in <i>E. coli</i> .....	21
3.1.2	Isolation des Plasmids pCDNA3.1X.....	23
3.1.3	Restriktionsverdau .....	25
3.1.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	26
3.1.5	Isolation einzelner DNA-Banden aus dem Agarosegel.....	27
3.1.6	Ligation der DNA-Fragmente zum Zielplasmid pH <sub>V</sub> 1WT.....	28
3.1.7	Analyse des Plasmids pH <sub>V</sub> 1WT .....	29
3.2	Proteinbiochemische Methode .....	30
3.2.1	Heterologe Proteinexpression .....	30
3.2.2	Zellyse und Protein Solubilisierung.....	33
3.2.3	Affinitätschromatographische Proteinaufreinigung.....	34
3.2.4	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	35
3.2.5	Western Blot Analyse .....	38
3.2.6	Umpufferung des Proteins per Dialyse und Aufkonzentration.....	41
3.2.7	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	42
3.2.8	Thrombinverdau .....	43
3.2.9	Analyse der Sekundärstruktur des H <sub>V</sub> 1-Proteins mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie.....	44

## Inhaltsverzeichnis

3.3	Rekonstitution des H <sub>V</sub> 1-Proteins in unilamellare Vesikel .....	48
3.3.1	Detergenzien und Lipide.....	48
3.3.2	Herstellung von Lipidfilmen .....	52
3.3.3	Rekonstitution des H <sub>V</sub> 1-Proteins in unilamellare Vesikel .....	53
3.3.4	Nachweis der Rekonstitution durch Dichtegradientenzentrifugation .....	55
3.4	Aktivitätsnachweis mittels fluoreszenzbasiertem Protonenfluss-Test .....	56
3.4.1	ACMA basierter Protonenfluss-Test.....	57
3.4.2	Oregon Green 488 basierter Protonenfluss-Test .....	60
3.4.3	Bestimmung des pK <sub>s</sub> von OG488-DHPE.....	61
3.5	Elektrophysiologische Charakterisierung des H <sub>V</sub> 1-Kanals .....	62
3.5.1	Präparation einer trägerfixierten Lipiddoppelschicht .....	63
3.5.2	Elektrochemische Impedanzspektroskopie .....	66
3.6	Oberflächenverstärkte Infrarotabsorptions-Spektroskopie.....	77
4	Ergebnisse .....	81
4.1	Heterologe Expression des rekombinanten H <sub>V</sub> 1-Proteins .....	81
4.1.1	Isolation und Transformation des Plasmids pH <sub>V</sub> 1WT.....	81
4.1.2	Zellkultivierung während der Expression.....	84
4.1.3	Identifikation des rekombinanten Proteins .....	86
4.1.4	Detergens Screening.....	87
4.1.5	Solubilisierung des H <sub>V</sub> 1-Proteins .....	89
4.1.6	Aufreinigung des H <sub>V</sub> 1-Proteins.....	90
4.1.7	Isolation von H <sub>V</sub> 1 aus BL21(DE).....	92
4.1.8	Charakterisierung des rekombinanten Proteins .....	93
4.2	ACMA basierter Rekonstitutions- und Aktivitätsnachweis.....	95
4.2.1	Rekonstitutionsnachweis mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	95
4.2.2	ACMA basierten Protonenfluss-Test.....	98
4.2.3	Nachweis der Rekonstitution des H <sub>V</sub> 1-Kanals in vorgefertigte kleine unilamellare Vesikel.....	100
4.2.4	Substitution von POPG gegen POPS.....	108
4.2.5	Variation des Protein-zu-Lipid-Verhältnisses.....	108
4.2.6	Charakterisierung der 2-Guanidinbenzimidazol Inhibition des H <sub>V</sub> 1-Kanals..	110

4.2.7	Untersuchung des Einflusses von $Zn^{2+}$ und AEA auf den $H_V1$ -Protonenkanal	112
4.2.8	Rekonstitution in große unilamellare Vesikel.....	114
4.2.9	Einfluss der Temperatur auf die Protonentranslokation.....	114
4.3	Oregon Green 488 basierte quantitative Bestimmung der pH-Änderung.....	116
4.3.1	Bestimmung des $pK_s$ von OG488-DHPE .....	116
4.3.2	OG488-DHPE basierter Protonenfluss-Assay .....	118
4.3.3	2-Guanidinbenzimidazol Inhibition der $H_V1$ Protonentranslokation .....	122
4.4	Elektrophysiologische Charakterisierung des $H_V1$ -Protonenkanals mittels Impedanzspektroskopie.....	124
4.4.1	Charakterisierung der WK3SH/6MH-Monoschicht und der darauf ausgebildeten Membran.....	124
4.4.2	Charakterisierung des spannungsabhängigen Impedanzverhaltens der tBLM	128
4.5	Charakterisierung des $H_V1$ -Protonenkanals mittels SEIRA-Spektroskopie .....	132
5	Diskussion .....	135
5.1	Heterologe Expression des $H_V1$ -Protonenkanals.....	136
5.1.1	Isolation des Plasmids $phH_V1WT$ .....	136
5.1.2	Zellkultivierung der Stämme BL21 Gen-X und BL21(DE3).....	136
5.1.3	Isolation und Aufreinigung des $H_V1$ -Proteins aus <i>Inclusion Bodies</i> .....	137
5.2	Rekonstitution des $H_V1$ -Proteins in kleine unilamellare Vesikel .....	142
5.2.1	Nachweis der funktionellen Rekonstitution des $H_V1$ -Protonenkanals .....	143
5.2.2	Orientierung des $H_V1$ -Kanals innerhalb der Proteoliposomen .....	148
5.3	Proteinaktivität und Protonentranslokationsrate des $H_V1$ -Kanals.....	151
5.3.1	ACMA basierter Protonenfluss-Test .....	151
5.3.2	Oregon Green 488 basierter Protonenfluss Nachweis .....	151
5.3.3	Inhibition und Aktivierung der $H_V1$ Protonentranslokation.....	161
5.3.4	Temperatur abhängige Steigerung des Protonenflussrate .....	168
5.4	Elektrophysiologische Charakterisierung des $H_V1$ -Kanals.....	169
5.4.1	Ausbildung der WK3SH/6MH-Monoschicht.....	169
5.4.2	Präparation einer $H_V1$ -Lipiddoppeschicht durch Vesikelspreiten.....	171

## Inhaltsverzeichnis

5.4.3	Charakterisierung des spannungsabhängigen Impedanzverhaltens H <sub>V</sub> 1-tBLM	172
5.5	Spannungsabhängige Charakterisierung des H <sub>V</sub> 1-Kanals mittels SEIRA-Spektroskopie .....	173
6	Zusammenfassung.....	175
7	Literaturverzeichnis.....	177
8	Anhang.....	197
8.1	Kodierende Nukleinsäuresequenz nach der Umklonierung .....	197
8.2	Aminosäuresequenz des H <sub>V</sub> 1-Fusionsproteins .....	198
8.3	Berechnung der Anzahl an H <sub>V</sub> 1-Kanälen pro Vesikel.....	199
8.4	Matlab Skript.....	200
8.5	Abbildungsverzeichnis .....	209
8.6	Tabellenverzeichnis.....	213
8.7	Symbol- und Abkürzungsverzeichnis .....	214
8.8	Chemikalien, Bakterienstämme und Enzyme .....	218
8.9	Materialien.....	221
8.10	Geräte- und Softwareverzeichnis .....	222



# 1 Einleitung

## 1.1 Spannungsgesteuerte Membranproteine

Membranproteine machen bis zu 20–30 % des menschlichen Genoms aus, sie sind verantwortlich für die Steuerung einer Vielzahl physiologischer Prozesse und daher mögliche Ziele von pharmakologischer Behandlungen von Krankheiten.<sup>[3,4]</sup> Dennoch sind erst wenige Membranproteine und ihre Funktionen vollständig erforscht und verstanden. So konnten bis 2008 erst weniger als 1 % der Strukturen von Membranproteinen durch Kristallographie aufgeklärt werden.<sup>[5]</sup> Spannungsgesteuerte Ionenkanäle bilden eine Klasse der Membranproteine und werden, wie der Name impliziert, durch Änderungen des elektrischen Membranpotentials gesteuert. Sie werden unterteilt in spannungsgesteuerte Kationen-, Anionen- und Protonen-Kanäle. Das Zusammenspiel der spannungsgesteuerten Kalium- ( $K_V^-$ ), Natrium- ( $Na_V^-$ ), Calcium- ( $Ca_V^-$ ) und Chlorid- ( $Cl^-$ ) Kanäle ist u. a. Grundlage der Signaltransduktion in Nervenzellen.<sup>[6]</sup> Diese wurde erstmals durch A. Hodgkin und A. Huxley beschrieben.<sup>[7]</sup> Sie bekamen dafür im Jahre 1963 den Nobelpreis für Medizin verliehen und leiteten eine bis heute andauernde Periode der Erforschung von Ionenkanälen ein. Einen wesentlichen Anteil an dem Verständnis der spannungsgesteuerten Kanäle trugen E. Neher und B. Sakman durch die Entwicklung der Patch-Clamp-Technik bei. Diese erlaubt es, die Einzelkanalströme der Kanäle in nativen zu messen.<sup>[8]</sup> Sie wurden für dafür ebenfalls mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Prominente Vertreter der Klasse der spannungsabhängigen Kationenkanäle ist u. a. der  $K_V^-$ -Kanal, welcher in humanen Nervenzellen vorliegt und zur Unterfamilie der Shaker-Kanäle gehört.<sup>[9]</sup> Für die Strukturaufklärung des homologen bakteriellen  $K^+$ -Kanals aus *Streptomyces lividans* bekam R. MacKinnon 2003 den Nobelpreis verliehen.<sup>[10]</sup> Seine Arbeit leistete einen großen Beitrag zu dem Verständnis der Struktur und Funktionsweise anderer spannungsgesteuerter Kanäle. Neben der Übertragung von Nervenimpulsen besitzen spannungsgesteuerte Kanäle vielfältige Funktionen. Der hERG-Kanal (engl. *human Ether-a-go-go Related Gene*), welcher zu den Kaliumkanälen zählt, ist im Herzmuskel lokalisiert und für dessen Aktivität verantwortlich.<sup>[11]</sup> In Spermienzellen wurden vier spezifische  $Ca^{2+}$ -Kanäle identifiziert, diese werden daher als CatSper-Kanäle bezeichnet. Sie sind essenziell für die Beweglichkeit und der damit verbundenen Fruchtbarkeit von Spermien.<sup>[12]</sup> Weniger selektiv ist der, in der äußeren Mitochondrienmembran vorkommende, spannungsabhängige Anionen-Kanal (engl. *voltage-dependent anion channel*, VDAC) der für den Transport von Metaboliten wie ATP, Glutamat und Malat verantwortlich ist.<sup>[13,14]</sup> Der Protonenkanal  $H_V1$  ist ein außergewöhnlicher Kanal. Er reguliert neben dem CatSper-Kanal die Mobilität von Spermien, sowie den pH-Wert der *Airway Surface Liquid* (ALS) und ist ebenso wesentlicher Bestandteil des humanen Immunsystems.<sup>[15–18]</sup>

## Einleitung

### 1.1.1 Strukturelle Homologie spannungsgesteuerter Kanäle

Die Funktionsweise der spannungsgesteuerten Kationenkanäle hat sich in der Evolution offensichtlich bewährt, denn ihr Strukturmotiv ist in über hundert Proteinen konserviert worden. Spannungsgesteuerte Kationenkanäle bestehen im allgemeinen aus vier identischen Untereinheiten, welche jeweils aus 6 transmembranen,  $\alpha$ -helikalen Segmenten (S1–S6) zusammengesetzt sind (siehe Abbildung 1-1). Diese werden wiederum, auf Grund ihrer physiologischen Funktion, unterteilt in zwei Domänen. Die Segmente S1–S4 bilden den Spannungssensor der Kanäle und werden daher auch als spannungsdetektierende Domäne (engl. *voltage-sensing domain*, VSD) bezeichnet (vgl. Abbildung 1-1 grüne Helices).<sup>[19–22]</sup> Das fünfte und sechste transmembrane Segment tragen zur Bildung der Kanalpore bei, daher wird dieser Teil auch *pore domain* (PD) (siehe Abbildung 1-1 rote Helices) genannt. Während Kalium-, CatSper- und TRP- (engl. *transient receptor potential*)-Kanäle als Tetramer vorliegen, sind die 4 Untereinheiten der Natrium- und Calciumkanäle in einem Protein organisiert.<sup>[23,24]</sup>

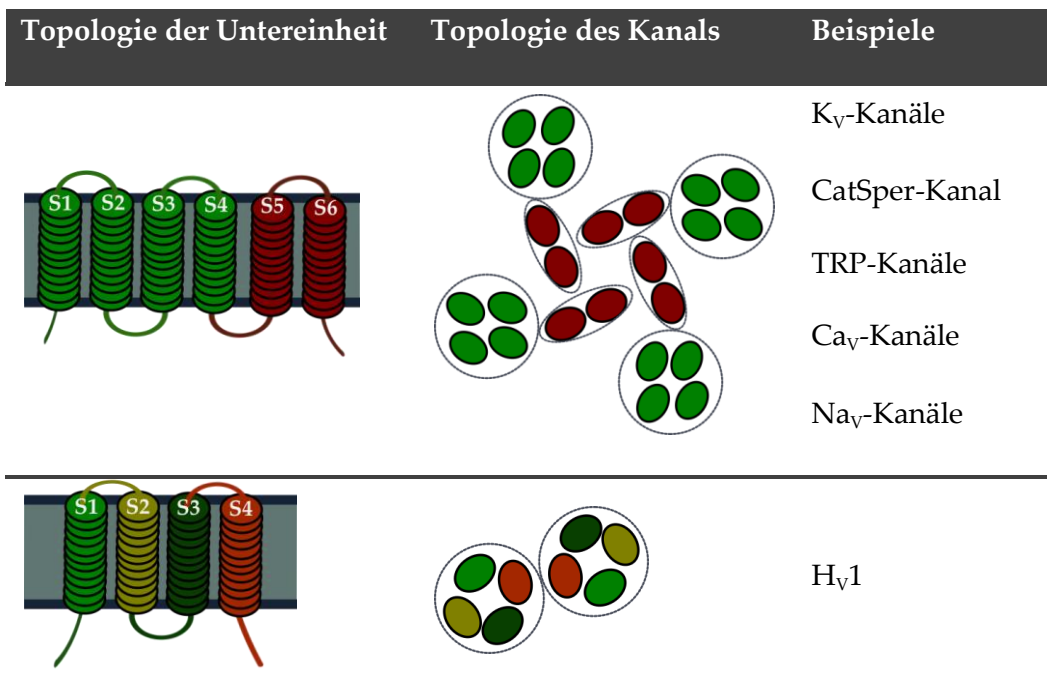


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Topologie spannungsgesteuerter Kationen- und Protonenkanäle. Kationenkanäle werden aus 4 Untereinheiten gebildet. Jede Untereinheit besteht aus 6 Helices (S1–S6). Die transmembranen Segmente S1–S4 formen die spannungssensitive Domäne (VSD) während aus einem Tetramer der Segmente S5–S6 die Pore gebildet wird. Der Protonenkanal H<sub>V</sub>1 hingegen liegt als Dimer vor. Wobei jede Untereinheit, welche homolog zu der VSD der Kationenkanäle ist, eine protonenleitende Pore darstellt. Angefertigt nach Elinder *et al.* und Moreau *et al.*<sup>[19,21]</sup>

Im Vergleich zu den spannungsgesteuerten Kationenkanälen, besitzt der spannungsgesteuerte Protonenkanal H<sub>V</sub>1 besondere Merkmale. Er besitzt eine zu den VSDs der Kationenkanäle homologe Aminosäuresequenz, jedoch fehlt die PD gänzlich. Daher wurde der Kanal bei seiner Entdeckung auch als *voltage-sensor domain-only protein* (VSOP) bezeichnet.<sup>[25,26]</sup> Des Weiteren konnte eine Homologie zu der VSD der spannungsgesteuerten

Phosphatase aus *Ciona intestinalis* (Ci-VSP) bestätigt werden.<sup>[27]</sup> Die vier transmembranen Domänen, welche das humane HVCN1 (engl. *voltage-gated hydrogen channel 1*)-Gen kodiert, formen sowohl den Spannungssensor als auch die Pore des Kanals. In heterologen wie nativen Expressionssystemen konnte beobachtet werden, dass der Kanal als Homodimer vorliegt, wobei jede Untereinheit in der Lage ist, Protonen zu leiten.<sup>[28–30]</sup>

### 1.2 Die Entdeckung des H<sub>V</sub>1-Proteins: Ein historischer Rückblick

Seitdem im Jahr 1982 erstmals die Existenz eines spannungsabhängigen Protonenkanals in den Neuronen der gefleckten Weinbergschnecke (*Helix aspersa*) diskutiert wurde, konnte der spannungsgesteuerte Protonenkanal 1 (H<sub>V</sub>1) bisher in 38 verschiedenen Organismen identifiziert werden.<sup>[31, 32, 33]</sup> Den Nachweis ähnlicher spannungssensitiver Protonenströme in Säugetierzellen erbrachten DeCoursey *et al.* 1993 durch *voltage-clamp*-Messungen an Alveolarepithelzellen von Ratten.<sup>[34]</sup> Im Jahre 2006 fanden Sasaki *et al.* bei einem Sequenzalignment, dessen Grundlage die DNA-Sequenz der VSD der Ci-VSP war, eine homologe DNA-Sequenz in Mäusen. Diese kodierte ein Protein, welches vier statt der für spannungsgesteuerte Kationenkanäle üblichen sechs transmembranen Segmente besitzt. Sie nannten das Protein daher *mouse voltage-sensor only protein* (mVSOP, mH<sub>V</sub>1). Sie konnten das Protein in tsA201-Zellen exprimieren und dieses als selektiven Protonenkanal klassifizieren.<sup>[26]</sup> Ramsey *et al.* identifizierten durch ein Sequenzalignment auf Grundlage der Sequenzen spannungsgesteuerter Kationenkanäle das H<sub>V</sub>1 Gen im zwölften humanen Chromosom. Ein bioinformatischer Abgleich der DNA-Sequenz zeigte, dass das korrespondierende Protein in humanen Lymphozyten und Monozyten exprimiert wird. Sie konnten den Kanal in HEK-Zellen exprimieren und dessen Spannungsabhängigkeit verifizieren.<sup>[25]</sup> Durch die heterologe Expression, Aufreinigung aus *Pichia pastoris* und der Rekonstitution des H<sub>V</sub>1-Proteins verifizierten Lee *et al.*, dass die spannungsdetektierende Domäne zugleich für die Protonentranslokation verantwortlich ist.<sup>[1]</sup> 2016 erfolgte die Verifizierung des Kanals in Insekten, genauer in *Nicoletia phytophila*.<sup>[33]</sup> Vor kurzem konnte die Präsenz des H<sub>V</sub>1 in der Dinoflagellaten, welche bereits 1972 von Hastings und Fogel diskutiert wurde, nachgewiesen werden.<sup>[32,35,36]</sup> Allein im Menschen wird der Kanal in 11 verschiedenen Zelltypen exprimiert.<sup>[37]</sup> Dabei wurde H<sub>V</sub>1 in allen Leukozyten, aber auch in Spermien, Epithelzellen der Atemwege und Gliazellen des zentralen Nervensystems identifiziert.<sup>[17,18,34,38–41]</sup>

#### 1.2.1 Biophysikalische Eigenschaften des H<sub>V</sub>1-Protonenkanals

Der spannungsgesteuerte Protonenkanal H<sub>V</sub>1, auch bekannt als HVCN1 (engl. *voltage-gated hydrogen channel 1*) nimmt nicht nur auf Grund des Fehlens einer Porendomäne eine Sonderstellung ein. Er besitzt eine außergewöhnlich hohe Selektivität für Protonen

## Einleitung

gegenüber anderen Kationen wie Natrium oder Kalium.<sup>[42-44]</sup> Das Permeabilitätsverhältnis des Kanals für Protonen in Relation zu diesen Kationen beträgt etwa  $10^6$ . Dies ist auch notwendig, da die Protonenkonzentration in Zellen unter physiologischen Bedingungen etwa um denselben Faktor unterhalb der Kationenkonzentration liegt.<sup>[6]</sup> Daneben zeichnet sich der Kanal durch eine relativ kleine Leitfähigkeit im Vergleich zu anderen Kanälen aus. DeCoursey und Cherny bestimmten in humanen Neutrophilen einen Leitwert von etwa 10 fS was einem Fluss von etwa 6000  $H^+/s$  entspricht.<sup>[45]</sup> Zehn Jahre später ermittelten sie durch eine genauere Analyse des Rauschsignals der Einzelkanalmessungen an humanen Eosinophilen einen Leitwert von etwa 140 fS.<sup>[46]</sup> Die Leitfähigkeit von Kationenkanälen liegt hingegen im pS-Bereich.<sup>[47,48]</sup> Für den M2-Protonenkanal des Influenzavirus wurde ebenfalls ein Betrag von 10 pS dokumentiert.<sup>[49]</sup> Die Kanalöffnung erfolgt *in vivo* ab einem Schwellenpotential von 20 mV.<sup>[34,42]</sup> Heterolog exprimierte Protonenkanäle weisen Schwellenpotentiale im Bereich von 11 mV bis hin zu leicht negativen Potentialen auf.<sup>[25,50]</sup> Ein Charakteristikum des  $H_v1$ -Protonenkanals ist die Abhängigkeit der Schwellenspannung (engl. *threshold voltage*) von der Differenz des extra- und intrazellulären pH-Wertes ( $\Delta pH = pH_o - pH_i$ ). Es wurde sowohl für native als auch heterologe  $H_v1$ -Kanäle eine einheitliche Verschiebung von -40 mV pro pH-Einheit beobachtet.<sup>[25,26,34,45,51]</sup> Hierbei ist es gleichgültig, ob  $pH_o$  erhöht oder  $pH_i$  gesenkt wird. Neben dieser pH-Abhängigkeit besitzt der Kanal eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit der Protonenströme. Der Faktor der Änderung der Protonenströme bei einer Temperaturerhöhung um 10 K, der sogenannte  $Q_{10}$ -Wert, liegt bei 2.2 bis 5.3.<sup>[52-54]</sup> Der native humane Kanal besitzt bei einer Länge von 273 Aminosäuren eine Molekülmasse von 31.7 kDa.<sup>[25]</sup>

### 1.2.2 Beziehung zwischen Strukturelementen und der Funktion des $H_v1$ -Kanals

Unmittelbar auf die Entdeckung des  $H_v1$ -Kanals folgten zahlreiche Publikationen, die zur Aufklärung der Proteinstruktur und der Funktion einzelner Strukturelemente beitrugen. Die Sequenzhomologie zu den spannungsgesteuerten Kationenkanälen bot hierbei die Möglichkeit einzelne Sequenzabschnitte gezielt zu substituieren. Aus einem Vergleich der Eigenschaften künstlicher Proteinkonstrukte und dem Wildtyp konnten Rückschlüsse auf die Beziehung zwischen den ausgewählten Strukturelementen und der Funktion des  $H_v1$ -Kanals gezogen werden. Die strukturellen Untereinheiten des Proteins bilden der N-Terminus, die transmembranen Segmente S1-S4 sowie der C-Terminus. Der N- und der C-Terminus liegen im intrazellulären Raum vor, während die Segmente S1-S4 in der Membran verankert und über extra- wie intrazelluläre Schleifen verbunden sind (siehe Abbildung 1-2).

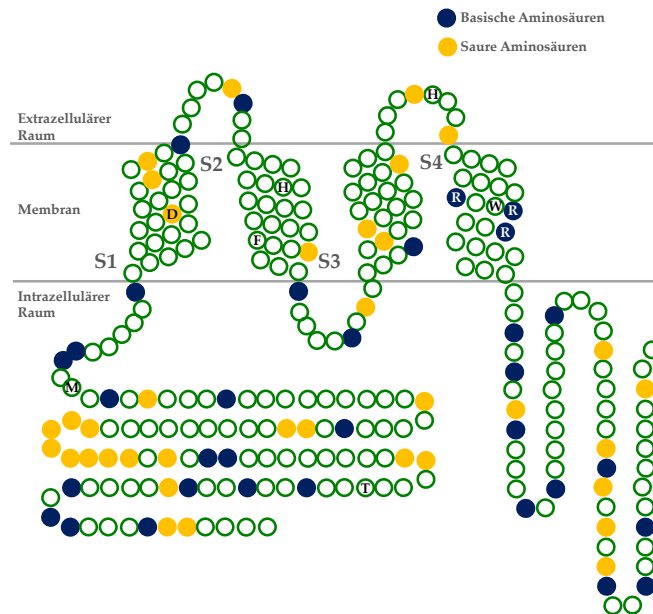


Abbildung 1-2: Schematische, topologische Darstellung der Aminosäuresequenz (UniProtKB-Q96D96) des hH<sub>v</sub>1-Protonenkanals. Der N-Terminus besitzt eine Länge von etwa 100 Aminosäuren (AS) und liegt wie der C-Terminus (AS 221–273) intrazellulär vor. Die transmembranen Segmente S1–S4, welche die Pore ausbilden, sind über extra- und intrazelluläre kurze Aminosäuresequenzen verbunden. Die saure Asparaginsäure an Position 112 (D) gilt als essentiell für die hohe Selektivität des Kanals. Drei basische Arginine an den Positionen 205, 208 und 211 bilden den Spannungssensor des Kanals. Angefertigt nach DeCoursey *et al.*<sup>[16,55]</sup>

### 1.2.2.1 Modulation der Kinetik und pH-Sensitivität durch Variation des N-Terminus

Das N-terminale Ende des humanen H<sub>v</sub>1-Proteins besitzt eine Länge von 100 Aminosäuren und beeinflusst die Kinetik des Kanal während des Öffnens und Schließens.<sup>[55,56]</sup> N-terminal verkürzten Varianten des Proteins weisen im Vergleich zum Wildtyp ähnliche Protonenströme und Schwellenpotentiale auf, jedoch ist die Kinetik der Öffnung bzw. Aktivierung des Kanal etwa 5–6 mal schneller. Dies konnte anhand von Studien an HEK-Zellen beobachtet werden.<sup>[57,58]</sup> Auf der Basis von Immunpräzitationsexperimenten wurde zudem ein Beitrag des N-Terminus zur Dimerisierung des Kanals diskutiert.<sup>[57,59]</sup> Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Inhibition des mH<sub>v</sub>1-Kanals bei den Entfernung des N-Terminus geringer ausfällt.<sup>[54]</sup> Im Jahr 2014 wurde die Existenz einer natürlichen N-terminal verkürzten Isoform des H<sub>v</sub>1-Protonenkanals in B-Lymphozyten von Patienten, welche an chronischer lymphatischer Leukämie leiden, nachgewiesen.<sup>[60]</sup> Dieser Isoform fehlen die ersten 20 Aminosäuren. Sie wies im Vergleich zum vollständigen Kanal eine ähnliche Schwellenspannung und pH-Abhängigkeit dem Wildtyp auf, zeigte jedoch eine verlangsamte Aktivierung unter normalen Bedingungen gegenüber dem Wildtyp. Die beiden Kanäle reagierten jedoch deutlich differenziert auf eine Aktivierung der Kanäle durch die Phorbolmyristatacetat (PMA) stimulierte Phosphorylierung durch Proteinkinase C

## Einleitung

(PKC). Die kurze H<sub>V</sub>1-Variante wies einen deutlich stärkeren Effekt der Aktivierung auf.<sup>[60]</sup> Der Effekt der Phosphorylierung versetzt den H<sub>V</sub>1-Kanal in einen sogenannten „*enhanced gating mode*“. Dieser wurde in Basophilen und Eosinophilen aber nicht in HEK- und COS-Zellen beobachtet.<sup>[16,55,56]</sup> In nativen Zellen geht die Aktivierung des H<sub>V</sub>1-Kanals mit einer Aktivierung der NADPH-Oxidase während des oxidativen Burst einher. In Mutationsstudien wurde die Threoninseitenkette an der Aminosäureposition 29 des humanen H<sub>V</sub>1-Kanals als Angriffspunkt der Phosphorylierung identifiziert.<sup>[60,61]</sup> Hieraus leitet sich eine besondere Bedeutung des N-terminalen Endes für die Proteinaktivierung ab. Eine zweite um 68 Aminosäuren verkürzte Isoform des H<sub>V</sub>1-Kanals konnte durch Berger *et al.* in Spermienzellen identifiziert werden. Diese als H<sub>V</sub>1Sper bezeichnete Variante des Kanals entsteht durch posttranslationale Modifikation.<sup>[62]</sup> Der H<sub>V</sub>1Sper-Kanal reagierte im Unterschied zum Wildtyp nicht nur auf die Änderung von  $\Delta pH$  (vgl. Abschnitt 0), sondern auch auf eine Änderung von  $pH_i$  und  $pH_o$  bei konstantem  $\Delta pH$ .<sup>[62]</sup> Die Modulation der pH-Sensitivität des Kanals durch den N-Terminus wurde zudem durch die Identifikation einer natürlichen Mutante des Kanals in Lungenepithelzellen bestätigt.<sup>[63]</sup> Der Austausch von Methionin (an Position 91, siehe Abbildung 1-2) gegen Threonin resultiert in einer Verschiebung der Schwellenspannung zu positiveren Potentialen.<sup>[63]</sup>

### 1.2.2.2 Funktionelle Bedeutung der transmembranen Segmente S1–S4

Die transmembranen Segmente S1–S4 bilden den Kern des H<sub>V</sub>1-Proteins. Sie beinhalten Aminosäuren, die sowohl die hohe Protonen Selektivität, als auch die Spannungssensitivität des Kanals steuern. Zudem konnten verschiedene inhibitor- bzw. aktivator-bindende Seitenketten identifiziert werden. Durch intensive Mutationsstudien an heterologen H<sub>V</sub>1-Proteinen wurde die Asparaginsäure an Position 112 (Asp112, D1 siehe Abbildung 1-2), welche in der S1-Helix lokalisiert ist, als essentielle Aminosäure für die Selektivität des Kanals identifiziert.<sup>[64,65]</sup> Eine Substitution der Asparaginsäure durch Leucin führte zu einer drastischen Reduktion der Protonentranslokationsrate, während ein Austausch von Asp112 durch neutrale Aminosäuren wie Asparagin, Alanin, Phenylalanin und Serin eine Chloridionen-Leitfähigkeit des Kanals zur Folge hatte.<sup>[64]</sup>

An den Positionen 140 und 193, welche beide im bzw. nahe des extrazellulären Raums lokalisiert sind, liegen zwei Histidine (H140 und H193) vor (vgl. Abbildung 1-2). Studien zeigten, dass diese für die Bindung von Zinkionen und der damit einhergehenden Inhibition des Kanals relevant sind (vgl. Abschnitt 1.2.3).<sup>[54]</sup>

Eine ebenfalls inhibierende Wirkung auf den Kanal üben Guanidinderivate aus. Diese interagieren unter anderem mit der Phenylalaninseitenkette an Position 150 (Phe 150) in der S2-Helix (vgl. Abschnitt 1.2.3).<sup>[2,66,67]</sup> Zudem wird auf Basis von Molekulardynamik-Simulationen eine zentrale Rolle des Phe150 beim Protonentransport diskutiert.<sup>[58,68–70]</sup>

Hierbei wird angenommen, dass die Phe-Seitenkette in die Pore des Kanals hineinragt und unterhalb der Asp112-Seitenkette lokalisiert ist. Des Weiteren wird eine Wechselwirkung mit dem Guanidinium-Rest der Argininseitenkette an Position 211 vermutet. Dieser wird durch eine Umorientierung des Phe-Restes, welche durch die Anwesenheit eines Protons in der Pore begünstigt wird, aufgehoben und ermöglicht die Protonierung des Asp112.<sup>[70]</sup>

Ein weiteres Hauptstrukturmerkmal des H<sub>v</sub>1-Kanals sind die drei positiven Argininseitenketten an den Positionen 205, 208 und 211 (Arg205 (R1), Arg208 (R2), Arg211 (R3)) des humanen Proteins (siehe Abbildung 1-2). Diese sind auch in spannungsgesteuerten Kationenkanälen konserviert und liegen auch dort in der S4-Helix vor. Jedoch besitzen die Kationenkanäle mindestens eine weitere Argininseitenketten.<sup>[71]</sup> Die positiven Seitenketten sind essentiell für die Spannungsdetektion und der damit einhergehenden Steuerung der Aktivierung bzw. Deaktivierung (engl. *gating*) des Kanals.<sup>[25,26]</sup> Die Substitution des ersten Arginins gegen Alanin oder Glutamin resultiert in einer Verschiebung der Schwellenspannung zu positiveren Potentialen. Zudem wurde eine schnellere Aktivierung des Kanals beobachtet.<sup>[25,26]</sup> Eine Mutation des R3 hatte einen deutlich geringeren Effekt zur Folge.<sup>[25,26]</sup> Sakata *et al.* konstruierten verschiedene verkürzte Versionen des Kanals, wobei der Schnitt jeweils vor einem der Arginine erfolgte. Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen machten deutlich, dass eine komplette Entfernung in einem Erliegen der Protonenströme resultierte. Im Kontrast zu den beschriebenen Mutationsexperimenten beobachteten sie, dass ein Schnitt zwischen R2 und R3 zu einer deutlichen Reduktion der Ströme und einer Verschiebung der Schwellenspannung führt.<sup>[72]</sup> Eine Serinmutation an R3 ermöglichte wiederum die Leitung von Lithium- und Guanidiniumkationen.<sup>[73]</sup> In jüngeren Studien wurde kontrovers die Wechselwirkung eines basischen Arginins- und dem, in der S1-Helix lokalisierten, sauren Asparaginsäurerest (Asp112) im offenen Zustand diskutiert.<sup>[67-69,73-77]</sup> Die Bildung eines Asp-Arg-Paares durch Wasserstoffbrückenbindungen ist Grundlage des Selektivitätsfilters des Kanals und stabilisiert seinen Zustand. Ob im aktivierten Zustand jedoch eine Wechselwirkung zwischen R2 und D1 oder R3 und D1 vorliegt, konnte bis heute trotz verschiedener Mutationsexperimente nicht abschließend geklärt werden.

## Einleitung

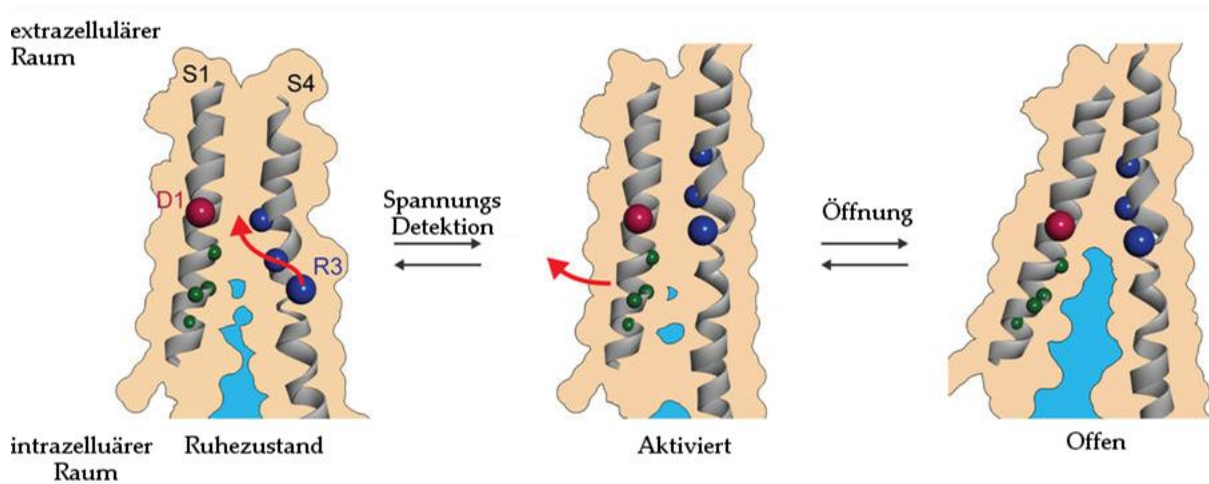


Abbildung 1-3: Modell der strukturellen Konformationsänderung während der Öffnung des  $H_v1$ -Protonenkanals nach Mony *et al.*<sup>[74]</sup> Die Aktivierung des Kanal resultiert aus einer Umorientierung der S4-Helix, welche auf Grund der Depolarisation von der „down“-Konformation im geschlossenen Zustand in die „up“-Konformation wechselt. Hierbei kommt es ebenfalls zu einer Rotation der S4-Helix. Die Öffnung des Kanals wird anschließend durch eine Änderung der S1-Helix induziert.

Die Wechselwirkung des Asp-Arg-Paares ist Voraussetzung für die Protonentranslokation und impliziert eine vorausgehende Änderung der Konformation der Kanalstruktur. Gonzalez *et al.* diskutierten anhand von *voltage-clamp* Fluorometrie Experimenten, dass eine Öffnung des  $H_v1$ -Kanals aus der Verschiebung der S4-Helix, relativ zu den übrigen Helices, in Richtung des extrazellulären Raums resultiert.<sup>[59]</sup> In weiteren Studien wurde eine Konformationsänderung zur Öffnung des Kanals beschrieben, welche aus der Umorientierung der S4- und der S1-Helix resultiert (siehe Abbildung 1-3).<sup>[74,77,78]</sup> Nach dem in Abbildung 1-3 dargestellten Modell erfolgt zunächst eine rotierende aufwärts Bewegung der S4-Helix, welche die Aktivierung des Kanals zur Folge hat. Hierbei wird die Bildung des Asp-Arg-Paares zwischen R3 und D1 initiiert. Die Interaktion zwischen R1 und R2, welche den Ruhezustand stabilisiert, wird dabei aufgehoben. In einem zweiten Schritt erfolgt die Umorientierung der S1-Helix, welche den Einstrom von Wasser in die Pore zur Folge hat und so die Protonenleitung entlang protonierbarer Seitenketten ermöglicht.<sup>[74]</sup> Basierend auf der Kristallstruktur der Ci-VSD und Elektronenspinresonanz-Spektroskopie an der Ci-VSD und dem  $hH_v1$ -Kanal wurde postuliert, dass die S4-Helix eine deutlich geringere Aufwärtsbewegung vollzieht als bis dato angenommen.<sup>[79,80]</sup> In dem von Li *et al.* vorgestellten „one-click“-Modell vollzieht die S4-Helix lediglich eine Drehung. Die Interaktion zwischen Asp122 und R1 im geschlossenen Zustand geht hierbei in eine Wechselwirkung von Asp122 und R2 im aktiveren Zustand über.<sup>[79]</sup>

Auch wenn die strukturellen Änderung während der Kanalöffnung nicht vollständig aufgeklärt werden konnten, so wurde aus den Ergebnissen der zahlreichen Untersuchungen zum Einfluss einzelner Seitenketten auf die Protonenselektivität bzw. den *gating*-Mechanismus erfolgreich der Mechanismus der Protonenleitung abgeleitet. Zunächst wurde



noch die Existenz einer wassergefüllten Pore diskutiert.<sup>[58,81]</sup> Jedoch gilt die Translokation entlang titrierbarer Seitenketten, auf Grundlage des Grotthuss-Mechanismus als wahrscheinlicher.<sup>[52,70,76,82]</sup>

### 1.2.2.3 Dimerisation als Konsequenz der Interaktion der C-terminalen Enden

Die letzten 52 Aminosäuren des hH<sub>v</sub>1-Proteins bilden den C-Terminus (vgl. Abbildung 1-2). Lee *et al.* konnten im Jahr 2008 anhand der Vernetzung von Cysteinen und Western Blot Analyse als Erste zeigen, dass der Kanal als Dimer vorliegt. Sie diskutierten eine Stabilisierung des Dimers auf Grund der Wechselwirkung zweier Monomere im Bereich der natürlichen Cysteine (an Position 249).<sup>[28]</sup> Auf Grund der Markierung des Kanals mit dem grün fluoreszierenden Protein (engl. *green fluorescent protein*, GFP) war es möglich die Anzahl der Untereinheiten durch das Bleichen des GFP zu bestimmen.<sup>[83,30]</sup> Tombola *et al.* konnten hierdurch bestätigen, dass der H<sub>v</sub>1-Kanal als Homodimer vorliegt. Auf Grund einer Substitution durch das C-terminale Ende der spannungsgesteuerten Phosphatase konnte zudem nachgewiesen werden, dass der C-Terminus der H<sub>v</sub>1-Proteins essenziell für die Dimer-Bildung ist.<sup>[30]</sup> Die Protonleitfähigkeit der einzelnen Untereinheiten konnten durch die Konstruktion künstlicher Mono- und Dimere sowie Mutationsstudien belegt werden.<sup>[30]</sup> Anhand von Förster-Resonanzenergietransfer-Studien konnte die Bildung von H<sub>v</sub>1-Dimeren bestätigt werden und ebenso gezeigt werden, dass Dimere durch eine Entfernung des C-Terminus ausbleiben.<sup>[57]</sup> Da die verkürzte Variante des Proteins eine im Vergleich zum Wildtyp ähnliche Leitfähigkeit besaß, wurde geschlussfolgert, dass alleine die spannungsdetektierende Domäne für die Leitung der Protonen verantwortlich ist. Tombola *et al.* wiesen anschließend die positive Kooperativität der Kanalöffnung in Dimeren nach und diskutierten die Beteiligung der Glutaminsäure an Position 153 an diesem Effekt.<sup>[84]</sup> Zum gleichen Zeitpunkt veröffentlichten Gonzalez *et al.* eine Studie, die basierend auf *voltage-clamp* Fluorometrie eine kooperative Öffnung des Kanals beschreibt. Sie diskutierten, dass eine Öffnung des Kanals erst erfolgt, wenn beide S4 Helices des Dimers in die extrazelluläre Richtung bewegen und in der sogenannten „up“-Konformation vorliegen.<sup>[59]</sup> Die  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur des C-Terminus wurde durch Zirkulardichroismus-Spektren bestätigt.<sup>[85,86]</sup> Li *et al.* und Fujiwara *et al.* wiesen unabhängig voneinander anhand der Kristallstrukturen der C-terminalen Domänen die Bildung einer *Coiled-coil* Struktur nach, welche die Dimerisierung des Kanals zur Folge hat.<sup>[85,86]</sup> Sie konnten zeigen, dass dem *Coiled-Coil* eine Heptaden-Wiederholung (engl. *heptad repeat*) zugrunde liegt. Die Position der Aminosäuren innerhalb einer Heptaden-Wiederholung werden mit a-b-c-d-e-f-g gekennzeichnet (vgl. Abbildung 1-4). Sie beschrieben eine Interaktion der Reste der Positionen a und d bzw. c und f. Diese werden im humanen Kanal durch Leucine, Lysine, Isoleucine, Cysteine (hier C249), Asparagine und Histidine besetzt. Dies stützt die These wonach das Cystein an Position 249 erheblich zur Stabilisierung der Dimers beiträgt.<sup>[28]</sup> Sie diskutierten des Weiteren eine Stabilisierung der Struktur durch geladene und polare Aminosäuren an den Positionen b

## Einleitung

und g. Zudem konnten Li und Mitarbeiter zeigen, dass der Carboxy-Terminus essenziell für die Lokalisation des Proteins in der intrazellulären Membran von HeLa-Zellen verantwortlich ist. Zudem konnten sie nachweisen, dass die Sekundärstruktur einer pH-abhängigen Änderung unterliegt. Sie leiteten hieraus ab, dass der C-Terminus mit verantwortlich ist für die pH-Abhängigkeit der Schwellenspannung.

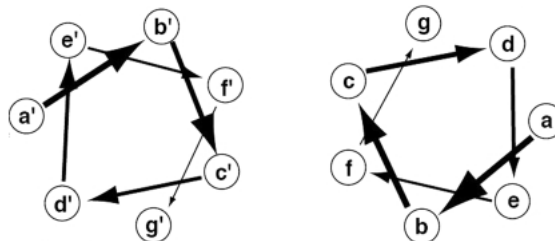


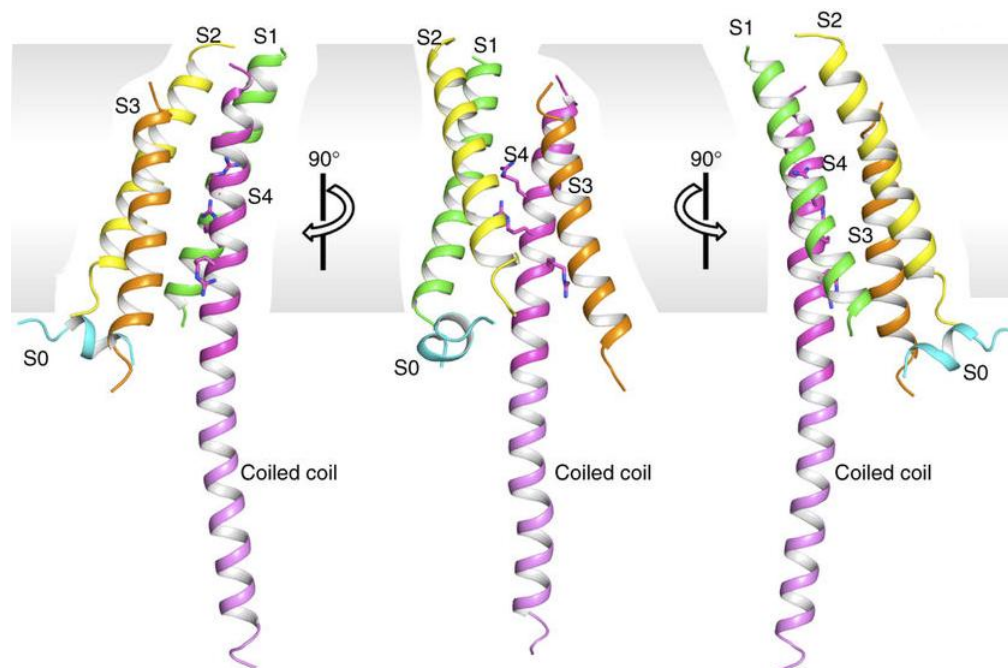
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Positionen der Aminosäuren innerhalb der Heptaden-Wiederholung. Diese sind wiederholend mit a bis g gekennzeichnet. Nach Li *et al.*, welche die Kristallstruktur des humanen Kanals untersuchten, sind die Aminosäurereste an den Positionen c und f für die Wechselwirkung der beiden  $\alpha$ -helikalen C-termini verantwortlich.<sup>[85]</sup> Fujiwara beschrieben hingegen eine Wechselwirkung der Reste a und d für den mH<sub>V</sub>1.<sup>[86]</sup> Abbildung aus Li *et al.*<sup>[85]</sup>

Fujiwara *et al.* untersuchten die *Coiled-coil* Struktur des Kanals von Mäusen (mH<sub>V</sub>1). Durch den Vergleich des Wildtyp-Proteins mit H<sub>V</sub>1- $\Delta$ C konnten sie die kooperative Steuerung des Öffnens und Schließens nachweisen. Eine Beteiligung der C-terminalen Domäne an der Temperaturabhängigkeit des Kanals schlossen sie jedoch aus. In einer weiteren Studie der Kristallstruktur der C-terminalen Domäne bestätigen Fujiwara *et al.* eine essentielle Beteiligung des Cystein 249 an der Stabilisierung des *Coiled-coil*.<sup>[87]</sup>

### 1.2.2.4 Kristallstruktur des H<sub>V</sub>1-Kanals

Bis heute existiert lediglich die Röntgen-Kristallstruktur eines chimären mH<sub>V</sub>1-Kanals in einem geschlossenen Zustand (siehe Abbildung 1-5).<sup>[88]</sup> Takeshita *et al.* ersetzten hierbei die C-terminale *Coiled-Coil* Struktur durch ein Leucin-Zipper-Motiv. Dieses besitzt eine analoge Heptaden-Wiederholung. Des Weiteren wurde die Aminosäuresequenz von der Mitte der S2-Helix bis zur Mitte der S3-Helix durch den entsprechenden Abschnitt der spannungsgesteuerten Phosphatase aus *Ciona intestinales* ausgetauscht und der N-Terminus (AS 1-74) zum Großteil entfernt. Hierdurch wurde eine erhöhte Temperaturstabilität des chimären Proteins erzielt. Das chimäre Protein wurde heterolog in HEK-Zellen exprimiert. Auf Basis der Kristallstruktur, deren Form als geschlossener Regenschirm beschrieben wurde, wurde nachgewiesen, dass der C-terminus und die S4-Helix eine einheitlich, gebogene helikale Struktur ausbilden. Es konnte gezeigt werden, dass der verkürzte Rest des N-Terminus eine kurze Helix ausbildet, welche nahezu senkrecht zu den transmembranen Segmenten steht und im Bereich der Kopfgruppen der Lipidmembran lokalisiert ist. Takeshita *et al.* sahen in dieser speziellen Orientierung die Grundlage für die Verankerung

des Kanals. Zudem könnte dies den regulierenden Einfluss des *N*-Terminus erklären. Durch eine Kristallisierung unter Zusatz von Zinkionen konnte verifiziert werden, dass die Histidine an Position 136 und 189 (entsprechend H140 und H193 des hH<sub>V</sub>1) diese koordinieren und weitere saure Aminosäuren an Position 115 und 119 zu der Stabilisierung des Zinkions beitragen. Ausgehend von der Elektronendichte postulierten Takeshita *et al.*, dass R1 und R2 dichter beieinander liegen als angenommen und eine  $3_{10}$ - statt eine  $\alpha$ -helikale Struktur in diesem Bereich vorliegt. Da in der beobachteten Kristallstruktur des chimären mH<sub>V</sub>1 R2 und R3 nicht oberhalb der in der Mitte der S2-Helix lokalisierten Phenylalaninseitenkette lagen, wurde angenommen, dass der Kanal im Ruhezustand vorliegt.



**Abbildung 1-5:** Kristallstruktur des chimären mHV1-Kanals im geschlossenen Zustand nach Takeshita *et al.*<sup>[88]</sup> Die Struktur zeigt, dass die S4-Helix und das C-terminalen Ende des Kanals eine durchgängige, gebogene helikale Struktur ausbilden. Zudem weist der verkürzte *N*-Terminus des Kanals ebenfalls eine helikale Struktur auf (S0), welche senkrecht zu den transmembranen Segmenten S1–S4 angeordnet ist und im Bereich der Kopfgruppen der Lipidmembran den Kanal verankert.

Trotz des Beitrages der Kristallstruktur des chimären mH<sub>V</sub>1-Kanals zu einem detaillierteren Verständnis der Einflüsse von *N*- und *C*-terminus, konnte der genaue Mechanismus der Spannungsdetektion und die einhergehende Strukturänderung des Kanals auf molekularer Ebene noch nicht vollständig aufgeklärt werden.

## Einleitung

### 1.2.3 Inhibition und Aktivierung des H<sub>V</sub>1-Protonenkanals

Die Inhibition des spannungsgesteuerten Protonenkanals durch divalente Zinkkationen ist in der Vergangenheit gleichermaßen umfassend charakterisiert worden wie dessen Spannungsabhängigkeit. Die Reduktion der Protonenströme durch zweiwertige Cadmium-, Cobalt- und Zinkkationen wurde dabei bereits durch Thomas und Meech bei ihrer Untersuchung an Schneckenneuronen beschrieben.<sup>[31]</sup> Thomas DeCoursey und Vladimir Cherny studierten intensiv die Protonenströme in Säugetierzellen, genauer in Alveolarepithelzellen von Ratten. Sie konnten zum einen nachweisen, dass Zink im Vergleich zu anderen Kationen potentere Inhibitoren sind und dass die Inhibition eine pH-Abhängigkeit besitzt.<sup>[34,89]</sup> Bei einem intrazellulären pH-Wert von 5.5 konnten sie für einen extrazellulären pH-Wert von 7.0 eine 1000-fach stärkere Inhibition des Kanalöffnungsgeschwindigkeit im Vergleich zu pH<sub>o</sub> = 5.0 detektieren. Hierbei lag die extrazelluläre Zinkkonzentration im Bereich von 10 μM.<sup>[89]</sup> Sie konnten zudem zeigen, dass intrazelluläre Zinkionen einen deutlich geringeren inhibierenden Einfluss ausüben. Aus einer Modellierung der pH<sub>o</sub> abhängigen Zinkinhibition der Kanalöffnungsgeschwindigkeit leiteten sie ab, dass zwei bis drei extrazelluläre, protonierbare Gruppen wie etwa Histidine die Zinkionen koordinieren. Ramsey *et al.* überprüften diese These nach ihrer Identifikation des hH<sub>V</sub>1-Proteins und substituierten die Histidine an den extrazellulären Position 140 und 193 (His140 und His193, vgl. Abbildung 1-2) durch Alanine. Durch eine einfache Mutation wurde die Inhibition der Zinkionen deutlich reduziert und konnte durch die gleichzeitige Mutation beider Positionen nahezu vollständig unterdrückt werden.<sup>[25]</sup> Hieraus wurde geschlussfolgert, dass diese Reste die Zinkionen koordinieren. Anhand eines homologen Modells der Struktur des H<sub>V</sub>1-Kanals bestimmten Musset *et al.* den Abstand zwischen diesen Histidinen auf 14 Å. Sie schlossen auf Grund dieser Entfernung eine Koordination der Zinkionen innerhalb des Monomers (auch Protomer genannt) aus und postulierten ein Modell wonach die Bindung der Ionen jeweils zwischen den beiden jeweiligen Histidinen 140 bzw. 193 eines H<sub>V</sub>1-Dimers erfolgt. Hierbei stehen sich die Transmembranen Segmente S2 und S3 gegenüber und die Entfernung zwischen den beiden His140 bzw. den His193 beträgt 5.7 Å bzw. 9.4 Å. Musset *et al.* führten zudem weitere Mutationsexperimente durch. Hierbei konstruierten sie auch eine verkürzte Version des H<sub>V</sub>1-Kanals durch Entfernung der C-terminalen Domäne. Somit stellten sie sicher, dass der verkürzte Kanal als Monomer und nicht als Dimer vorliegt (vgl. Abschnitt 1.2.2). In einem Konzentrationsbereich von 1–100 μM Zn<sup>2+</sup> konnten sie nachweisen, dass die Inhibition der Dimere stärker ausfällt als die der Monomere. Sie sahen hierin eine Bestätigung ihrer These. Die Kristallstruktur des chimären Protonenkanals, welche von Takeshita *et al.* 4 Jahre später publiziert wurde, widerlegt jedoch das Modell von Musset *et al.* Während Musset *et al.* davon ausgingen, dass sich die S2 und S3-Segmente der Monomere gegenüber stehen, beschrieben Takeshita *et al.* auf Grundlage der Kristallstruktur des chimären mH<sub>V</sub>1-Kanals ein Modell nachdem S4-Domänen *vis-à-vis* angeordnet sind.<sup>[88]</sup>

Neben der Inhibition des Kanals durch Zinkionen wurde die effektive Blockierung des H<sub>v</sub>1-Protonenkanals durch Guanidinderivate beschrieben.<sup>[2,30,66]</sup> Aus der Intention heraus den *gating*-Mechanismus des H<sub>v</sub>1-Kanals zu analysieren, suchten Tombola *et al.* nach einem Weg den Kanal selektiv zu blockieren. Sie identifizierten einen Asparaginsäure-Rest (N214) dessen Substitution durch eine positive Argininsäure den Protonenstrom unterdrückte.<sup>[30]</sup> Ausgehend von der Schlussfolgerung, dass die positive Ladung dies bewirkt, untersuchten sie die Inhibition des Kanals durch das lösliche Guanidinium und konnten diese bestätigen. In einer anschließenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Blockierung des Kanals durch das Guanidinderivat 2-Guanidinbenzimidazol (2GBI) um ein vielfaches effektiver ist und bereits im  $\mu\text{M}$ -Konzentrationsbereich zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Protonenströme führt.<sup>[66]</sup> Anhand von Mutationsstudien wurde nachgewiesen, dass 2GBI innerhalb der Pore bindet und der Phenylalanin-Rest Phe150 essentiell für die 2GBI-Bindung identifiziert ist. Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass 2GBI als sogenannter *open channel blocker* agiert.<sup>[66]</sup> Durch weitere Untersuchungen konnte verifiziert werden, dass neben der Seitenkette von Phe150 auch die Seitenketten von Asp112 sowie R3 und einem Serin an Position 181 an der Bindung des 2GBI beteiligt sind. Des Weiteren wurde die Inhibition des H<sub>v</sub>1-Kanals durch weitere Guanidinderivate systematisch untersucht und beobachtet, dass 5-Chlor-2-guanidinbenzimidazole (ClGBI) etwa 20 mal effektiver ist als 2GBI.<sup>[2]</sup>

Noch bevor der H<sub>v</sub>1-Protonenkanal entdeckt wurde, wurde die Aktivierung der NADPH-Oxidase durch Arachidonsäure (AA) beschrieben. Da DeCoursey *et al.* vermuteten, dass ein Protonenkanal an dem respiratorischen Burst beteiligt ist, untersuchten sie gezielt den Einfluss von AA auf die Protonenströme von Neutrophilen. Sie beobachteten bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  AA eine Vervierfachung der Protonenströme.<sup>[45]</sup> Zudem wurde eine Beschleunigung der Öffnung der Kanäle sowie eine Verschiebung der Schwellenspannung zu negativen Potentialen als Folge der AA Aktivierung beschrieben.<sup>[45,90]</sup> Einhergehend mit der Identifikation des H<sub>v</sub>1-Protonenkanals in Spermienzellen wurde die Aktivierung des Kanals durch das Endocannabinoid Arachidonylethanolamid (Anandamid, AEA) beschrieben.<sup>[91]</sup> Dieses wurde unter anderem als Bestandteil der Flüssigkeit im *Cumulus oophorus* identifiziert und als essentiell für die Reifung des Spermiums diskutiert.<sup>[91,92]</sup> Es konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung durch AEA stärker ausfällt als durch das strukturell ähnliche AA. Studien zur Aktivierung heterologer H<sub>v</sub>1-Kanäle bestätigten die Ergebnisse von DeCoursey *et al.* und zeigten, dass eine Aktivierung der Kanals durch AA und AEA ähnlich effektiv erfolgt. Zudem wurde nachgewiesen, dass die Entfernung der Threoninseitenkette an Position 29 der Aminosäuresequenz des humanen Kanals, keinen Einfluss auf Aktivierung durch AA ausübt.<sup>[93]</sup> Aus einem Vergleich verschiedener AA-Derivate wurde geschlossen, dass das Vorhandensein einer Doppelbindung und hydrophilen Kopfgruppe entscheidend für diesen Effekt ist.<sup>[93]</sup> Der genaue Mechanismus der

## Einleitung

Aktivierung, welche auch bei spannungsgesteuerten Kationenkanälen beobachtet wird, konnte nicht aufgeklärt werden.<sup>[21]</sup>

### 1.2.4 Physiologische Relevanz des humanen Protonenkanals H<sub>V</sub>1

Die Expression des H<sub>V</sub>1-Protonenkanals in diversen eukaryotischen Zellen, wie Alveolarepithelzellen, humanen eosinophilen Granulozyten, Phagozyten, humanen Spermienzellen, Lymphozyten, Gliazellen sowie in bösartigen Brustkrebszellen und Gioblastomen unterstreicht dessen physiologische Relevanz.<sup>[34,40,46,51,60,90,90,91,94–97]</sup> Hauptaufgabe des Kanals ist die Ausschleusung von Protonen in das Zytosol. Diese hat positive gesundheitliche Effekte wie einem Ausgleich des Protonenüberschusses während der respiratorischen Phagozytose und der damit gekoppelten Bildung von Wasserstoffperoxid aus reaktiven Superoxidanionen, welche durch die Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase, NOX) gebildet werden.<sup>[16,34,40,46,51,60,98]</sup> Dieser Vorgang ist unverzichtbar für das menschliche Immunsystem. Ebenso wird durch die kanalvermittelte Protonentranslokation eine Hyperaktivierung des *Flagellums* des Spermiums während der Reproduktion induziert. Die Aktivierung wird durch die alkalische Umgebung und die Reduktion der Zinkionen- bzw. die Erhöhung der Konzentration an Endocannabinoiden, wie Anandamid, während des Eintritts der Spermien in den weiblichen Fortpflanzungstrakt induziert. Resultierend in einer Alkalisierung des Zellinneren, wird der CatSper-Kanal aktiv und verursacht u. a. die Hyperaktivierung der Spermien.<sup>[91,38]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die Spermienqualität, welche sich in einer hohen Motilität äußert, mit der AEA Konzentration korreliert. AEA ist daher notwendig für die Reifung der Spermien und beeinflusst den Erfolg der Reproduktion.<sup>[99]</sup> Seit Kurzem wird ein Zusammenhang zwischen Typ 2 Diabetes und der reduzierten Expression des H<sub>V</sub>1-Kanals in Bauchspeicheldrüsenzellen diskutiert.<sup>[100]</sup> Jedoch ist der Kanal auch an gesundheitsschädlichen Prozessen beteiligt. Es besteht der begründete Verdacht, dass die Expression des Kanals die Größe bzw. das Überleben von Krebstumorzellen fördert.<sup>[96,97,101]</sup> Zudem konnte eine erhöhte Zellschädigung nach einem ischämischen Schlaganfall auf die H<sub>V</sub>1-abhängige NADPH-Oxidase Aktivität zurückgeführt werden.<sup>[40,102,103]</sup> Es konnte bereits gezeigt werden, dass H<sub>V</sub>1 verstärkt in Brustkrebszellen exprimiert wird und dass dessen Inhibition mittels eines Guanidinbenzimidazolderivates das Absterben bösartiger leukämischer Jurkat-T-Zellen zur Folge hat.<sup>[104]</sup> Daher kommt der Erforschung des H<sub>V</sub>1-Proteins und der Entwicklung H<sub>V</sub>1 regulierender Medikamente auch zukünftig eine steigende Bedeutung zu.<sup>[37,101,105]</sup>

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Grundlagen für spektroelektrochemische Studien des spannungsgesteuerten Protonenkanals  $H_v1$  zu legen, die es erlauben strukturelle Änderungen während der Variation elektrochemischer Potentiale zu untersuchen und daraus Informationen über den Öffnungsmechanismus abzuleiten. Auf Grund seiner Homologie zu den spannungsgesteuerten Kationenkanälen und seiner Beteiligung an einer Vielzahl physiologischer Prozesse ist das detaillierte Verständnis des *gating*-Mechanismusses des  $H_v1$  von großem Interesse.

In einem ersten Schritt soll die rekombinante Isolation des humanen spannungsgesteuerten Protonenkanals aus *Escherichia coli* (*E. coli*) etabliert werden. Zu diesem Zweck soll ein geeignetes Expressionssystem durch Umklonierung der kodierenden DNA geschaffen werden. Die Kultivierung innerhalb verschiedener Zellstämme und deren Evaluation soll zu einer Optimierung der Expression beitragen. Im Anschluss soll eine Strategie zur Isolation des Proteins und dessen Aufreinigung mittels Polyhistidin-Tag entwickelt werden. In einem zweiten Schritt soll die funktionelle Rekonstitution in künstliche Liposomen erfolgen und mittels eines auf dem pH-sensitiven 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin (ACMA) basierenden Protonenfluss-Tests nachgewiesen werden. Im Anschluss an die Optimierung der Rekonstitution soll die Protonentranslokationsrate des Kanals mit Hilfe des lipidgekoppelten Fluorophors Oregon Green 488-DHPE quantifiziert werden. Des Weiteren soll die Wirkung von bekannten Inhibitoren und Aktivatoren auf den rekombinanten  $H_v1$ -Kanal analysiert werden. Hierbei soll die Eignung der entsprechenden Antagonisten und Synergisten für weiterführende spektroelektrochemische Studien überprüft werden. Anhand der Ergebnisse der Fluoreszenz basierten Protonenfluss-Tests soll ein Vergleich der Eigenschaften des nativen und rekombinanten  $H_v1$ -Proteins erfolgen. Die funktionellen  $H_v1$ -Proteoliposomen sind grundlegend für den dritten Schritt, welcher die Ausbildung einer trägerfixierten Lipiddoppelschicht (engl. *tethered bilayer lipid membranes*, tBLM) auf goldbedampften Substraten beinhaltet. Diese erfolgt durch das Spreiten der Liposomen auf einer selbstorganisierenden Monoschicht (engl. *self-assembled monolayer*, SAM), welche unter Verwendung eines neuartigen Cholesterol basierten Spacermoleküles und 6-Mercaptohexanol präpariert werden sollen. Die erfolgreiche Umsetzung der ersten Abschnitte ist Voraussetzung für den vierten Schritt. Dieser umfasst die elektrophysiologische Charakterisierung des  $H_v1$ -Proteins mittels Impedanz- sowie die Kombination von Impedanz und moderner oberflächenverstärkter Infrarotabsorptions-Spektroskopie (engl. *surface-enhanced infrared absorption spectroscopy*, SEIRA-Spektroskopie). Diese erlaubt es, potentialabhängige Änderungen der räumlichen Orientierung des Proteins anhand charakteristischer IR-Banden zu untersuchen.





## 3 Materialien und Methoden

Die heterologe Expression aus *Escherichia coli* (*E. coli*) zählt zu den gängigsten und am besten charakterisierten Systemen der biochemischen Methoden. Das im tierischen Verdauungstrakt vorkommende, gramnegative Bakterium wurde 1919 durch Theodor Escherich entdeckt und ermöglichte u. a. 1982 die Herstellung des wichtigen humanen Insulins zu pharmazeutischen Zwecken. *E. coli* ist relativ einfach zu kultivieren. Es zeigt bereits in einfachen Nährmedien wie *lysogeny broth* (LB) bei einer optimalen Temperatur von 37 °C hohe Wachstumsraten mit Verdopplungszeiten von bis zu 20 min. Das Wachstum lässt sich durch die Messung der optischen Dichte (*OD*) bei einer Wellenlänge von 600 nm (*OD*<sub>600</sub>) bestimmen. Neben der Expression von Proteinen eignet sich *E. coli* daher auch für die unkomplizierte Vermehrung von rekombinanter Desoxyribonukleinsäuren (DNS, engl. *desoxyribonucleic acid*, DNA). Im Gegensatz zu Hefen, Pilzen und eukaryotischen Zellen besitzt das Bakterium jedoch keinen Apparat, welcher eine posttranslationale Modifikation ermöglicht. Des Weiteren ist die mögliche Ausbildung von Einschlusskörpern (engl. *Inclusion Bodies*) bei der heterologen Expression von Nachteil. Es handelt sich hierbei um eine Aggregation von partiell oder vollständig fehlgefalteten Proteinen. Eine Vielzahl kommerzieller Bakterienstämme und Vektoren ermöglicht es jedoch, ein Expressionssystem auf die individuellen Bedürfnisse zuzuschneiden. Durch die Wahl eines entsprechenden Vektors lassen sich zum einen Antibiotika-Resistenzen einfügen, welche eine selektive Kultivierung der Bakterien garantieren. Zum anderen können der zu translatierenden DNA kleinere Nukleotidsequenzen angefügt werden, wodurch sogenannte Fusionsproteine entstehen. Diese Sequenzen kodieren zum Beispiel Protein-Tags, welche eine Aufreinigung via Affinitätschromatographie erlauben oder auch fluoreszierende Protein-Tags wie das grün fluoreszierende Protein (engl. *green fluorescent protein*, GFP).

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Plasmid Transformation in *E. coli*

Das Plasmid pCDNA3.1X enthielt die das humane H<sub>v</sub>1-Protein kodierende Desoxyribonukleinsäure, welche speziell für Säugerzellen Codon optimiert wurde. Da der Vektor jedoch nicht für die Expression innerhalb von Bakterien ausgelegt war, sollte die entsprechende DNA-Sequenz umkloniert werden, wobei pET-28b(+) (Novagen) als Zielvektor diente. Das Schema einer Umklonierung ist in Abbildung 3-1 dargestellt. Zunächst erfolgen sowohl die Restriktion des Zielvektors als auch die der gewünschten DNA durch die gleichen Endonukleasen. Durch eine Aufreinigung werden störende DNA-

## Materialien und Methoden

Fragmente entfernt. Anschließend werden die Ziel-Sequenzen durch Ligation zu einem neuen Plasmid, welches die umklonierte DNA enthält, zusammengesetzt und in *E. coli* transformiert.

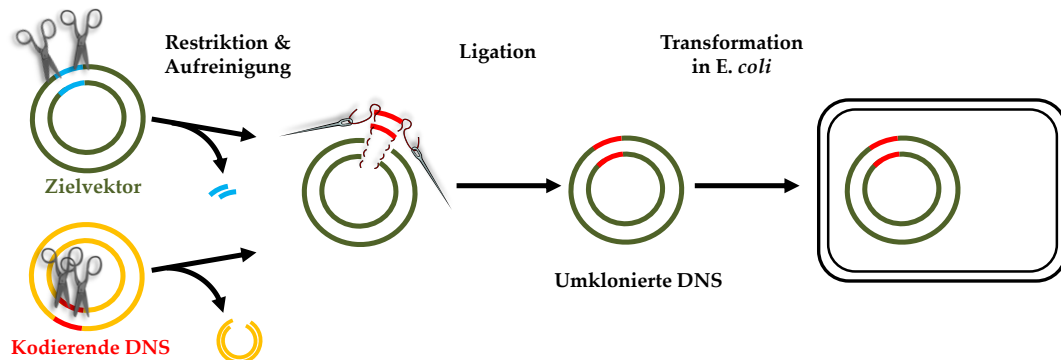


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung einer Umklonierung. Die Restriktion des Zielvektors und der kodierenden DNA durch die gleichen Endonukleasen (Scherensymbole) ermöglicht die gerichtete Ligation zu einem neuen Plasmid. Dieses kann zur weiteren Vermehrung oder heterologen Proteinexpression in *E. coli* transformiert werden.

Eine Umklonierung nach pET-28b(+) bietet die Möglichkeit, dem Protein einen N-terminalen sechsfachen Histidin-Tag (His<sub>6</sub>-Tag) anzufügen, welcher die Aufreinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie im späteren Verlauf erleichtern soll. Zum Zweck der Umklonierung der DNA des Wildtyps (WT) des spannungsgesteuerten Protonenkanals H<sub>V</sub>1 aus dem, freundlicherweise von Prof. Thomas Friedrich (TU Berlin) zur Verfügung gestellten, Vektor pCDNA3.1X wurde dieser zunächst in *E. coli* Bakterien des Typs BL21(DE3)pLysS vervielfältigt. Die Transformation des Zielplasmids erfolgte in kommerzielle, chemisch kompetente Zellen des Stammes BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3) (One Shot®, Life Technologies), sowie BL21 Gen-X™ (Genlantis). Kompetenz bezeichnet die Fähigkeit der Zellen, DNA aufzunehmen und wird durch eine Behandlung derselben mit hohen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen erreicht.<sup>[106,107]</sup> Es wird vermutet, dass die Kationen die Wechselwirkung der negativ geladenen DNA mit der negativ geladenen Zelloberfläche vermitteln. Die eigentliche Einschleusung der DNA in die Zellen erfolgt durch die Methoden der Hitzeschock-Transformation oder der Elektroporation.<sup>[108,109]</sup> Jedoch sind die genauen Vorgänge während dieses Prozesses nicht vollständig verstanden.

## Durchführung

Pro Transformation wurde zunächst je 50 µL der kompetenten Bakterienzellen auf Eis aufgetaut. Es wurden 80 ng Plasmid DNA hinzupipettiert und vorsichtig per Hand geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert, bevor sie für 30 s in einem 42 °C warmen Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt wurden. Es folgte zunächst die 2–5 minütige Inkubation der Suspension auf Eis. Im Anschluss wurde den

Zellen 250  $\mu\text{L}$  *super optimal broth* (SOC)-Medium hinzugegeben und dann wurden sie 1 h bei 37 °C und 220–225 upm im Inkubator geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde abschließend auf LB-Agar-Platten (2 % Agar) ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht (ü. N.) inkubiert. Das LB-Medium wurde nach Lennox angesetzt und enthielt 0.5 % Hefeextrakt, 1 % Trypton sowie 0.5 % NaCl bei pH 7. Des Weiteren wurde dem Medium zum Zweck der selektiven Kultivierung 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicillin und 34  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Chloramphenicol zugesetzt. Wobei die Resistenz gegen Ampicillin durch das Plasmid pCDNA3.1X kodiert wird, während das bakterieneigene Plasmid pLysS die Resistenz gegen Chloramphenicol trägt. Weitere nachfolgende Transformationen in zum Teil andere Stämme (siehe Tabelle 3-1) erfolgten in analoger Art und Weise. Bei der Verwendung des Stammes BL21Gen-X™ wurde der Hitzeschock 45 s durchgeführt und das SOC-Medium auf 37 °C vorgewärmt.

Tabelle 3-1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme und deren Genotypen.

Stamm	Genotyp
BL21(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> )
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3)
BL21 Gen-X™	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3) <sup>†</sup>

<sup>†</sup> Der BL21 Gen-X™-Stamm verfügt über eine nicht charakterisierte Mutation, aus der eine reduzierte Hintergrundexpression sowie eine verzögerte Wachstumsrate resultieren.

### 3.1.2 Isolation des Plasmids pCDNA3.1X

Die Isolation des Plasmids aus kultivierten Zellen erfolgte mittels eines kommerziellen Kits (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) nach der Anleitung des Herstellers. Die Grundlage hierfür ist das Prinzip der alkalischen Lyse. Im ersten Schritt werden die Zellen lysiert. Das in dem Puffer enthaltene anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (engl. *Sodiumdodecylsulfate*, SDS) zerstört dabei die Zellmembran und denaturiert Proteine. Dieser Schritt wird begünstigt, da bereits zugesetztes EDTA zweiwertige Kationen wie Mg<sup>2+</sup> komplexiert und somit die Membran destabilisiert. Gleichzeitig wird die Aktivität von schädlicher DNase reduziert. Die Zugabe von Natriumhydroxid (NaOH) unterstützt diesen Effekt. Unter den alkalischen Bedingungen lösen sich zudem die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären DNA-Strängen. Durch Zugabe eines sauren Puffers, der u. a. Kaliumacetat enthält, wird das Gemisch neutralisiert. Hierbei erfolgt die Renaturierung von kleinen DNA-Molekülen wie Plasmiden schneller als bei genomischer DNA. Das im Salz enthaltene Kalium fällt zudem als Kaliumdodecylsulfat aus. Die anschließende Zentrifugation trennt lösliche von unlöslichen Bestandteilen. Der Überstand wird auf eine Silikamatrix gegeben, wobei das chaotrope Salze Guanidiniumhydrochlorid (Gu-HCl) die

## Materialien und Methoden

Anbindung der DNA an die Membran vermittelt. Anschließend wird die DNA mit ethanolhaltigem Puffer gewaschen und durch einen leicht basischen Puffer (pH 8.5) eluiert.

### Durchführung

Das Ausgangsplasmid wurde zunächst vervielfältigt, indem je 10 mL LB-Medium (pH 7.2) mit dem entsprechenden Antibiotika versetzt und abschließend mit einer Einzelkolonie des Transformationsaustreiches (siehe Kapitel 3.1.1) angeimpft wurden. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 125 upm inkubiert. 5 mL der Übernachtskultur, welche zuvor 10 min auf Eis gekühlt wurde, wurden in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen für 20 min bei 12 °C und 4500 upm zentrifugiert (Beckmann Coulter). Zunächst wurde das Pellet in 250 µL P1-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 3-2), welcher RNase enthält, resuspendiert und in ein kleineres 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zelllyse durch die 5-minütige Inkubation mit 250 µL P2-Puffer. Die Neutralisation wurde durch die Zugabe von 350 µL N3-Puffer initialisiert. Nach anschließendem Schütteln wurde das Gemisch für 10 min bei 16.100 x g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde in die Qiaprep Säule gegeben und es wurde erneut für 60 s zentrifugiert. Die an die Silikamatrix gebundene DNA wurde mit 500 µL PB-Puffer und 750 µL PE-Puffer gewaschen, wobei zwischen den Schritten erneut für 60 s zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Abschließend wurde die Qiaprep Säule in ein neues, steriles Reaktionsgefäß überführt, 50 µL BE-Puffer hinzupipettiert, 1 min inkubiert und die DNA durch 60-sekündige Zentrifugation eluiert. Wurde keine sofortige Verwendung angestrebt, wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3-2: Zusammensetzung der Puffer der Plasmidisolierung.<sup>[110]</sup>

Puffer	Zusammensetzung
P1	50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNaseA, pH 8.0
P2	200 mM NaOH, 1 % SDS
N3	4.2 M Gu-HCl, 0.9 M Kaliumacetat, pH 4.8
PB	5 M Gu-HCl, 30 % Isopropanol
PE	10 mM Tris, 80 % Ethanol, pH 7.5
BE	10 mM Tris, pH 8.0

Die Konzentration der Proben wurde durch die Messung der Absorption bei 260 nm ( $A_{260}$ ) bestimmt. Grundlage hierfür ist die Absorption des Lichts durch die aromatischen

Nukleobasen der DNA.<sup>[111]</sup> Da nur sehr kleine Probenvolumina vorlagen, wurde ein speziell für diesen Fall konstruiertes Spektrophotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific) verwendet. Es ermöglicht die Messung bereits bei minimalen Probeneinsatz von 0.5–5 µL. Bei der Umrechnung der Absorption in eine Konzentration ist zu berücksichtigen, dass die plasmidische DNA als Doppelstrang vorliegt. Diese besitzt im Gegensatz zu einem Einzelstrang eine geringere Absorption. Es wurde daher die Annahme zu Grunde gelegt, dass ein A<sub>260</sub>-Wert von eins einer Konzentration von 50 µg/mL entspricht.<sup>[106]</sup>

### 3.1.3 Restriktionsverdau

Sowohl für die eigentliche Umklonierung als auch zur Bestimmung der Reinheit der plasmidischen DNA ist die Restriktion derselben durch Endonukleasen nötig. Diese auch als Restriktionsenzyme bezeichneten Nukleasen schneiden die DNA-Doppelstränge innerhalb oder am Ende einer selektiven Nukleinsäuresequenz. Man unterscheidet vier Typen von Enzymen. Da im Rahmen dieser Arbeit nur Typ II-Nukleasen verwendet wurden, soll kurz auf ihre Eigenschaften eingegangen werden. Typ II-Endonukleasen besitzen getrennte Methylierungs- und Restriktionsenzyme, wobei nur letztere für die DNA-Manipulation von Bedeutung sind. Die Restriktionsenzyme kommen allgemein ohne zusätzliche Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) aus, benötigen jedoch Mg<sup>2+</sup>-Ionen. Bei dem Subtyp P bestehen die Erkennungssequenzen aus einem Palindrom, d.h. einer symmetrischen Sequenz. Hierbei ist die rückwärtige Sequenzabfolge auf dem komplementären Strang gleich der Abfolge des oberen Stranges (siehe Tabelle 3-3). Die verwendeten Enzyme produzieren bei ihrem Verdau einen Überhang (engl. *sticky ends*), wobei die Phosphatgruppe am 5'- und die Hydroxyfunktion am 3'-Ende verbleibt. Die Verwendung zweier Endonukleasen (engl. *double digest*) ermöglicht in einem späteren Schritt die kodierende DNA gerichtet in den Zielvektor einzufügen. Bei den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Endonukleasen handelt es sich um spezielle schnell verdauende Enzyme, die von der Firma Thermo Scientific bezogen wurden.

Tabelle 3-3: Verwendete Typ II Restriktionsendonukleasen und deren Spezifikation.

Nuklease	Herkunft	Schnittsequenz
<b>XhoI</b>	Xanthomonas holcicola	5'...C <sup>↓</sup> TCGAG...3' 3'...GAGCT <sup>↑</sup> C...5'
<b>HindIII</b>	Haemophilus influenzae	5'...A <sup>↓</sup> AGCTT...3' 3'...TTCGA <sup>↑</sup> A...5'

## Materialien und Methoden

### Durchführung

In einem sterilen Reaktionsgefäß wurden zunächst 15 µL steriles Reinstwasser sowie 2 µL 10x FastDigest Green Buffer vorgelegt. Anschließend wurden 2 µL, d.h. ca. 1 µg der zu verdauenden Plasmid-DNA hinzupipettiert. Je nach gewünschter Restriktion wurde 1 µL des entsprechenden FastDigest Enzyms hinzugegeben. Abschließend wurde der Reaktionsansatz kurz zentrifugiert (Tischzentrifuge) und für 60 min bei 37 °C im Wasserbad verdaut. Die Deaktivierung der Enzyme erfolgte bei 80 °C über 10 min. Danach wurden die Proben auf RT abgekühlt und auf Eis gelagert. Bei einem Doppelverdau wurden 14 µL Reinstwasser und jeweils 1 µL der Restriktionsendonukleasen verwendet. Der Verdau erfolgte hierbei nacheinander in zwei Schritten, wobei zwischen den Schritten die Deaktivierung des ersten Enzyms erfolgte.

### 3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht prinzipiell die Auftrennung geladener Moleküle nach ihrer Größe durch das Anlegen eines elektrischen Feldes. Dies erlaubt sowohl deren Identifikation (z.B. zum Test des Erfolges einer Transformation) als auch die Aufreinigung (z.B. zur Trennung zweier DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau) sowie die Analyse der Reinheit und Menge der Proben. Im Fall der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Molekülen in einem Größenbereich 0.2–20 Kilobasenpaaren (kbp) wird ein poröses Agarosegel verwendet. Die, auf Grund ihres Phosphatrückgrates, negativ geladenen Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld zur Anode. Der, durch die poröse Agarose auftretende Siebeffekt, trennt die Moleküle nach ihrer Länge auf. Diese ist wiederum proportional zum Molekulgewicht. Da auch die Konformation der DNA, wie z.B. linear, ringförmig oder *supercoiled*, Einfluss auf die Wanderungs-geschwindigkeit hat, werden alle zu untersuchenden DNA-Fragmente durch einen einfachen Restriktionsverdau linearisiert. Für den Größenbereich von 0.5–7 kbp werden 1 %ige Agarosegele empfohlen.<sup>[107]</sup> Um die Größe der in der Probe enthaltenen Moleküle zu bestimmen, werden zusätzlich Massenstandards aufgetragen. Durch Zugabe eines in die DNA interkalieren aromatischen Farbstoffes, wie Ethidiumbromid oder GelRed™, können die DNA-Banden durch Anregung mittels ultraviolettem (UV) Licht sichtbar gemacht werden. Der Farbstoff kann bereits in das Agarosegel oder nach der Elektrophorese hinzugegeben werden. Man unterscheidet diese Fälle als Pre- oder Post-Färbung (engl. *pre-, post-staining*). Die Nachweisgrenzen der Farbstoffe liegen im Nanogrammbereich.<sup>[110]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Farbstoff GelRed™ (Biotium) verwendet, dessen Anregungswellenlänge im Bereich von 302 bzw. 312 nm liegt. Das Emissionsmaximum tritt bei etwa 600 nm auf.

## Durchführung

Für das Agarosegel wurde das 1 %ige (*w/v*) Agarose-TAE-Puffer Gemisch kurz aufgeköcht. Der TAE-Puffer enthielt 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure sowie 2 mM EDTA und besaß einen natürlichen basischen pH-Wert von etwa 8. Anschließend wird die Lösung bei Raumtemperatur auf ca. 60 °C abgekühlt und in die Gelapparatur gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel in die Laufkammer eingesetzt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die Proben (siehe Tabelle 3-4) sowie ein Größenstandard (engl. *loading dye*) wurden in die Geltaschen geladen und es wurde für 70–90 min eine Spannung von 100 V bei einem Strom von ca. 110 mA angelegt. Um den Verlauf der Gelelektrophorese verfolgen zu können, wurden die Proben mit Probenpuffern angesetzt. Diese enthalten im Allgemeinen zwei unterschiedliche Farbstoffe, deren Wanderungsgeschwindigkeiten innerhalb des Gels mit denen unterschiedlicher DNA-Fragmentlängen korrelieren. Der 6x-Probenpuffer (6xPP) enthielt Bromphenolblau und Xylencyanol, welche etwa bei 200 Basenpaaren (bp) bzw. ca. 4 kbp laufen. Der 10x FastDigest Green Buffer enthielt zwei unbekannte Farbstoffe, die auf der Höhe von 10 bp und 3–5 kbp wandern. Alle Probenpuffer sowie der Größenstandard stammen von der Firma Thermo Scientific.

Tabelle 3-4: Allgemeines Pipettierschema der Proben der Agarose-Gelelektrophorese.

Marker	Plasmid	linearisiertes Plasmid	ligiertes Plasmid
4 µL Reinstwasser	5 µL Plasmid	siehe Kapitel 3.1.3	15 µL Ligationsansatz
1 µL 6X-PP	1 µL 6X-PP		3 µL 6x-PP
1 µL Größenstandard			

Im Anschluss der Gelelektrophorese wurde das Agarosegel für 20–60 min in einer wässrigen 3x-GelRed™-Lösung angefärbt. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht angeregt und, sofern eine Isolation der DNA-Sequenz aus dem Gel beabsichtigt wurde (siehe Kapitel 3.1.5), ausgeschnitten.

### 3.1.5 Isolation einzelner DNA-Banden aus dem Agarosegel

Für eine erfolgreiche Umklonierung ist es notwendig, die beim Restriktionsverdau entstandenen DNA-Sequenzen voneinander zu trennen. Diese würden andernfalls während der Ligation zum Ausgangsprodukt verknüpft. Die Auftrennung erfolgt daher wie zuvor beschrieben durch präparative Agarose-Gelelektrophorese. Die Isolation der DNA aus den ausgeschnittenen Banden erfolgte mit Hilfe des kommerziellen Qiaquick Gel Extraktion Kits (Qiagen). Analog zu dem in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Prinzip wird die Bindung der DNA

## Materialien und Methoden

an die Silikamatrix durch chaotrope Salze vermittelt. Anschließend erfolgt die Reinigung und Elution.

### Durchführung

Zunächst wurde die ausgeschnittene Bande in einem 1.5 mL-Reaktionsgefäß gewogen und mit der dreifachen Menge (*v/w*) QG-Puffer (siehe Tabelle 3-5) versetzt. Anschließend wurde das Gel durch 10 minütige Inkubation bei 50 °C aufgelöst und darauffolgend mit der einfachen Menge (bezogen auf das Gelgewicht (*v/w*)) Isopropanol versetzt. Die Lösung wurde in eine Qiaquick Säule gegeben und diese in einem 2 mL-Reaktionsgefäß platziert. Im Anschluss wurde für 1 min bei 17.900 x g zentrifugiert (Eppendorf oder Scientific Thermo Fisher). Der Durchfluss wurde verworfen und die Silikamatrix mit 500 µL QG-Puffer gewaschen, danach wurde erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 750 µL PE-Puffer wiederholt. Abschließend wurde die Säule in ein steriles 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt, die Matrix mit 50 µL BE-Puffer benetzt und 1 min inkubiert. Durch erneute Zentrifugation für 1 min bei 17.900 x g wurde die DNA eluiert. Die Konzentration der Proben wurde durch die Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Erfolgte keine sofortige Ligation der Fragmente, wurden diese bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3-5: Zusammensetzung der Puffer zur Isolation von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel.

Puffer	Zusammensetzung
QG	20 mM Tris, 5.5 M Guanidinthiocyanat, pH 6.6
PE	10 mM Tris, 80 % Ethanol, pH 7.5
BE	10 mM Tris, pH 8.0

### 3.1.6 Ligation der DNA-Fragmente zum Zielplasmid pH<sub>V</sub>1WT

Die Insertion der DNA, zwischen die Schnittstellen HindIII und XhoI der Multiple Cloning des Zielvektors, erfolgt unter Zugabe der T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific). Die für die Ligaseaktivität nötige Energie liefert ATP, welches neben Mg<sup>2+</sup>-Kationen im T4-DNA-Ligasepuffer des Herstellers enthalten ist. Bei der katalysierten Neubildung einer Phosphodiesterbindung erfolgt die Verknüpfung zwischen der Phosphatgruppe am 5'- und der Hydroxyfunktion am 3'-Ende der zwei DNA-Fragmente. Durch den vorangegangenen Einsatz zwei verschiedener Restriktionsenzyme wird eine mögliche intramolekulare Ligation umgangen. Um den Erfolg der Insertion zu erhöhen, wird das Insert (I), d.h. das DNA-Fragment im, drei- bis fünffachen stöchiometrischen Überschuss zum Vektor (V) eingesetzt.



Dieser Überschuss kann, bei bekannter Sequenzlänge (Anzahl der bp) wie folgt berechnet werden.

$$\frac{I}{V} = \frac{m_I / \text{Insertlänge}}{m_V / \text{Vektorlänge}} \quad 3-1$$

Während die Sequenz des Inserts, welches die kodierende DNA trägt, eine Länge von 862 bp besitzt, ist die Vektorsequenz mit 5351 bp deutlich größer.

### Durchführung

Zunächst wurden die Volumina, entsprechend der in Tabelle 3-6 angegebenen Massen, zusammen pipettiert. Anschließend wurde jedem Ligationsansatz 0.5 µL T4 DNA Ligase, sowie 2 µL Ligasepuffer hinzugesetzt. Die Ligation erfolgte bei RT für 1.5 h. Der Erfolg der Ligation wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Nach der Bestätigung der Ligation wurde eine Transformation nach dem in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Hierfür wurden 2 µL des Ligationsansatzes verwendet. Der Ausstrich erfolgte auf LB-Agarplatten, welche neben dem Antibiotikum Chloramphenicol (34 µg/mL, im Falle von BL21(DE3)pLysS) auch Kanamycin (60 µg/ml) enthielten. Die Kanamycinresistenz wird durch einen Sequenzabschnitt des neuen pH<sub>V</sub>1WT kodiert. Neben dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS wurde auch der Stamm BL21(DE3) verwendet. Dieser besitzt auf Grund des fehlenden Plasmids pLysS keine Chloramphenicolresistenz.

Tabelle 3-6: Pipettierschema der Ligationsansätze mit unterschiedlichen Vektor-zu-Insert-Verhältnissen.

Vektor/Insert	1:3	1:5	1:6	1:7
<b>m(Vektor) / ng</b>	110	80	70	62
<b>m(Insert) / ng</b>	53	64	67	70

### 3.1.7 Analyse des Plasmids pH<sub>V</sub>1WT

Nach erfolgreicher Transformation, sollte das Plasmid pH<sub>V</sub>1WT zunächst vervielfältigt und auf die korrekte, gerichtete Insertion der kodierenden DNA hin geprüft werden. Zu diesem Zweck wurde eine Übernachtskultur angesetzt und das Plasmid analog zu dem Verfahren, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, isoliert. Durch einen zweifachen Verdau (siehe Kapitel 3.1.3) und anschließende Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.1.4) sollte geklärt werden, ob die kodierende DNA des spannungsgesteuerten Protonenkanals enthalten ist. Des Weiteren wurde eine Sequenzierung des Plasmids bei der Firma SeqLab (Göttingen) in Auftrag

## Materialien und Methoden

gegeben. Hierbei wurden der T7-Promoter, sowie der T7-Terminator als Primer verwendet (siehe Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7: Sequenz der für die DNA-Sequenzierung verwendeten Primer.

Primer	Sequenz
T7-Promoter	5'-TAATACGACTCACTATGGG-3'
T7-Terminator	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

## 3.2 Proteinbiochemische Methode

### 3.2.1 Heterologe Proteinexpression

Die eingesetzten E. coli-Stämme (siehe Tabelle 3-1) wurden auf Grund ihres Genotyps ausgewählt. Da einige Proteine für die Zelle toxische Eigenschaften besitzen, wird angestrebt die basale Expression möglichst niedrig zu halten. Die negative Regulation der Expressionsysteme kann durch selektive Kombination von Bakterium und Vektor erzielt werden.<sup>[112,113]</sup> Zu diesem Zweck beinhalten die Stämme das  $\lambda$ DE3 Lysogen des Bakteriophagen T7, welches das Gen der T7-RNA-Polymerase trägt (siehe Abbildung 3-2). Einzig diese ist in der Lage, an die im Vektor vorliegende T7-Promotersequenz zu binden und somit das Gen des Zielproteins zu transkribieren. Die Expression der T7-RNA-Polymerase wird jedoch zunächst durch Bindung des lacI-Repressors an das Lac-Operon verhindert. Des Weiteren bindet der Repressor auch an das Lac-Operon der Vektorsequenz und verhindert die Transkription der DNA des Zielproteins. Es wird hierdurch sichergestellt, dass selbst durch geringe Mengen basal exprimierter T7-RNA-Polymerase keine Expression erfolgt. Das den Repressor kodierende Gen befindet sich ebenfalls auf dem Plasmid und gewährleistet dessen notwendige Konzentration.

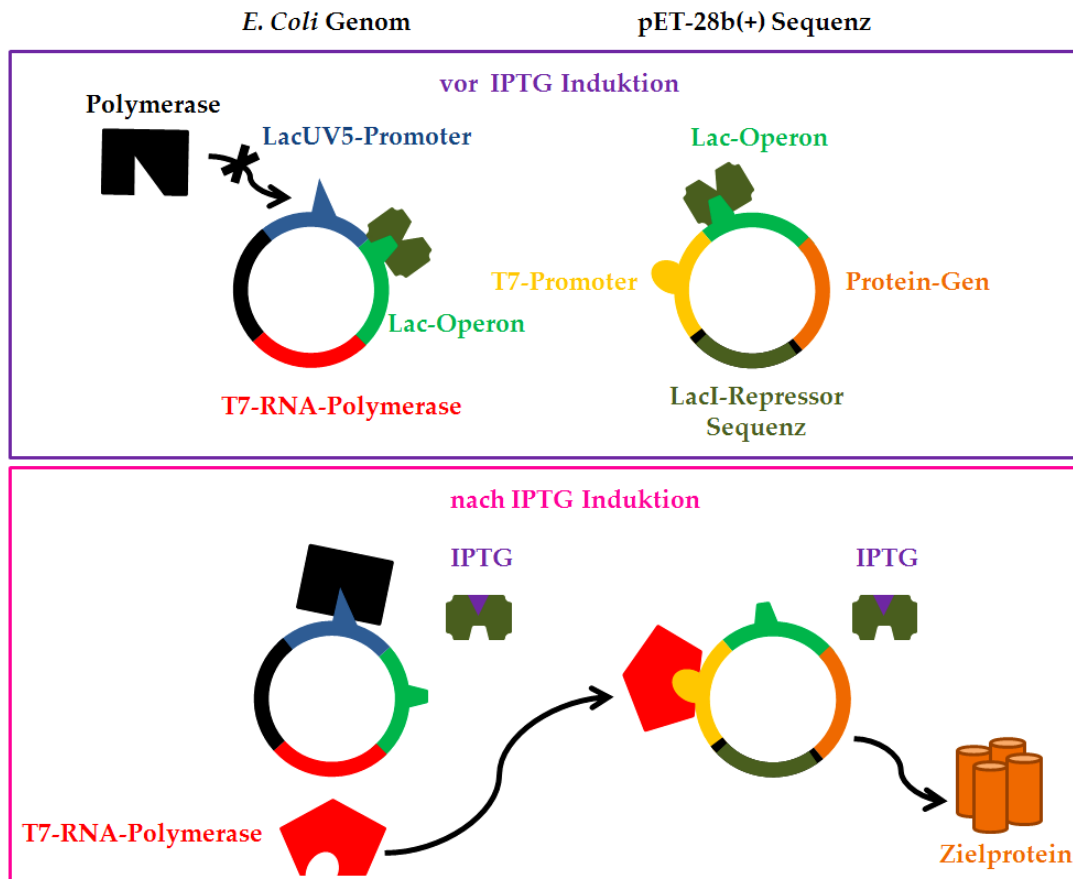


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Regulation des verwendeten T7-Promoter Expressionssystems. Das *E. coli* Gen beinhaltet das  $\lambda$ DE3 Lysogen des Bakteriophagen T7. Dieses kodiert die T7-RNA-Polymerase, welche für die Transkription der kodierenden DNA des pET-28b(+) Vektors essenziell ist. Der Vektor wiederum kodiert den LacI-Repressor, welcher an das Lac-Operon beider Plasmide bindet und die Bindung der notwendigen Polymerasen unterbindet. Erst durch Zugabe von IPTG, welches an den Repressor bindet, wird die Inhibition aufgehoben und erlaubt die Translation der T7-RNA-Polymerase sowie des Zielproteins.

Erst durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG), welches an den Repressor bindet, wird dessen Bindung an das Lac-Operon aufgehoben. Der LacUV5-Promoter ist für die *E. coli* eigene Polymerase zugänglich und die T7-RNA-Polymerase wird exprimiert. Eine weitere Folge der IPTG Induktion ist die Expression des Zielproteins, da auch die Bindung der Polymerase an der T7-Promoter ermöglicht wird. Der Stamm der Bezeichnung pLysS trägt ein weiteres Plasmid, welches das T7-Lysozym kodiert. Dieses ist ein zusätzlicher T7-RNA-Polymerase Inhibitor, wodurch eine reduzierte basale Expression gegenüber den Stämmen ohne pLysS gewährleistet werden soll. Auf diesem Plasmid ist ebenfalls eine Chloramphenicolresistenz kodiert. Eine Reduktion der Proteaseaktivität wurde durch die Mutation der *outer membrane protease* (OmpT) erzielt und verhindert die Zersetzung rekombinanter Proteine.

### Durchführung

Zunächst wurden ein frischer Transformationsansatz (siehe Kapitel 3.1.1) oder eine Glycerinkultur nach der 13-Strich-Methode auf einer LB-Agarplatte (inkl. 60  $\mu$ g/mL

## Materialien und Methoden

Kanamycin) ausgestrichen. Eine gewachsene Einzelkolonie wurde in 30–40 mL LB-Medium (pH 8) inkl. Kanamycin (60 µg/mL) gegeben und ü. N. bei 37 °C und 150 upm in einem Schüttelinkubator (Edmund Bühler GmbH) kultiviert. Glycerinkulturen wurden am Folgetag aus einer 1:1 Mischung der Übernachtskultur und Glycerin (95 %) gezogen und bei –80 °C gelagert. Für die Inokulation der Hauptkultur (250 mL) wurde die Übernachtskultur 1:50 mit LB-Medium (pH 8) verdünnt und mit Kanamycin (60 µg/mL) versetzt. Diese wurde anschließend bei 37 °C und 150 upm bis zu einer  $OD_{600}$  von etwa eins kultiviert. Die heterologe Expression des Proteins wurde daraufhin durch IPTG Zugabe (1 mM) induziert und erfolgte für 3–4 h. Abschließend wurden die Zellteilung verlangsamt, indem die Kultur für 10 min auf Eis gekühlt wurde. Die Zellernte erfolgte durch 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 4500 upm. Das aus 1 L Kultur erhaltene Pellet wurde in 9 mL Grundpuffer aufgenommen und bei –20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zum Zweck der Optimierung der Expression, wurde diese auch unter leicht veränderten Bedingungen durchgeführt. So wurde unter anderem der pH des LB-Mediums und die Zusammensetzung der verwendeten Puffer (siehe Tabelle 3-8) variiert.

Tabelle 3-8: Zusammensetzung der Puffer der Expression und Zelllyse.

Puffer	Zusammensetzung
<b>Grundpuffer</b>	20 mM HEPES 150 mM NaCl pH 8
<b>Lysepuffer A</b>	Grundpuffer 0.25–0.32 mg/mL Lysozym 5 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 1 Tablette Roche® complete EDTA-free, protease inhibitor cocktail
<b>DNase-Lösung</b>	8.8–12 mg/mL in 1 M $MgCl_2$
<b>Isolationspuffer B</b>	Grundpuffer 1 % (w/v) SDS

### 3.2.2 Zellyse und Protein Solubilisierung

Um das gewünschte Protein isolieren zu können, ist es nötig die Zellmembran der Bakterien aufzubrechen. Hierzu eignen sich mechanische Verfahren wobei z.B. Ultraschall- oder Hochdruckhomogenisatoren eingesetzt werden, sowie nicht-mechanische Verfahren. Bei der Ultraschallbehandlung stoßen die Zellen aneinander und brechen auf. Hochdruckhomogenisatoren erzeugen hingegen starke Scherkräfte, in dem Sie die Zellsuspension unter hohem Druck (bis zu 1500 bar) durch Kapillaren einer definierten Geometrie pumpen. Nicht-mechanische Aufschlussmethoden setzen auf die Destabilisierung der Zellmembran durch Lysozym und EDTA. Während Ersteres die  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung der Peptidoglykane der Zellmembran hydrolysiert, chelatisiert EDTA membranstabilisierende, zweiwertige Kationen.

Die ausgeprägten hydrophoben Bereiche des zu isolierenden, transmembranen H<sub>v</sub>1-Kanals machen den es notwendig dieses zu solubilisieren. Zu diesem Zweck werden Detergenzien eingesetzt. Da sich die Eigenschaften der Tenside wie zum Beispiel kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) und Dialysierbarkeit unterscheiden und eine optimale Solubilisierung erzielt werden sollte, wurde ein *Screening* mit ausgewählten Detergenzien durchgeführt.

#### Durchführung

Das gefrorene Zellpellet wurde zunächst bei RT angetaut und in Lysispuffer A (50 mL) resuspendiert. Hierbei wurde 400  $\mu$ L der DNaseI-Lösung hinzugegeben. Anschließend wurde die Suspension bei 4 °C für 60–90 min gerührt. Die Homogenisierung, d.h. der Zellaufschluss, erfolgte durch die Behandlung mit einem Hochdruck- (Microfluidics) (3 Zyklen à 1000 Bar) oder einem Ultraschallhomogenisator (Bandelin) mit Mikrospitzen Sonotrode (3 x 45 s, Pulsstufe 4 x 10 %, Amplitude: 50–60 %). Die Suspension wurde nochmals mit 100  $\mu$ L DNaseI-Lösung versetzt und für 15 min unter Rühren inkubiert. Durch eine nachfolgende Zentrifugation (14.000 upm, 20.000 xg, 4 °C, 60 min, Sigma) wurden die löslichen und unlöslichen Bestandteile voneinander getrennt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Isolationspuffer B bei Raumtemperatur resuspendiert. Es wurden 200  $\mu$ L DNaseI-Lösung hinzupipettiert und 60–90 min bei RT gerührt. Im Anschluss wurde für 60 min, bei 20 °C und 20.000 xg zentrifugiert (Sigma).

Das Detergens *Screening* wurde in einem kleinen Maßstab durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde bis zur ersten Zentrifugation analog zu der oben beschriebenen Arbeitsweise verfahren. Dem gewonnenen Pellet wurde etwas Probenmaterial entnommen, dieses wurde zunächst in etwa 10 mL Grundpuffer resuspendiert. Je 900  $\mu$ L der Suspension wurden in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß gegeben und mit den in Tabelle 3-9 angegebenen Volumina an 10 %iger Detergenslösung und Grundpuffer versetzt. Die zu untersuchenden Detergenzien wurden hierfür in Grundpuffer gelöst. Anschließend wurden die Proben für 1 h bei RT in

## Materialien und Methoden

einem Thermoschüttler (250 upm, Eppendorf) inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 20 °C für 45 min bei 100.000 xg (Centricon). Der Überstand wurde für eine Analyse mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Tabelle 3-9: Pipettierschema des Detergens Screenings.

Detergenzkonz. / %	0.25	0.5	1
Suspension / $\mu\text{L}$	900	900	900
10 % Detergenslös. / $\mu\text{L}$	25	50	100
Grundpuffer / $\mu\text{L}$	75	50	0

Es wurden die folgenden Detergenzien untersucht: Natriumdodecylsulfat (SDS), *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid (DDM), *n*-Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid (DM), Sulfobetain-12 (SB-12) und 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS).

### 3.2.3 Affinitätschromatographische Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins basiert auf dem Prinzip der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC). Auf Grund der zuvor beschriebenen Umklonierung der DNA des H<sub>v</sub>1-Proteins (siehe Kapitel 3.1), konnte ein *N*-terminaler Fusions-Tag angefügt werden. Der sechsfache Histidin-Tag (His<sub>6</sub>-Tag), ist über eine Linkersequenz mit dem Protein verknüpft. Die Anbindung des His<sub>6</sub>-Tags an die chelatisierende Nitrilotriessigsäure (engl. *nitrilotriacetic acid*, NTA) wird durch zweiwertige Kationen vermittelt. Hierbei kommen allgemein Nickel- und Cobalt-Ionen (Ni, Co) zum Einsatz. Diese bilden oktaedrische Komplexe aus, deren Bindungsstellen neben dem Chelatbildner mit Wasser oder zwei Histidinen besetzt sind (siehe Abbildung 3-3). Die Koordination der Histidine erfolgt über die Wechselwirkung der freien Elektronenpaare der Stickstoffatome. Diese selektive Bindung erlaubt es Verunreinigungen, welche keinen Tag tragen, mit Hilfe eines Waschvorganges zu entfernen. Die Elution des Zielproteins erfolgt durch einen Puffer mit hoher Imidazolkonzentration, da dieses mit dem Protein um die Bindungsstelle konkurriert. Eine höhere Affinität wird ab 250 mM erreicht.<sup>[114]</sup> Kommerziell erhältlich ist das Säulenmaterial als Agarose gebundene Ni-NTA und besitzt eine Bindungskapazität von bis zu 50 mg/mL.

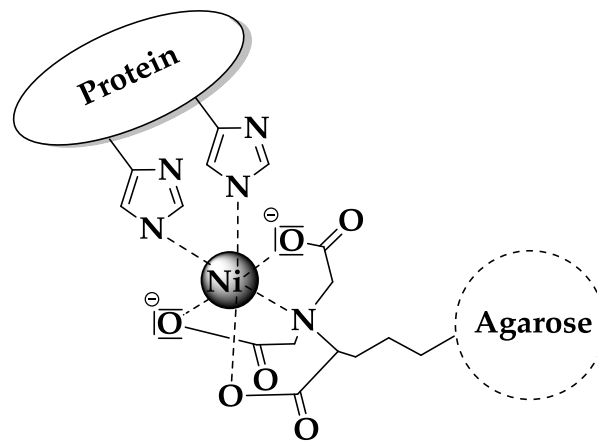


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Prinzips der immobilisierten Metallchelataffinitätschromatographie. Zwei Histidine des His-Tags koordinieren an das Nickelion, welches durch NTA chelatisiert wird und einen immobilisierten, anionischen Komplex bildet.

### Durchführung

Zunächst wurde eine 10 mL Säule (Mobitec) mit 2–3 mL NTA-Ni-Agarose (Qiagen) befüllt. Das Säulenmaterial wurde mit dem dreifachen Volumen Ethanol, Reinstwasser und Grundpuffer gewaschen. Der proteinhaltige Überstand der zweiten Zentrifugation (siehe Kapitel 3.2.2) wurde mit der gewaschenen Agarose in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen vereinigt. Die Anbindung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken (Schwenktisch Cat). Das Gemisch wurde langsam zurück auf die Säule gegeben und mit drei Säulenvolumen Lysispuffer B gewaschen (siehe Tabelle 3-8). Die Elution erfolgte in Fraktionen à 2 mL durch den imidazolreichen Elutionspuffer (siehe Tabelle 3-10)

Tabelle 3-10: Zusammensetzung des Elutionspuffers.

Puffer	Zusammensetzung
Elutionspuffer	Grundpuffer
	1 % SDS
	250 mM Imidazol

### 3.2.4 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese gehört zu den gängigen Methoden der Proteinanalytik. Sie beruht, wie auch die Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.1.4), auf der Bewegung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. Als Trägersystem wird ein Polyacrylamidgel verwendet, dessen Porengröße durch das Verhältnis von

## Materialien und Methoden

Acrylamidmonomer (AA) und Quervernetzer (Bisacrylamid (Bis-AA)) bestimmt wird. Die radikalische Polymerisation des Geles wird durch Ammoniumpersulfat (APS) induziert. N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) dient als Katalysator der Vernetzung. Die von Laemmli entwickelte denaturierende, diskontinuierliche SDS-PAGE eignet sich besonders zur Bestimmung der molekulare Masse.<sup>[115]</sup> Das eingesetzte Detergens SDS erfüllt hierbei zwei Zwecke: Zum Einen denaturiert es die Proteine, so dass deren räumliche Struktur keinen Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit besitzt. Zum Anderen maskiert die effektive Bindung des SDS (ca. 1.4 g SDS pro g Protein) deren Eigenladung, wodurch alle Proteine ein ähnliches Masse zu Ladungsverhältnis besitzen.<sup>[110]</sup> Die negative geladenen Protein-SDS-Aggregate wandern bei angelegter Spannung zur Anode und werden durch den Siebeffekt des Geles aufgetrennt, wodurch sich ein lineares Verhältnis zwischen Logarithmus des Molekulargewichtes und der Wanderungsdistanz ergibt. Neben SDS enthält der Probenpuffer Dithiothreitol (DTT), welches Disulfidbrücken reduziert und somit die Entfaltung der Proteinstruktur unterstützt. Die diskontinuierliche SDS-PAGE ermöglicht eine relativ hohe Auflösung, da hierbei zwei verschiedene Gele verwendet werden. Das obere Sammelgel besitzt größere Poren und einen niedrigeren pH-Wert als das Trenngel. Der Sammelgelpuffer enthält zu dem Chlorid-Ionen, welche innerhalb des elektrischen Feld eine höhere Mobilität als die Proteine besitzen. Sie werden daher als Leitonen bezeichnet. Im Gegensatz dazu wandern die im Elektrophoresepuffer enthaltenen Glycin-Ionen langsamer, da sie bei niedrigem pH als Zwitterionen und somit effektiv ungeladen vorliegen. Sie werden daher als Folgeionen bezeichnet. Zwischen den Leit- und Folgeionen bildet sich im Sammelgel ein Feldstärkegradient aus, in dem sich die Proteine entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität anordnen. Dies führt zu einer Vortrennung und Aufkonzentration der Probe im Sammelgel, was wiederum im späteren Verlauf zu scharfen Banden führt. Passieren die Glycinionen die Grenze zum alkalischen engporigen Trenngel, werden Sie deprotoniert und überholen die Proteine. Diese werden beim Übertritt in das Trenngel verlangsamt und anschließend anhand ihrer Größe aufgetrennt. Neben der Probe wird ein Größenstandard (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*) eingesetzt, sodass das Molekulargewicht der Probe abgeschätzt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine modifizierte SDS-PAGE nach Schägger durchgeführt.<sup>[116,117]</sup> Durch den Einsatz von Tricin statt Glycin, welches eine noch langsamere elektrophoretische Mobilität besitzt, kann eine Stärkere Auftrennung im Bereich von 1 bis 100 kDa erreicht werden. Dies wird angestrebt, da das zu isolierende Protein ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 36.7 kDa besitzt.

### Durchführung

Die SDS-Gele nach Schägger wurden in einem vertikalen Gelelektrophorese-System (Peqlab) präpariert. Zunächst wurde das 10 %ige Trenngel (siehe Tabelle 3-1) gegossen, wobei die



Zugabe des Radikalstarters in die Polymerisationslösung als letzten erfolgte. Für die Dauer (ca. 1 h) des Aushärtens wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde das 4%ige Sammelgel gegossen und ein Kamm in die Apparatur eingesetzt, um die Taschen im späteren Verlauf mit den Proben zu beladen.

Tabelle 3-11: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels nach Schägger.

Gel	Zusammensetzung pro Gel
<b>Sammelgel</b>	570 µL Reinstwasser
<b>4 %</b>	1060 µL Glycerin (50 % (v/v))
	1.68 mL Gelpuffer (pH 8.45)
	1.66 mL Acrylamid-Lösung (30 % AA ; 0.8 % Bis-AA)
	25 µL APS (10 % w/v)
	3 µL TEMED
<b>Trenngel</b>	1.23 mL Reinstwasser
<b>10 %</b>	500 µL Gelpuffer (pH 8.45)
	267 µL Acrylamid-Lösung (30 % AA ; 0.8 % Bis-AA)
	13.4 µL APS (10 % w/v)
	2.65 µL TEMED

Nach dem Aushärten wurden die vorgeformten Probestaschen befüllt. Zuvor wurden die Probenlösungen 1:1 mit 2xProbenpuffer (siehe Tabelle 3-12) versetzt und für 5 min in einem Thermoschüttler (Eppendorf) bei 80 °C und 300 upm denaturiert. Die obere Pufferkammer des Systems wurde mit dem Kathodenpuffer befüllt, während die untere Kammer mit dem Anodenpuffer (siehe Tabelle 3-12) befüllt wurde. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 30 min bei einer Spannung von 80 Volt. Anschließend wurde die Spannung auf 180 V erhöht und die Elektrophorese für ca. 45 min fortgesetzt. Zur Anfärbung der Proteinbanden wurde Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 eingesetzt. Dieser bindet an die basischen Aminosäuren des Proteins. Das Gel wurde 3–5 min in der Färbelösung und im Anschluss über Nacht in der Entfärbelösung geschwenkt.

Tabelle 3-12: Zusammensetzung der, bei der SDS-PAGE nach Schägger, verwendeten Puffer:

Puffer	Zusammensetzung
<b>2xProbenpuffer</b>	175 mM Tris; pH 6.8 100 mM DTT 15 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 0.02 % (v/v) Bromphenolblau
<b>Kathodenpuffer</b>	100 mM Tris; pH 100 mM Tricin 0.1 % (w/v) SDS
<b>Anodenpuffer</b>	200 mM Tris; pH 8.9
<b>Gelpuffer</b>	3 M Tris, pH 8.45 0.3 % SDS
<b>Färbelösung</b>	0.05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 45 % (v/v) Methanol 18.5 % (v/v) Essigsäure
<b>Entfärbelösung</b>	5 % (v/v) Ethanol 7.5 % (v/v) Essigsäure (100 %)

### 3.2.5 Western Blot Analyse

Neben der SDS-PAGE zählt der spezifische Nachweis von Proteinen mittels Immunfärbung zu den gängigen Methoden der Proteinanalytik. Beim Western Blot, einer Form des Immuno-Blottings, werden die Proteinbanden zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (engl. *blotting*). Der Transfer erfolgt hierbei mittels Elektrophorese orthogonal zur Laufrichtung der vorangegangenen SDS-PAGE. Anschließend wird der Übertrag mittels Ponceau S-Färbung kontrolliert werden. Der rote Azofarbstoff bindet reversibel, unspezifisch an Proteine und erlaubt es ebenfalls den Größenstandard zu markieren. Die selektive Visualisierung durch

Immundetektion erfolgt durch eine zweistufige Anbindung von Antikörpern. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein primärer Antikörper (*Penta-His Antibody BSA-free*) verwendet, welcher selektiv an eine Sequenz von fünf Histidinen bindet. Hierdurch soll gewährleistet sein, dass einzig Proteine, welche den angefügten *N*-terminalen Fusionstag tragen, detektiert werden. Ungebundene monoklonale, Maus Anti-His Antikörper werden anschließend von der Membran gewaschen. Der polyklonale, sekundäre Antikörper besitzt ein Anti-Maus-Antigen und bindet somit an den ersten Antikörper. Des Weiteren ist der Sekundärantikörper an eine Meerrettichperoxidase (engl. *horse radish peroxidase*, HRP) gebunden. Diese katalysiert unter Zugabe von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol. Bei der Reaktion wird Stickstoff abgespalten und das angeregte 3-Aminophtalatdianion bleibt zurück. Der anschließende Übergang vom elektronisch angeregten in den Grundzustand wird Chemolumineszenz im Bereich der Wellenlänge von 428 nm emittiert. Diese erlaubt es einen Röntgenfilm zu belichten und visualisiert somit selektiv die Immunodetektion der Proteine.

### Durchführung

Die Proteinbanden der Probe wurden zunächst mittels SDS-PAGE, nach dem in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Verfahren, aufgetrennt. Parallel wurden zwei Filterpapiere (Whatman) und eine Nitrocellulosemembran in der Größe des Geles für 30 min in Blotting Puffer (siehe Tabelle 3-13) inkubiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *Semidry* Verfahren nach Kyhse-Andersen angewendet.<sup>[118]</sup> Auf die mit Blotting-Puffer benetzte Platinelektrode der Blotting-Kammer (Trans-Blot®; BioRad) wurde eine Lage Puffer getränktes Filterpapier gelegt, hierauf wurde die Nitrocellulosemembran platziert (siehe Abbildung 3-4). Es wurde dabei auf die Vermeidung von Luftblasen zwischen den Schichten geachtet. Auf die Membran wurden das SDS-Gel und ein weiteres Filterpapier gelegt. Anschließend wurde die Edelstahlkathode aufgelegt und der Übertrag bei einem Strom von 180 mA für 45 min durchgeführt.

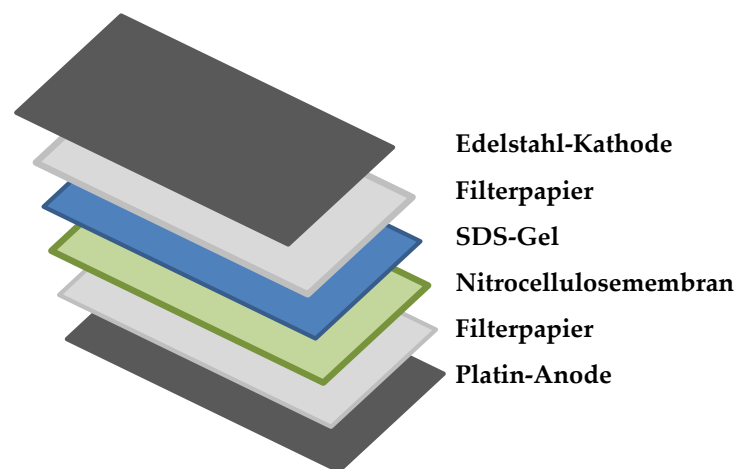


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung des Aufbaus der Semidry Western Blot Apparatur.

## Materialien und Methoden

Die Anfärbung der Proteinbanden, zur Kontrolle des Übertrages, erfolgte durch 3 minütiges Schwenken der Membran in einer Ponceau S-Lösung. Im Anschluss wurde die Membran mit Reinstwasser gewaschen. Verbliebende freie Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran wurden durch Inkubation in einer 5 %igen Magermilch-Suspension in *Tris Buffered Tween*-Puffer (TBT-Puffer, siehe Tabelle 3-13) geblockt (60 min bei Raumtemperatur). Die Anbindung des primären, penta-His Antikörpers (Qiagen) erfolgte unter Schwenken bei 4 °C über Nacht. Dieser wurde in einer Konzentration von 0.8–1 µg/mL gelöst in 5 %iger Magermilch-Suspension in TBT-Puffer eingesetzt. Durch dreimaliges, 10 minütiges Waschen in 50 mL TBT-Puffer wurden ungebundene Primärantikörper entfernt. Die Anbindung des sekundären *goat, anti-mouse* Antikörpers erfolgte bei 4 °C für 60 min. Er wurde in einem Verhältnis von 1:2500 (*w/w*) in einer 5 %iger Magermilch-TBT-Puffer Suspension verdünnt. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für 20 min mit TBT-Puffer gewaschen. In einer Dunkelkammer wurde die Nitrocellulosemembran mit je 1 mL der *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Lösung für 2 min benetzt. Anschließend wurde die Membran, durch eine Klarsichtfolie geschützt, in die Belichtungskassette gelegt. Der Röntgenfilm (Kodak) wurde aufgelegt, die Kassette rasch verschlossen und der Film je nach Intensität der Banden für 5 s belichtet. Er wurde 2 min in Entwicklerlösung geschwenkt, mit Reinstwasser gespült, 2 min in Fixierlösung gelegt und anschließend in Reinstwasser gewaschen. Abschließend wurden die Membran sowie der belichtete Film getrocknet und abgebildet.

Tabelle 3-13: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen der Western Blot Analyse.

Puffer	Zusammensetzung
<b>Blotting Puffer</b>	20 mM Tris 150 mM Glycin 0.05 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol
<b>Ponceau S-Lösung</b>	0.2 % (w/v) Ponceau S 3 % (v/v) Essigsäure
<b>TBT-Puffer</b>	10 mM Tris 150 mM NaCl 0.2 % (w/v) Tween 20
<b>ECL 1</b>	100 mM Tris 2.5 mM Luminol 0.4 mM <i>p</i> -Cumarsäure
<b>ECL 2</b>	100 mM Tris 0.02 % (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

### 3.2.6 Umpufferung des Proteins per Dialyse und Aufkonzentration

Da das aufgereinigte Protein im Elutionspuffer vorliegt, dieser jedoch SDS und Imidazol enthält, musste das Protein in einen anderen Puffer überführt werden. Dies ist zum einen notwendig, da SDS während der Lagerung bei 4 °C ausfallen würde. Zum anderen bewirkt SDS die Denaturierung des Proteins und eine Rückfaltung in die native Struktur ist nur durch den Austausch des Detergens möglich. Des Weiteren wird durch die Dialyse Imidazol entfernt, welches bei der Bestimmung der Proteinkonzentration auf Grund seiner aromatischen Struktur zu einem verfälschten Ergebnis führen würde.

## Materialien und Methoden

Tabelle 3-14: Zusammensetzung des Dialysepuffers.

Puffer	Zusammensetzung
Dialysepuffer	20 mM HEPES 150 mM KCl 0.05 % (w/v)DDM pH 7

### Durchführung

Zunächst wurden die in einer 10 mM Natriumazidlösung gelagerten, etwa 10 cm langen Dialyseschläuche (Größenausschluss: 14 kDa) in Reinstwasser gewaschen und anschließend sowohl Innen als auch Außen mit Dialysepuffer gespült. Die Schläuche wurden einseitig verschlossen und die zu vereinenden Fraktionen der Elution hinein pipettiert. Der verschlossene Schlauch wurde im Anschluss in einem Überschuss von 500–600 mL Dialysebuffer gegeben. Der Austausch erfolgte bei Raumtemperatur über zwei Nächte unter leichtem stetigem Rühren. Im Anschluss an die Dialyse wurden die Lösungen aufkonzentriert. Zu diesem Zweck wurden Vivaspin® Zentrifugalkonzentratoren (Sartorius) mit einem Volumen von 500 µL und einer Größenausschlussgrenze von 5 kDa verwendet. Die Zentrifugation erfolgte für 10 min bei 13.3 xg und 4 °C (Scientific Thermo Fisher). Je nach gewünschter Aufkonzentration wurde der Vorgang 2- bis 3-mal durchgeführt. Anschließend wurde die in der Filtrationskammer zurückbleibende Lösung entnommen und die Konzentration mit Hilfe des Spektrophotometer NanoDrop 2000c bestimmt.

### 3.2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Bei der UV/vis-spektroskopischen Bestimmung der Proteinkonzentration wird ausgenutzt, dass aromatische Aminosäuren wie Trypsin, Tryptophan und Phenylalanin bei einer Wellenlänge von 280 nm eine charakteristische Absorption aufweisen. Unter Berücksichtigung des Lambert-Beerschen Gesetzes (Formel 3-2), welches das Verhältnis der Intensität einer Strahlung vor ( $I_0$ ) und nach ( $I$ ) dem Durchtritt eines Mediums beschreibt, kann die Absorption  $A$  als dekadischer Logarithmus dieses Verhältnisses beschreiben werden (siehe Formel 3-3). Die Konzentration der Lösung kann somit nach Formel 3-4 berechnet werden.

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon \cdot c \cdot d} \quad 3-2$$

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad 3-3$$

$$c = \frac{A_{280}}{\varepsilon \cdot d} \quad 3-4$$

Die Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm ( $A_{280}$ ) erfolgte durch photometrische Messung. Die Schichtdicke ( $d$ ) wurde durch das Gerät vorgegeben und betrug 1 cm. Der molare Absorptionskoeffizient ( $\varepsilon$ ) des Proteins wurde mit Hilfe des *ProtParam* Tools anhand der Aminosäuresequenz des Proteins berechnet. Für das Fusionsprotein wurde ein molarer Absorptionskoeffizient von  $28.085 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  bestimmt.

### 3.2.8 Thrombinverdau

Da der, dem natürlichen H<sub>v</sub>1-Protein, angefügte N-terminale, Hexa-Histidin-Tag basische Eigenschaften besitzt, sollte dessen Auswirkung auf die Proteinaktivität untersucht werden. Zum Zweck der Abspaltung des Tags, wurde während der Dialyse Thrombin hinzugegeben. Die Serinprotease schneidet selektiv innerhalb der Erkennungssequenz *Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser* nach dem Arginin. Diese Sequenz wurde wie der His<sub>6</sub>-Tag selbst durch die Umklonierung eingeführt und ermöglicht in diesem Fall die Abtrennung eines Fragments von 17 Aminosäuren inkl. des His<sub>6</sub>-Tags.

#### Durchführung

Nach der Dialyse (siehe Kapitel 3.2.6) wurde nochmals nach dem analogen Verfahren dialysiert. Hierbei wurde zusätzlich Thrombin in einer Konzentration von 0.17 mg pro mL dialysierter Proteinlösung hinzugegeben. Der Thrombinschnitt wurde etwa 20 h bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurde der Erfolg des Thrombinverdaus mittels SDS-PAGE überprüft.

## Materialien und Methoden

### 3.2.9 Analyse der Sekundärstruktur des H<sub>v</sub>1-Proteins mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Die Methode der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (engl. *circular dichroism spectroscopy*, CD-Spektroskopie) ermöglicht es, die Anteile der einzelnen Sekundärelemente wie  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und Schleifen an der Struktur eines Proteins aufzuklären. Die CD-Spektroskopie ist somit ein geeignetes Verfahren um die korrekte Rückfaltung eines Proteins, wie auch dessen Stabilität, zu untersuchen.

#### Physikalische Grundlagen

Der Zirkulardichroismus bezeichnet die Eigenschaft chiraler, optisch aktiver Moleküle links (d.h. gegen den Uhrzeigersinn) bzw. rechts (d.h. mit dem Uhrzeigersinn) zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren. Der Grund für diese Absorptionsdifferenz liegt entweder in der Chiralität des Moleküls, wie sie zum Beispiel bei asymmetrisch substituierten Kohlenstoffatomen vorliegt, oder in der chiralen Umgebung des Moleküls. Die Moleküle besitzen auf Grund ihrer zirkulardichroistischen Eigenschaften unterschiedliche Extinktionskoeffizienten für links (L) und rechts (R) zirkular polarisiertes Licht. Somit kann die Absorptionsdifferenz nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (siehe Formel 3-3) wie folgt beschrieben werden (siehe Formel 3-5). Dabei stehen die Indizes für den Drehsinn des zirkular polarisierten Lichtes.

$$\Delta A = A_L - A_R = \varepsilon_L \cdot c \cdot d - \varepsilon_R \cdot c \cdot d = \Delta\varepsilon \cdot c \cdot d \quad 3-5$$

Das Prinzip der CD-Spektroskopie beruht auf der Messung der Absorptionsdifferenz von zirkular polarisiertem Licht vor und nach dem Durchtritt durch eine chirale, optisch aktive Substanz in Abhängigkeit der Wellenlänge. Das eingesetzte linear polarisierte Licht ist zu gleichen Teilen aus rechts und links zirkulär polarisiertem Licht zusammensetzt (siehe Abbildung 3-5 A). Nach dem Durchtritt durch die Substanz besteht das Licht, auf Grund der unterschiedlichen Absorption, zu unterschiedlichen Anteilen aus links und rechts drehendem Licht.



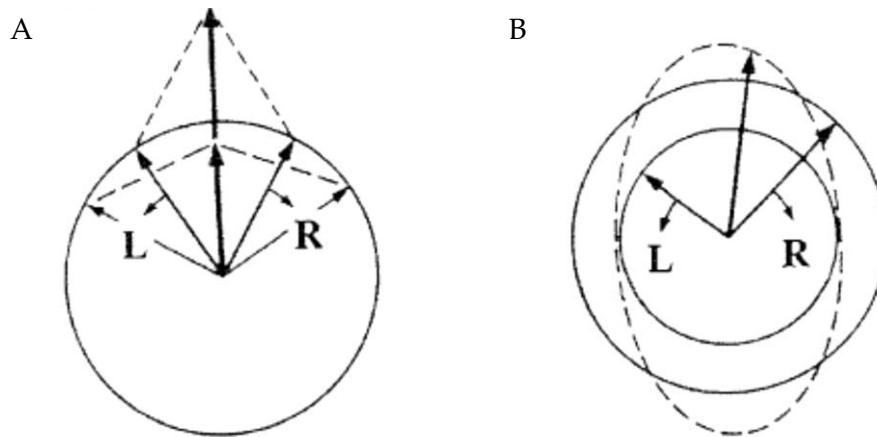


Abbildung 3-5: Vektordarstellung des linear polarisierten Lichts vor (A) und nach dem Durchtritt (B) durch ein optisch aktives Medium. Aus der unterschiedlichen Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht resultiert eine elliptische Polarisation. Angefertigt nach: Kelly *et al.*<sup>[119]</sup>

Hieraus resultiert eine elliptische Polarisation. Diese kann als Elliptizität ( $\theta_{\text{abs}}$ ) anhand der Winkelbeziehung zwischen der Haupt- ( $H$ ) und der Nebenachse ( $N$ ) der Ellipse beschrieben werden (siehe Formel 3-6).

$$\theta_{\text{abs}} = \tan^{-1} \left( \frac{N}{H} \right) \quad 3-6$$

Zwischen der Elliptizität und der Absorptionsdifferenz besteht ein numerischer Zusammenhang (siehe Formel 3-7):

$$\theta_{\text{abs}} = \Delta A \cdot 32.98 \quad 3-7$$

Da sich die zirkulardichroitische Eigenschaft bzw. die Elliptizität eines Moleküls aus den Beiträgen der einzelnen sekundären Strukturelemente zusammensetzt, kann diese auch wie folgt beschrieben werden (siehe Formel 3-8).

$$\theta(\lambda) = f_{\alpha} \theta_{\alpha} + f_{\beta} \theta_{\beta} + f_{\text{T}} \theta_{\text{T}} + f_{\text{r}} \theta_{\text{r}} \quad 3-8$$

Hierbei beschreibt  $f$  den Anteil des jeweiligen Sekundärstrukturelements an der Gesamtstruktur. Die Indizes  $\alpha$ ,  $\beta$ , T und r bezeichnen die einzelnen Elemente  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt, Schleifen (engl. *Turns*) sowie Zufallsknäuel (engl. *random coil*).<sup>120</sup>

## Materialien und Methoden

Die Auswertung der Spektren erfolgt zunächst über eine Anpassung der Datenpunkte an einen geeigneten Algorithmus. Das Ergebnis der Anpassung wird anschließend mit einer Datenbank verglichen. Zu diesem Zweck wird die Elliptizität im Vorfeld normiert und als mittlere residuale Elliptizität angegeben:

$$\theta = \frac{\theta_{\text{abs}}}{c [\text{M}] \cdot d [\text{cm}] \cdot n \cdot 10} [\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}] \quad 3-9$$

Hierbei bezeichnet  $c$  die Konzentration der Probe,  $d$  die Weglänge der Küvette und  $n$  die Anzahl der im Protein vorliegenden Aminosäuren und  $\theta_{\text{abs}}$  die bestimmte Elliptizität. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Online-Analyseprogramm DichroWeb genutzt. Hierbei wurden der Algorithmus CDSSTR sowie der Referenzdatensatz 4 verwendet.

In Proteinen liegen asymmetrische Peptidbindungen vor, welche die Anwendung der CD-Spektroskopie im fernen UV-Bereich (170–250 nm) bei der Untersuchung ihrer Struktur ermöglichen. Hierbei bestimmen  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge bei 220 nm und  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge bei 190 nm den Verlauf der CD-Spektren (siehe Abbildung 3-6).<sup>[121]</sup>

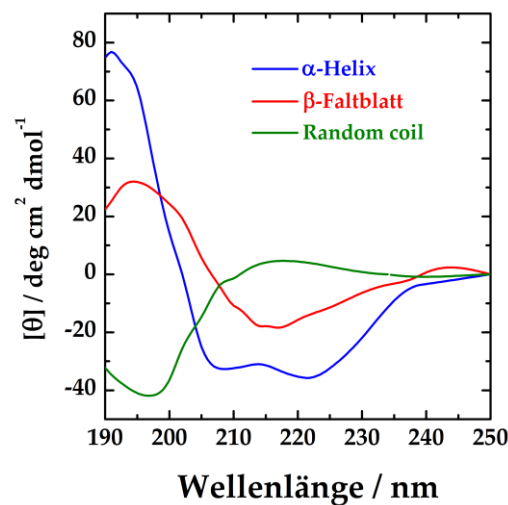


Abbildung 3-6: Charakteristische Verläufe der CD-Spektren der Sekundärstrukturelemente  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und Random coil. Gezeigt sind diese am Beispiel des Proteins Poly-L-Lysin nach Greenfield *et al.* Das Spektrum der  $\alpha$ -Helix (blau) zeigt ein deutliches Minimum bei etwa 220 nm und ein Maximum bei ca. 190 nm. Maximum und Minimum des  $\beta$ -Faltblattes (rot) sind geringer ausgeprägt und zu etwa 195 nm und 217 nm verschoben. Das Motiv des Random coil (grün) zeigt ein gegensätzliches Verhalten und besitzt bei 195 nm ein deutliches Minimum. Angefertigt nach: Greenfield *et al.*<sup>[122]</sup>

Die charakteristischen CD-Spektren der einzelnen Sekundärstrukturelemente, welche anhand des Proteins Poly-L-Lysin in Abbildung 3-6 dargestellt sind, weisen deutliche Unterschiede auf. Während das Spektrum des  $\alpha$ -helikalen Anteils ein deutliches Maximum

bei etwa 190 nm und zwei Minima bei etwa 210 nm und 220 nm aufweist, verläuft das Spektrum des Random coil entgegengesetzt. Hier kann ein Minimum bei etwa 195 nm beobachtet werden. Das Spektrum des  $\beta$ -Faltblatts zeigt im Vergleich zur  $\alpha$ -Helix ein weniger stark ausgeprägtes Maximum bei 195 nm bzw. Minimum bei 217 nm.

### **Durchführung**

Die Aufnahme der CD-Spektren erfolgte mit Hilfe eines CD-Spektrometers (Jasco) bei einer konstanten Temperatur. Das Gerät wurde bereits 30 min vor dem Einschalten der Quecksilber-Lampe und während der Messung kontinuierlich mit Stickstoff gespült. Dies diente der Vermeidung der Entstehung reaktiven Sauerstoffs durch UV-Einstrahlung, welcher im Folgenden mit weiteren Sauerstoffmolekülen zu Ozon reagieren könnte. Ozon ist auf Grund seiner aggressiven oxidativen Eigenschaften schädlich für die Spiegel des Gerätes. Bevor die eigentliche Probe untersucht wurde, wurde ein Spektrum des Puffers aufgenommen. Dieses Hintergrundspektrum wurde später von dem Spektrum der Probe subtrahiert. Für die Messungen wurden Dünnschichtküvette (Helma) mit einer Schichtdicke von 0.1 mm und 0.5 mm und einem Volumen von 26  $\mu$ L bzw. 130  $\mu$ L verwendet. Sie wurde im Vorfeld der Messung 20 min in Hellmanex gereinigt und anschließend mit Reinstwasser und Ethanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Tabelle 3-15: Parameter der CD-spektroskopischen Messungen des Proteins H<sub>v</sub>1.

<b>Parameter</b>	<b>Einstellungen</b>
<b>Wellenlängenbereich</b>	260–190 nm
<b>Abstand der Messpunkte</b>	0.1 nm
<b>Scanmodus</b>	kontinuierlich
<b>Sensitivität</b>	200 mdeg
<b>Scangeschwindigkeit</b>	10 nm/min
<b>Bandbreite</b>	1 nm
<b>Anzahl der akkumulierten Spektren</b>	5
<b>Temperatur</b>	20 °C

### 3.3 Rekonstitution des H<sub>V</sub>1-Proteins in unilamellare Vesikel

#### 3.3.1 Detergenzien und Lipide

Die Solubilisierung (siehe Kapitel 3.2.2) des transmembranen H<sub>V</sub>1-Proteins, sowie dessen Rekonstitution macht den Einsatz von Detergenzien notwendig. Ihre allgemeine Struktur setzt sich aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einem hydrophoben Schwanz zusammen. Für die Lösung des Proteins wurde u. a. das Tensid Natriumdodecylsulfat verwendet, dessen allgemeine Strukturformel in Abb. Abbildung 3-7 wiedergegeben ist. SDS besitzt eine kritische Mizellbildungskonzentration (engl. *critical micelle concentration*, CMC) von 7–10 mM. Die Lösung eines Proteins mittels SDS ist sehr effektiv, bewirkt aber dessen Denaturierung (wie bereits in Kapitel 3.2.4 beschrieben) und erfordert daher dessen Rückfaltung durch einen Detergens Austausch. Des Weiteren ist das Kaliumsalz des Detergens unlöslich, somit muss SDS entfernt werden sobald ein kaliumhaltiger Puffer eingesetzt wird.

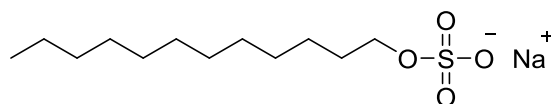


Abbildung 3-7: Strukturformel von Natriumdodecylsulfat, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S, M = 288.4 g·mol<sup>-1</sup>.

N-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat (Solfubetain-12, SB-12, siehe Abbildung 3-8) besitzt wie SDS eine negative Kopfgruppe und trägt ebenfalls einen Dodecylrest. Diese Sulfongruppe ist gekoppelt an ein positiv geladenes Stickstoffatom, das den Alkylrest trägt. Das zwitterionische Detergens weist eine CMC von 3.3 mM auf und denaturiert Proteine im Gegensatz zu SDS nicht. Li *et al.* zeigten in einem Detergens *Screening*, dass sich u. a. SB-12 eignet um die spannungsdetektierende Domäne der *Ciona intestinalis* voltage-dependent phosphatase (Ci-VSP) aus *E. coli* zu isolieren.<sup>[27]</sup> Da diese eine dem H<sub>V</sub>1-Protein homologe Struktur aufweist, sollte die Solubilisierung mittels SB-12 ebenfalls untersucht werden.

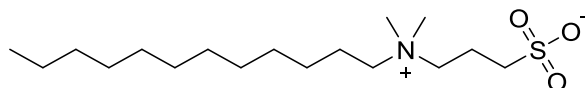


Abbildung 3-8: Strukturformel von *n*-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat, C<sub>17</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>3</sub>S, M = 335.5 g·mol<sup>-1</sup>.

Ein weiteres zwitterionisches Detergens (siehe Abbildung 3-9), welches wie SB-12 einen Stickstoff gebundenen Sulfonatrest trägt ist 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS). Jedoch ist dies an ein sterisch anspruchsvolles, hydrophobes

Cholesterinderivat geknüpft. Die CMC des Detergens liegt mit 6.5 mM im Bereich von SDS und erlaubt eine einfache Entfernung des Detergens durch Dialyse.

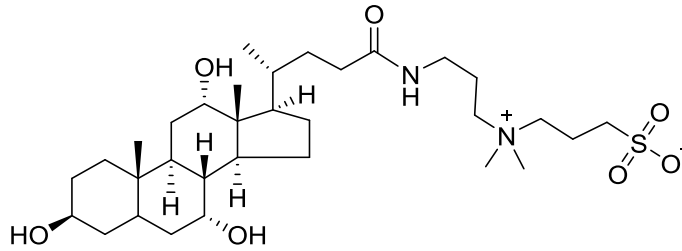


Abbildung 3-9: Strukturformel von 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonat,  $C_{32}H_{58}N_2O_7S$ ,  $M = 614.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Neben den geladenen Tensiden, wurden auch neutrale Detergenzien eingesetzt, welche eine hydrophile Maltose Kopfgruppe besitzen. Sowohl *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (siehe Abbildung 3-10) als auch dessen kürzeres Analogon *n*-Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid (siehe Abbildung 3-11). Ihre CMC ist deutlich kleiner und liegt für DDM bei 0.15 mM und für DM bei 1.6 mM. Die Entfernung der nichtionischen Detergenzien via Dialyse ist somit gegenüber CHAPS und SB-12 erschwert.<sup>[14]</sup> Lee *et al.* nutzen DDM bei der Isolation von H<sub>V</sub>1 aus *Pichia pastoris* Hefe und DM für dessen Rekonstitution.<sup>[1]</sup> Daher sollen auch die solubilisierenden Eigenschaft der Detergenzien bei der Isolation aus *E. coli* untersucht werden.

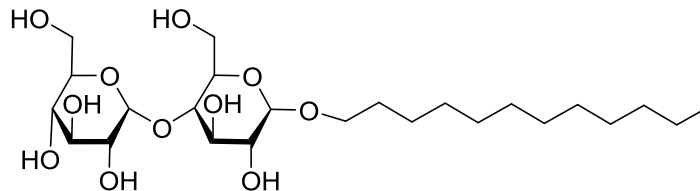


Abbildung 3-10: Strukturformel von *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid,  $C_{24}H_{46}O_{11}$ ,  $M = 510.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

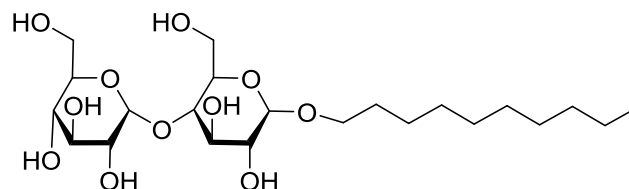


Abbildung 3-11: Strukturformel von *n*-Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid,  $C_{22}H_{42}O_{11}$ ,  $M = 482.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Zunächst sollte die mögliche Rekonstitution des H<sub>V</sub>1-Proteins in kleine unilamellare Vesikel (engl. *small unilamellar vesicle*, SUV) untersucht werden. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-

## Materialien und Methoden

phosphocholin (POPC; siehe Abbildung 3-12) wurde als Matrixlipid eingesetzt. POPC trägt einen Ölsäurerest an *sn*-2-Position, dessen *cis*-konfigurierte Doppelbindung einen erhöhten sterischen Anspruch im Vergleich zu gesättigten Fettsäuren besitzt. Die daraus resultierende geringere Packungsdichte der Lipide und bedingt eine niedrige Phasenumwandlungstemperatur ( $T_m$ ) von  $-2\text{ }^\circ\text{C}$ . Vesikel mit einem hohen POPC-Anteil besitzen daher bei Raumtemperatur eine fluide Membran.

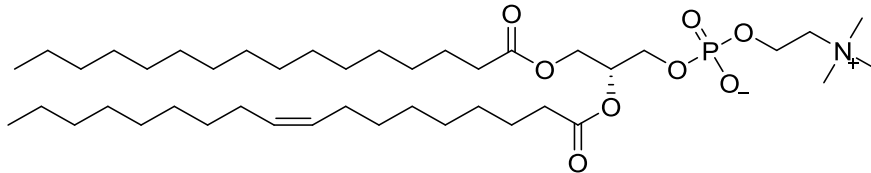


Abbildung 3-12: Strukturformel von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin,  $\text{C}_{42}\text{H}_{82}\text{NO}_8\text{P}$ ,  $M = 760.1\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Neben POPC wurden die Lipide 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG, siehe Abbildung 3-13, ) bzw. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serin (POPS, siehe Abbildung 3-14) eingesetzt. Sie besitzen ein analoges, hydrophobes Grundgerüst, jedoch sind die Kopfgruppen negativ geladen. Negativ geladene Lipide kommen zu einem hohen Anteil in der inneren Monolipidschicht einer Zellmembran vor. Sie machen z.B. bis zu 20 % in den Neutrophilen aus, in denen auch der  $\text{H}_v1$ -Kanal lokalisiert ist.<sup>[123]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein einfaches Membransystem imitiert werden, welches auch negative geladene Lipide beinhaltet. Die Phasenumwandlungstemperaturen liegen für POPG bei  $14\text{ }^\circ\text{C}$  und für POPS bei  $-2\text{ }^\circ\text{C}$ .

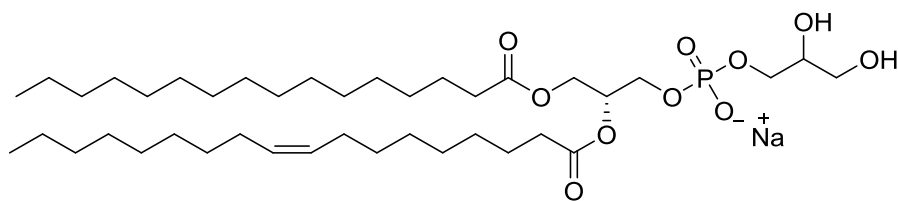


Abbildung 3-13: Strukturformel von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol,  $\text{C}_{40}\text{H}_{76}\text{O}_{10}\text{PNa}$ ,  $M = 770.4\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

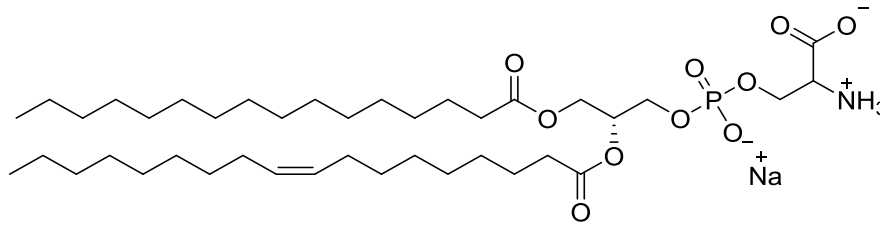


Abbildung 3-14: Strukturformel von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serin ,  $C_{40}H_{75}NO_{10}PNa$ ,  $M = 783.5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Neben den Phospholipiden wurde auch Cholesterin (Chol, siehe Abbildung 3-15) bei der Membranpräparation verwendet. Das starre Steroidgrundgerüst ist dabei an eine Hydroxylgruppe gebunden, welche die hydrophile Kopfgruppe bildet. Cholesterin spielt eine wichtige physiologische Rolle. Es senkt die Fluidität von Membranen welche einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren besitzen und *vice versa*. Des Weiteren wird in der Literatur diskutiert, dass durch den Cholesteringehalt die Membranschichtdicke einer Phospholipiddoppelschicht moduliert und somit die Rekonstitution bzw. Aktivität von Proteinen begünstigt werden kann. <sup>[124,125]</sup>

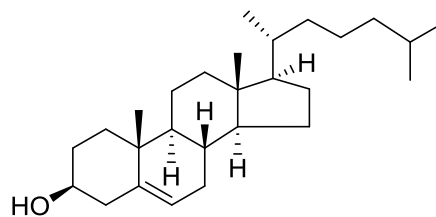


Abbildung 3-15: Strukturformel von Cholesterin;  $C_{27}H_{46}O$ ,  $M = 386.7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Für die, der Rekonstitution folgenden, Aktivitätsnachweise des  $H_V1$ -Kanals wurde u. a. ein Lipid gebundener Oregon Green<sup>®</sup> 488 (OG488, Thermo Fisher Scientific) Farbstoff eingesetzt. Dieser ist über eine Amidbindung an das Glycerophospholipid 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DHPE) spezifisch geknüpft (siehe Abbildung 3-16). Bei Oregon Green handelt es sich um ein halogeniertes Derivat des Fluorescein (FITC), welches u. a. als pH-Indikator oder zur Bestimmung des interzellularen pH-Wertes genutzt wird. OG488 besitzt eine Anregungswellenlänge von 490 nm und emittiert bei 514 nm.<sup>[126]</sup> OG488-DHPE hingegen besitzt ein Extinktions- bzw. Emissionsmaxima von 501 und 526 nm. <sup>[127]</sup>

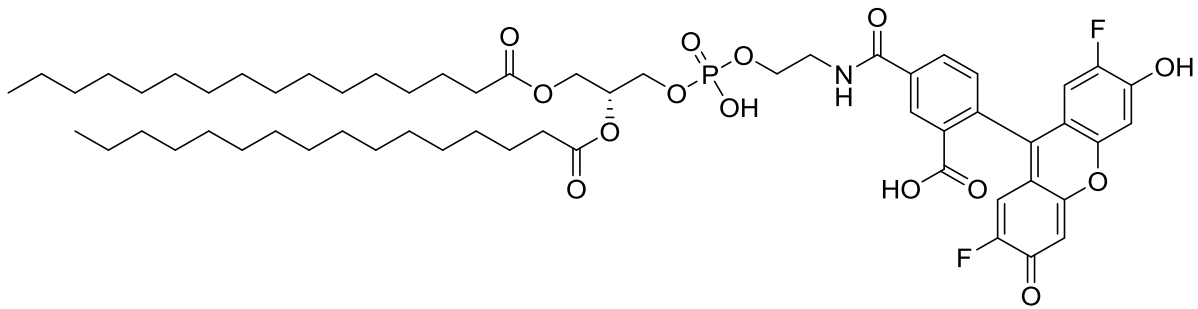


Abbildung 3-16: Strukturformel von Oregon Green® 488 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin,  $C_{58}H_{82}F_2NO_{14}P$ ,  $M = 1086.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### 3.3.2 Herstellung von Lipidfilmen

Durch Variation der Zusammensetzung der Filme, soll das optimale Lipidgemisch für die Rekonstitution des  $H_V1$ -Proteins ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden Lipidfilme der folgenden Zusammensetzungen hergestellt (siehe Tabelle 3-16). Die Filme besaßen eine Masse von 1, 2.5 oder 5 mg.

Tabelle 3-16: Zusammensetzung der Lipidfilme der  $H_V1$  Rekonstitution.

Lipide	Verhältnis / mol%
POPC/POPG	75:25
POPC/Chol	90:10
POPC/POPG/Chol	55:25:20
POPC/POPS/Chol	55:25:20
POPC/POPG/Chol	65:20:10

Für spätere Aktivitätsnachweise wurden ebenfalls Lipidfilme hergestellt, welche neben POPC, einem geladenen Lipid und Cholesterin, Oregon Green 488 DHPE enthielten (siehe Tabelle 3-17). Die Filme besaßen eine Masse von 2.5 mg.



Tabelle 3-17: Zusammensetzung der Lipidfilme, welche den Lipid gebundenen Fluorophor Oregon Green® 488 enthielten.

Lipide	Verhältnis / mol%
POPC/POPG/Chol/OG488-DHPE	54.5:25:20:0.5
POPC/POPG/Chol/OG488-DHPE	54:25:20:1

Für die Herstellung der Filme wurden zunächst Reagenzglaschen mit Chloroform gespült, welche im Anschluss verdampft wurde. Es wurden anschließend 400 µL Chloroform vorgelegt und die entsprechend der Zusammensetzung benötigten Volumina der Lipidstammlösungen hinzupipettiert. Die Konzentration, der in Chloroform gelösten Lipide, betrug 10–50 mg/mL. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Stickstoffgegenstrom bei 30 °C für etwa 10 min verblasen. Die Filme wurden abschließend für 2 h bei 30 °C unter Vakuum getrocknet und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

### 3.3.3 Rekonstitution des H<sub>v</sub>1-Proteins in unilamellare Vesikel

Die Rekonstitution von Membranproteinen in eine Lipiddoppelschicht ist ein essenzieller Schritt und Grundlage für ihre Untersuchung, da erst in ihrer natürlichen Umgebung ihre Aktivität studiert werden kann. Des Weiteren erlaubt die Rekonstitution in künstliche Membransysteme die Protein-Lipid-Wechselwirkung, sowie den Einfluss der Lipidkomposition auf die Proteinaktivität zu analysieren. Liposomen eignen sich zu diesem Zweck besonders, da sie einfach hergestellt werden können und im Inneren ein wässriges Kompartiment aufweisen. Dies ermöglicht es sowohl Konzentrations-, als auch Ladungsgradienten zwischen äußeren und inneren Kompartiment zu erzeugen. Speziell bei der Forschung an Transporter- und Kanal-Proteinen ist dies von großer Bedeutung.<sup>[128]</sup>

Es gibt grundsätzlich zwei Ansätze bei der Detergens vermittelten Rekonstitution von Proteinen in unilamellare Vesikel. Bei der Co-Mizellierung werden in Detergens gelöstes Protein und Lipide vermischt. Hierbei entstehen binäre Lipid-Detergens- als auch ternäre Lipid-Protein-Detergens-Mizellen. Anschließend wird das Detergens entzogen und durch die spontane Aggregation wird das Protein in den gebildeten Lipidmembran inkorporiert. Ein andere Variante ist Detergens vermittelte direkte Insertion bei der vorgefertigte Vesikel eingesetzt werden.<sup>[129,128]</sup> In dem ersten Schritt werden die unilamellaren Vesikel mit Detergens solubilisiert (siehe Abbildung 3-17), wodurch die Struktur der Vesikel aufgelockert wird. Anschließend wird das gelöste Protein hinzugegeben, welches vermittelt durch das Detergens in die Lipiddoppelschicht insertiert. Im Gegensatz zur Methode der Co-Mizellierung inkorporieren die Proteine hierbei in einer Vorzugsrichtung. Abschließend

## Materialien und Methoden

wird das Detergens durch Dialyse oder Gelfiltration von den Proteoliposomen entfernt. Bei der auch als Step-by-Step Methode bekannte Rekonstitution ist die Konzentration an Detergens entscheidend, da oberhalb einer System spezifischen, kritische Konzentration die Vesikel vollständig solubilisiert werden. Es entstehen dann gemischte Mizellen aus reinen Lipiden, Detergens und Proteinen. Die Rekonstitution würde somit dem Prinzip der Co-Mizellierung folgen.

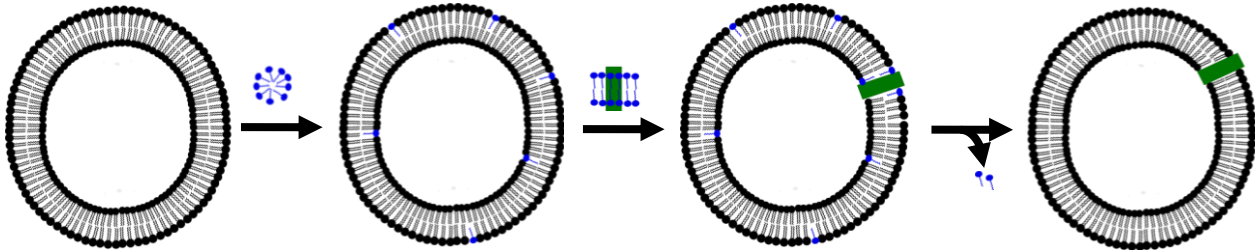


Abbildung 3-17: Schematische Darstellung der Rekonstitution nach der Methode der direkten Insertion. Zunächst werden unilamellare (schwarz) Vesikel durch die Zugabe von Detergenz (blau) solubilisiert. Anschließend wird das in Detergenz gelöste Protein (grün) zugesetzt, dieses insertiert in die destabilisierten Vesikel. Im Anschluss wird das Detergent durch Dialyse entfernt.

## Durchführung

Zunächst wurden kleine unilamellare Vesikel hergestellt. Hierzu wurden die verschiedenen Lipidfilme (siehe Tabelle 3-16 & Tabelle 3-17) bis zu einer Lipidkonzentration von 10 mg/mL mit Vesikelpuffer (siehe Tabelle 3-18) versetzt und 45 min rehydratisiert. Anschließend wurden die Suspensionen dreimal 30 s geschüttelt, wobei zwischen dem Schütteln eine 5 minütige Pause eingehalten wurde (Vortexer II). Die hierbei entstandenen multilamellaren Vesikel wurden durch 45 minütige Ultraschallbehandlung (Pulsstufe 4 x 10 %, Amplitude: 50–60 %, Sonopuls HD2070 mit Becherresonator, Bandelin) in unilamellare Liposomen überführt.<sup>[130]</sup> Diese wurden über 2 h (bzw. 1 h) mit dem Detergens *n*-Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid (0.74 % (*w/v*), 15.3 mM) unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde nochmals die gleiche Menge der 10 %igen DM-Lösung hinzugegeben. Es folgte die Zugabe des gelösten Proteins in verschiedenen Protein-zu-Lipid Verhältnissen im Bereich von 1:80 bis 1:2920 (*w/w*) (entsprechend 1:4300 (*n/n*) bzw. 1:156000 (*n/n*)). Die Rekonstitution erfolgte unter leichtem Schwenken bei 4 °C über 4 h (bzw. 3 h). Abschließend wurde das Detergens durch eine Dialyse über zwei Nächte (bzw. eine Nacht) entfernt. Die Dialyse erfolgte wie in dem Kapitel 3.2.6 beschriebenen, wobei Vesikel statt Dialysepuffer verwendet wurde. Der Puffer wurde nach 2 h, sowie am Morgen und Abend des Folgetages ausgetauscht. Als Referenz- bzw. Blindprobe bei den Messung der Aktivitätsnachweise (siehe 3.4), als auch der Impedanzspektroskopie (siehe 3.5.2) dienten einfache Liposomen. Diese enthielten kein Protein, wurden aber analog zu dem

obengenannten Verfahren präpariert. Statt Protein wurde ein äquivalentes Volumen Vesikelpuffer hinzugegeben. Sie werden im Folgenden auch als Blindvesikel bezeichnet.

Tabelle 3-18: Zusammensetzung des Vesikelpuffer.

Puffer	Zusammensetzung
Vesikelpuffer	20 mM HEPES
	150 mM KCl
	0.2 mM EDTA
	2 mM $\beta$ -ME
	pH 7

### 3.3.4 Nachweis der Rekonstitution durch Dichtegradientenzentrifugation

Mittels einer Dichtegradientenzentrifugation, einem Verfahren, welches Moleküle anhand ihrer Sedimentationseigenschaften auftrennt, sollte der Erfolg der Rekonstitution überprüft werden. Hierbei erfolgt die Ultrazentrifugation der Proteoliposomen in einem Dichtegradienten des nicht ionischen Dichte Mediums Nycodenz®. Freies Protein sollte auf Grund seiner hohen Dichte am Boden des Zentrifugenröhrchens pelletieren. Proteoliposomen hingegen besitzen auf Grund ihres wässrigen Kompartiments eine Dichte nahe der, des Puffers und sollten schweben auf.<sup>[114]</sup>

#### Durchführung

Nach der Beendigung der Dialyse (siehe Kapitel 3.3.3) wurden zunächst 40  $\mu$ L der Proteoliposomen mit 40  $\mu$ L einer 80 %igen Nycodenz-Lösung vermischt und in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Hierauf wurden 40  $\mu$ L einer 30 %igen Nycodenz-Lösung, sowie 40  $\mu$ L Vesikelpuffer geschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte über 2.5 h bei 45000 upm und 4 °C. Im Anschluss wurden je viermal 20  $\mu$ L der oberen, sowie 20  $\mu$ L Probenvolumen der unteren Schicht entnommen und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert.

### 3.4 Aktivitätsnachweis mittels fluoreszenzbasiertem Protonenfluss-Test

Neben der Bestätigung der erfolgreichen Rekonstitution des H<sub>v</sub>1-Proteins mittels Nycodenz-Assay, soll dessen Aktivität innerhalb der Proteoliposomen mit Hilfe eines fluoreszenzbasierten Fluxtests überprüft werden. Allgemein werden bei indirekten Influxtest sogenannte Indikatormoleküle in dem inneren Kompartiment des Vesikels eingeschlossen. Diese interagieren bei erfolgreicher Translokation des Substrats durch einen Kanal oder Transporter mit diesem Substrat. Der indirekte Nachweis erfolgt somit über Farb-, Fluoreszenz oder Enzymreaktionen, welche durch Absorptions- oder Fluoreszenzmessungen detektiert werden können.<sup>[114]</sup>

#### Physikalische Grundlagen

Eine wichtige Rolle bei der Analyse biochemischer Systeme und Strukturen, sowie deren Änderungen spielen Methoden der Mikroskopie und Spektroskopie von Fluoreszenzeigenschaften. Hierbei werden unter anderem lipid- oder proteingebundene, sowie freie Fluoreszenzmarker eingesetzt. Diese reagieren auf strukturelle oder auch äußere Modifikationen mit der Änderung ihrer Fluoreszenzintensität. Hierbei zu Grunde liegt das physikalische Prinzip der Fluoreszenz, der spontanen Emission von Licht. Die elektronischen Übergänge bei diesem Prozess sind in dem Jablonski-Diagramm (siehe Abbildung 3-18) dargestellt. Erfolgt durch Absorption von Licht ein vertikaler Übergang aus dem Grundzustand S<sub>0</sub> in einen höheren Schwingungszustand des elektronisch angeregten Zustand S<sub>1</sub>, so kann durch strahlungslose Relaxation (SR) der Grundschwingungszustand erreicht werden. Aus diesem Niveau ist es dem Elektron möglich unter spontaner Emission in den Grundzustand S<sub>0</sub> zurückzukehren.

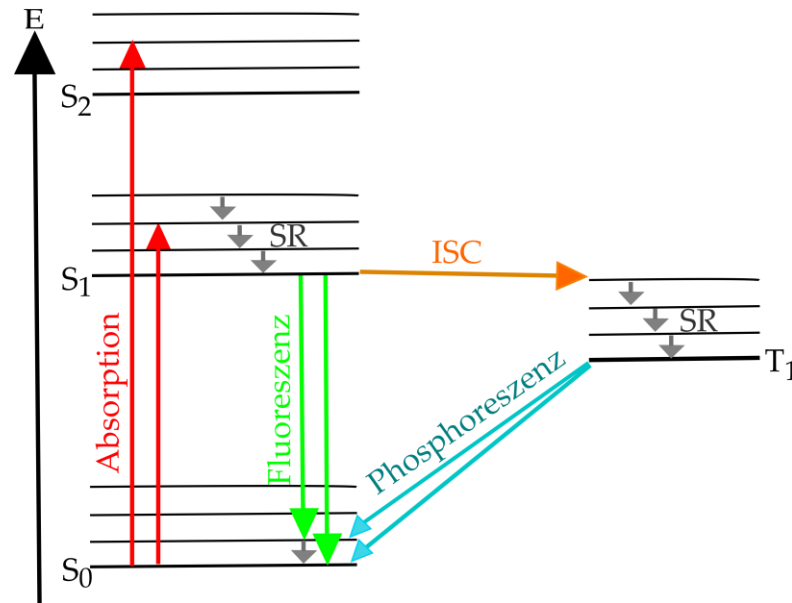


Abbildung 3-18: Vereinfachte Darstellung des Jablonski-Diagramms. Fluoreszenz (grün) ist die spontane Emission von Licht. Sie resultiert aus der vorangegangenen Absorption (rot) von Licht, wodurch ein angeregter, elektronischer Zustand (S<sub>1</sub>) erreicht wird. Aus dessen Schwingungsgrundniveau erfolgt, nach strahlungslosen Relaxationen (SR), der spontane Übergang in den Grundzustand (S<sub>0</sub>) unter Aussendung von energieärmerer Strahlung, der Fluoreszenz.

Da bei der strahlungslosen Relaxation bereits Energie an die Umgebung abgegeben wurde, ist die Fluoreszenzstrahlung energieärmer und gegenüber der absorbierten Strahlung zu längeren Wellenlängen verschoben. Dieser Effekt wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet. Neben der Fluoreszenz ist es dem System möglich, durch quantenphysikalisch verbotene Spinumkehr vom S<sub>1</sub>-Zustand in den überlappenden Tripletzustand T<sub>1</sub> überzugehen. An den als *intersystem crossing* (ISC) bezeichneten Prozess, schließen sich strahlungslose Übergänge an, welche den abschließenden Übergang in den Grundzustand S<sub>0</sub> ermöglichen. Auf Grund der geringen Wahrscheinlichkeit der verbotenen Spinumkehr, besitzt dieser Prozess, der Phosphoreszenz, eine deutlich längere Lebensdauer als die Fluoreszenz.

### 3.4.1 ACMA basierter Protonenfluss-Test

9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin (ACMA, siehe Abbildung 3-19) ist ein bekannter Fluorophor, welcher als Indikatormolekül bei Influxtests dient. Der pH-sensitive Fluoreszenzmarker erlaubt den Nachweis von H<sub>V</sub>1-Kanal vermittelten Protoneneinströmen in die Liposomen. Lipophile Acridin-Farbstoffe wie Acridinorange (AO) oder ACMA sind in der Literatur schon Jahrzehnte bekannt. So wird AO neben der qualitativen Detektion von pH-Änderungen bei Zellfärbung eingesetzt. ACMA wird unter anderem bei Anfärbung von Nucleinsäuren verwendet.<sup>[126]</sup> Dufour *et al.*, Zhang *et al.* sowie Rottenberg *et al.* beschreiben den Einsatz von ACMA bei dem Nachweis der Protonentranslokation durch die V-ATPase.<sup>[131,132,133]</sup> Auch Lee *et al.* nutzen den etablierten Fluxtest bei der Bestätigung der

## Materialien und Methoden

funktionellen Rekonstitution des  $H_V1$ -Kanals.<sup>[1]</sup> Die unprotonierte Form des ACMA ist membrangängig und kann somit einfach der Probenlösung zugesetzt werden. Dort liegt es im Gegensatz zu 9-Aminoacridin, auch bei hohen Konzentrationen (bis zu 200  $\mu\text{M}$ ) nicht als Dimer vor.<sup>[134]</sup> Unter physiologischen Bedingungen erfolgt zunächst die Protonierung des aromatischen Stickstoffes ( $\text{pK}_s = 8.6$ ), dies bewirkt eine Akkumulation des Farbstoffes und eine Löschung der Fluoreszenz. Die Anregungs- und Emissionswellenlänge von ACMA liegen bei etwa 419 nm und 484 nm.<sup>[126]</sup>

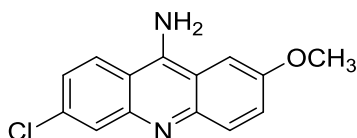


Abbildung 3-19: Strukturformel von 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin,  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}$ ,  $M = 258.7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Bei dem vorliegenden Fluxtest wird der  $H_V1$  vermittelte Protoneneinstrom durch eine künstliche Spannungsänderung über der Membran induziert. Hierzu wird zunächst ein 20-facher Kaliumgradient entlang der Membran eingestellt. Die Zugabe des Kaliumionophor Valinomycin bewirkt den Ausstrom der Kaliumionen, aus den Vesikeln, entlang des Gradienten (siehe Abbildung 3-20). Die negative Überschussladung im Vesikelinneren, wird durch die Öffnung des Kanals und den Einstrom von Protonen ausgeglichen. Diese wiederum leiten die Löschung der ACMA Fluoreszenz durch dessen Protonierung ein. In der geladenen Form ist der Fluorophor nicht in der Lage die Membran zu passieren, wodurch es zu einer Akkumulation kommt. Abschließend wird der Protonophor Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon (CCCP) der Lösung hinzugesetzt. Hierdurch wird die Löschung der Fluoreszenz innerhalb der Vesikeln, die kein  $H_V1$ -Protein beinhalten, erzielt.

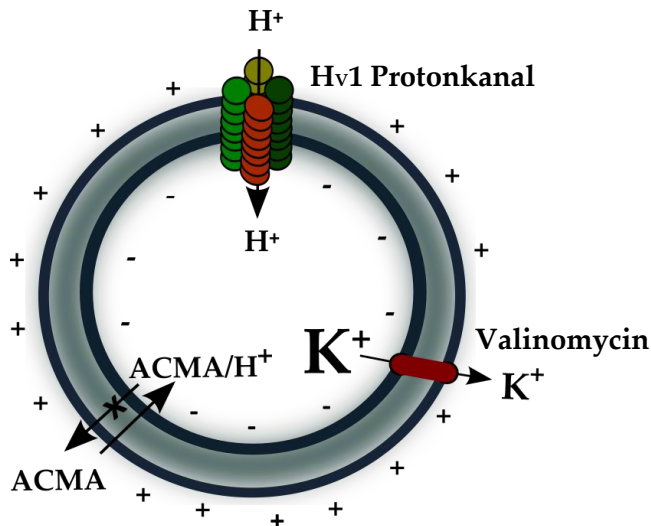


Abbildung 3-20: Schematische Darstellung des Prinzips des Protonenfluss-Test. Die Zugabe von Valinomycin erlaubt den Ausstrom der Kaliumionen entlang des 13-fachen Kaliumgradienten. Hierdurch wird eine negative Überschussladung im Vesikelinneren generiert. Diese plötzliche Ladungsverschiebung induziert die Öffnung des Hv1-Kanals, dieser leitet Protonen ein. Diese wiederum protonieren den Fluorophor ACMA, welcher in der kationischen Form nicht membrangängig ist, daher akkumuliert und gelöscht wird.

### Durchführung

Die Messungen des ACMA basierten, indirekten Protonenfluss-Test, welcher im Folgenden auch als Protonenfluss-Assay oder Protoneneinstrom-Assay bezeichnet wird, erfolgte an einem Spektralfluorimeter (Jasco) bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm und 5 nm Frequenzbandbreite statt. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm und ebenfalls 5 nm Bandbreite detektiert. In einer Quarzküvette (1.5 mL Volumen) wurden zunächst 660  $\mu$ L Fluxpuffer ebenso wie ein Rührstäbchen vorgelegt. Nachdem die Strahlungsintensität auf null gesetzt wurde, wurden 6–8  $\mu$ L ACMA-Stammlösung (1.7–2.3  $\mu$ M) hinzugegeben. Sobald eine konstante Intensität über einen Zeitraum von mind. 30 s beobachtet wurde, wurden 15  $\mu$ L der Vesikel-Suspension hinzupipettiert. Die Zugabe von 10  $\mu$ L Valinomycin-Stammlösung (12.9 nM) erfolgte, sobald sich erneute eine gleichbleibende Intensität eingestellt hatte, durch ein Septum mittels Mikroliterspritze. Dies garantierte, dass die Messung nicht unterbrochen werden musste. Der Verlauf der Fluoreszenzintensität wurde bis zum Erreichen eines Minimums detektiert. Abschließend wurde der Protonophors CCCP (5.8 nM) hinzugesetzt. Hierdurch wurde der Protoneneinstrom in jene Vesikel induziert, welche keinen oder einen nicht funktionellen Protonenkanal inkorporiert haben. Mit Hilfe dieses Schrittes konnte die maximal zu löschende Fluoreszenz innerhalb der Vesikel ermittelt werden, dies ist gleich bedeutend mit der minimalen Fluoreszenzintensität. Neben den einfachen Messungen zur Aktivitätsbestimmung, wurde in weiteren Messungen eine mögliche Inhibition bzw. Aktivierung des Kanals untersucht. Zu diesem Zweck wurde dem System, im Anschluss an die ACMA-Zugabe, der Inhibitor 2-Guanidinbenzimidazol (2GBI) sowie ZnCl<sub>2</sub> oder der Aktivator *N*-Arachidonylethanolamid (Anandamid, AEA) in

## Materialien und Methoden

verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Als Blindprobe wurden einfache Vesikel eingesetzt.

Tabelle 3-19: Zusammensetzung des Fluxpuffer und der Stammlösungen des Protonenfluss-Test.

Puffer	Zusammensetzung
<b>Fluxpuffer</b>	20 mM HEPES 150 mM NaCl 7.5 mM KCl 0.2 mM EDTA pH 7
<b>ACMA</b>	0.2 mM in EtOH
<b>Valinomycin</b>	0.9 $\mu$ M in DMSO
<b>CCCP</b>	2 $\mu$ M in DMSO
<b>2GBI</b>	15 mM in Fluxpuffer
<b>AEA</b>	10 mM in EtOH
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	30 mM in Fluxpuffer

### 3.4.2 Oregon Green 488 basierter Protonenfluss-Test

Neben dem freien Fluorophor ACMA, wurde auch der lipidgebundene Farbstoff OG488-DHPE (siehe Kapitel 3.3.1) zum Nachweis der Protonenleitung durch den H<sub>v</sub>1-Kanal eingesetzt. OG488 eignet sich ähnlich wie Fluorescein zur Detektion von pH-Änderungen. Jedoch liegt der pK<sub>s</sub>-Wert des freien OG488 deutlich unter dem des Fluorescein (siehe Tabelle 3-20). Für die Lipidgebundenen Farbstoffe verschieben sich diese Werte jedoch. Ein Vergleich der pK<sub>s</sub>-Werte der DOPC gebundenen Fluorophore zeigt, dass OG488 den Einsatz unter physiologischen Bedingungen begünstigt.<sup>[135]</sup>



Tabelle 3-20: pK<sub>s</sub>-Werte des freien und lipidgebundenen Fluorophore FITC und OG488.<sup>[135]</sup>

Fluorophor	pK <sub>s</sub>
FITC	6.4
FITC-DOPG (0.15 mM NaCl)	8.2
OG488	4.7
OG488-DOPG(0.15 mM NaCl)	6.7

### Durchführung

Die Durchführung des Protoneneinstrom-Tests erfolgte analog zu dem, in Kapitel 3.4.1 beschriebenen, ACMA basierten Fluxtest. Die Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 508 nm und 3 nm Frequenzbandbreite. Die Emissionswellenlänge wurde bei 534 nm und 3 nm Bandbreite detektiert. Zunächst wurden 660 µL Fluxpuffer in der Quarzküvette vorgelegt und die gemessene Fluoreszenzintensität auf null gesetzt. Im Anschluss wurden 20 µL der Vesikellösung hinzupipettiert. Nachdem eine gleichbleibende Intensität beobachtet werden konnte, wurden 10 µL Valinomycin (12.9 nM) und nach dem Erreichen eines Minimums 2 µL CCCP hinzugegeben (5.8 nM). Es wurden ebenfalls Untersuchungen zur möglichen Inhibition bzw. Aktivierung des Kanals durch 2GBI und AEA durchgeführt. Hierbei erfolgte die Zugabe der entsprechenden Lösungen nach der Zugabe der Vesikel.

### 3.4.3 Bestimmung des pK<sub>s</sub> von OG488-DHPE

Die Bestimmung des pK<sub>s</sub>-Wertes von OG488-DHPE innerhalb POPC/POPG/Chol-Vesikelmembran ist Grundlage für die quantitative Analyse der H<sub>v</sub>1-Kanal induzierten Protonentranslokation. Die Kalibration des Systems erfolgt durch die Messung der Fluoreszenzintensitätsänderung des OG488 in Abhängigkeit des intra- und extravesikulären pH-Wertes.

### Durchführung

Einfache Liposomen mit einem nominalen Durchmesser von 100 nm wurden durch Extrusion in Vesikelpuffer mit einem pH-Wert von 4, 5, 6 und 7 präpariert. Anschließend wurden die maximalen Fluoreszenzintensitäten des OG488 bei den jeweiligen pH-Werten

## Materialien und Methoden

durch Aufnahme der Emissionsspektren ( $\lambda_{em} = 510\text{--}700\text{ nm}$ ) bei einer Anregungswellenlänge von 508 nm bestimmt. Der pH-Wert des Fluxpuffers war bei allen Messungen äquivalent zum intravesikulären pH-Wert. Die maximalen Intensitäten der Emissionsspektren wurden in Abhängigkeit des pH-Wertes aufgetragen. Eine Anpassung der Datenpunkte erfolgte an die Gleichung 3-10:

$$I = I_{\min} + \frac{I_{\max} - I_{\min}}{1 + 10^{pK_s - pH}} \quad 3-10$$

Hierbei ist  $I$  die normierte Intensität in Abhängigkeit des intravesikulären pH-Wertes. Der  $pK_s$ -Wert entspricht dabei dem Logarithmus der Säurekonstante der zu untersuchenden Verbindung hier OG488-DHPE.  $I_{\min}$  und  $I_{\max}$  stellen die Grenzen der Anpassung dar.

Die Kalibration des Systems erfolgte durch Messung der Intensitäten in Fluxpuffer bei pH 7.

### 3.5 Elektrophysiologische Charakterisierung des $H_V1$ -Kanals

Die große Bedeutung der Elektrophysiologie bei der Aufklärung physiologischer Vorgänge, spiegelt sich in den, in diesem Zusammenhang, verliehenen Nobelpreisen wieder. So erhielten 1963 Allan Loyd Hodgkin und Andrew Fielding Huxley zusammen mit Sir John Carew Eccles den Nobelpreis der Medizin „für Ihre Entdeckungen über den Ionen-Mechanismus, der sich bei der Erregung und Hemmung in den peripheren und zentralen Bereichen der Nervenzellenmembran abspielt“<sup>[136]</sup> Aus ihrer Forschung ging das Hodgkin-Huxley-Modell hervor, welches die Vorgänge der Signalübertragungen von Riesenaxonen des Tintenfisches beschreibt. Hierbei berücksichtigten Sie vor allem den Einfluss von Natrium- und Kaliumströmen auf das Membranpotential. Sie legten damit einen Grundstein für weitere Forschungsarbeiten. Bert Sakmann und Erwin Neher erhielten 1991 den Nobelpreis der Physiologie oder Medizin „für Ihre Entwicklung bezüglich der Funktion von einzelnen Ionenkanälen in Zellen“.<sup>[137]</sup> Sie entwickelten die Patch-Clamp-Technik, eine Methode die es erstmals zuließ Ströme im Bereich von  $10^{-12}\text{ A}$  entlang der Zellmembran zu vermessen. Somit konnten selbst Ströme einzelne Ionenkanäle detektiert werden. Bei der Methode wird eine komplette Zelle oder ein Teil der Zellmembran (engl. *patch*) durch Unterdruck von einer Mikro-Pipette angesogen.<sup>[6]</sup> Hierdurch wird die Pipette versiegelt, sodass ein Widerstand im Gigaohm Bereich vorliegt. Dieser erlaubt es den Stromfluss zwischen dem Pipetteninnenraum und dem äußeren Medium bzw. dem Zellinneren zu messen. Die Methode erlaubte es unter anderem die Ströme von Natrium- und Kaliumionen nachzuweisen und somit die Existenz der Kanäle zu bestätigen.<sup>[138]</sup> Eine Weiterentwicklung ist die planare Patch-Clamp Methode, wie der Port-a-Patch. Hierbei werden künstliche Membranen durch Unterdruck auf einen Borsilikatchip gespreitet, welcher eine Pore mit

einem Durchmesser von 1-5  $\mu\text{m}$ . Dies erlaubt es den, Protein vermittelten Stromfluss durch die Pore zu vermessen. Roderick MacKinnon erhielt 2003 den Nobelpreis der Chemie „ für Entdeckungen bezüglich der Kanäle in Zellmembranen“ im speziellen „für strukturelle und mechanistische Studien an Ionenkanälen“.<sup>[136,139]</sup> Durch gezielte Inhibition konnte er zunächst Struktur motive, welche für die Selektion verantwortlich sind identifizieren. Später gelang ihm die Strukturaufklärung des bakteriellen Kaliumkanal KcsA mittels Röntgen-Kristallographie. Dies ermöglichte die an dem  $\text{K}^+$ -Selektivitätsfilter beteiligten Aminosäuren aufzuklären. Es konnte zudem bestätigt werden, dass der Kanal ein Tetramer ist.<sup>[140]</sup> Im Gleichen Jahr veröffentlichte die MacKinnon Gruppe die Kristallstruktur des Spannungsgesteuerten Kaliumkanal KvAP aus *Aeropyrum pemix*.<sup>[23]</sup> Auf Grund der starken Homologie zwischen den verschiedenen Kaliumkanälen, war diese Entdeckung ein großer Fortschritt.

Während spannungsgesteuerte Natrium- und Kaliumkanäle intensiv durch Einzelkanalmessungen untersucht wurden, gestaltet sich diese elektrophysiologische Studie an Protonenkanälen schwierig. So besitzt der  $\text{H}_\text{v}1$ -Kanal zwar eine hohe Selektivität für Protonen, auf Grund der geringen Konzentration an Protonen in den Zellen, liegt die Protonenleitwert jedoch im Bereich von 10–140 fS.<sup>[34,45,46,141]</sup> Eine Anpassung an die physiologischen Konzentration von Natrium- und Kaliumionen ist jedoch in Experimenten ausgeschlossen, da diese einen pH-Wert kleiner eins zur Folge hätte. Eine Alternative bietet die Untersuchung, der Elektrophysiologie des  $\text{H}_\text{v}1$ -Kanals mittels, Impedanzspektroskopie, da hierbei die Summe der Signale, alle in der Membran vorliegenden Kanäle, erfasst wird.

### 3.5.1 Präparation einer trägerfixierten Lipiddoppelschicht

Die elektrophysiologische Charakterisierung des  $\text{H}_\text{v}1$ -Protonenkanals mittels Impedanzspektroskopie erfordert zunächst dessen Insertion in eine Lipiddoppelschicht. Die Verwendung künstlicher Membransysteme erlaubt es hierbei, die natürliche Umgebung des Proteins in einer definierten Zusammensetzung zu imitieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollen Abstandshalter (engl. *Spacer*) gestützte Lipiddoppelschichten, sogenannte trägerfixierte Lipiddoppelschichten (engl. *tethered bilayer lipid membranes*, tBLMs) eingesetzt werden. Sie besitzen gegenüber festkörperunterstützten (engl. *solid supported membrane*, SSM) Membranen den Vorteil, dass sich ein wässriges Kompartiment auf beiden Seiten der Membran befindet. Dies ermöglicht es den Kanal, welcher ausgeprägte extrazelluläre Bereiche besitzt, vollständig zu rekonstituieren und dessen Transportprozesse zu untersuchen. Die Präparation der protein-haltigen Lipiddoppelschicht vollzieht sich dabei in zwei Schritten. Zunächst soll eine sich selbstorganisierende Monoschicht (engl. *self assembled monolayer*, SAM) der Spacermoleküle gebildet werden. Dies wird durch Chemisorption der endständigen Thiolfunktion des Spacers an der goldbeschichteten Elektrode erreicht. Anschließend werden Proteoliposomen auf der Monoschicht gespreitet.

## Materialien und Methoden

### Durchführung

#### Herstellung von Goldelektroden

Zunächst wurden Goldelektroden durch die Hochvakuum-Bedampfung von Hämazytometerplättchen mit Chrom und Gold hergestellt. Durch die Verwendung einer Schablone konnten die 2x2 cm<sup>2</sup> großen Glassubstrate in zwei Bereiche unterteilt werden. Der obere, kreisrunde Bereich mit einer Fläche von 0.0452 cm<sup>2</sup> dient in den folgenden Experimenten als Arbeitselektrode. Er ist durch einen feinen Steg, mit dem rechteckigen Bereich, der Kontaktfläche verbunden. (siehe Abbildung 3-21).

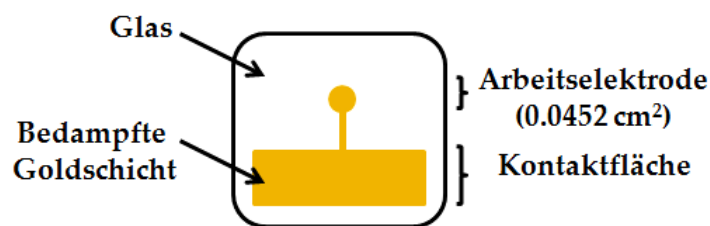


Abbildung 3-21: Schematische Darstellung der Goldelektrode der Impedanzspektroskopie. Die Goldschicht wurde auf ein Glassubstrat mit Hilfe einer Schablone aufgedampft und besteht aus drei Bereichen, der Kontaktfläche zu Aufnahme des Signals der Arbeitselektrode. Beide sind über einen kleinen Stegbereich verbunden.

#### Präparation der selbstorganisierenden Monoschicht

Verunreinigungen der Goldelektroden wurden vor der Präparation der Monoschicht unter Verwendung eines Plasmareinigers (Diener Electronics) entfernt. Zu diesem Zweck wurden die Glassubstrate für 30 s einem Argonplasma ausgesetzt. Anschließend wurden die Substrate in der Teflon-Messkammer fixiert (siehe Abbildung 3-22). Der Bereich zwischen Messkammer und Substrat wurde dabei durch einen O-Ring (DuPont) abgedichtet. Die Arbeitselektrode wurde anschließend mit 200 µL einer 1 mM Mischung aus Dihydrocholesteryl-2-(2-(2-ethoxy)ethoxy)ethanethiol (WK3SH, siehe Abbildung 3-29) und 6-Mercaptohexanol (6MH) benetzt. Je nach angestrebtem Verhältnis, wurde die 1 mM Lösung aus einer 10 mM WK3SH-Lösung und 10 mM 6MH in Isopropanol hergestellt. Die Inkubation der Goldelektrode erfolgte über Nacht bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Substrate jeweils fünfmal mit je 660 µL Isopropanol p.A., Ethanol p.A. und des verwendeten Messpuffer gespült. WK3SH wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Hildebrandt und Dr. Jacek Kozuch (Technische Universität Berlin) zur Verfügung gestellt.

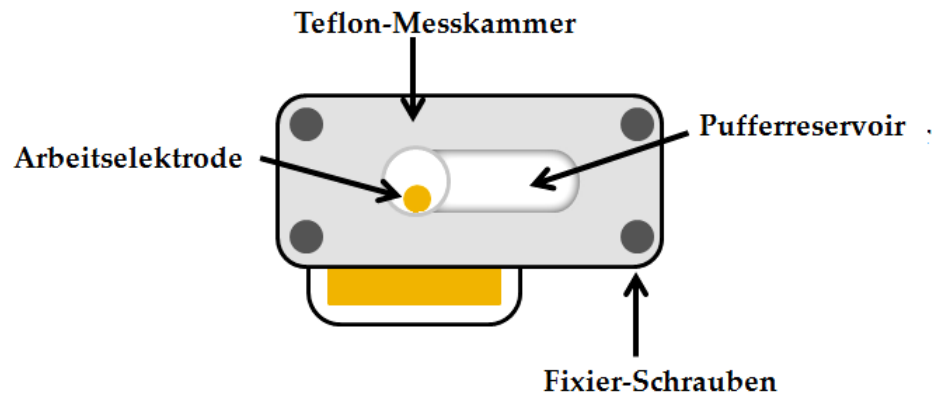


Abbildung 3-22: Schematische Darstellung der unter der Messkammer fixierten Goldelektrode. In das Pufferreservoir werden die Gegen- sowie die Referenzelektrode eingebracht. Durch das Reservoir wird ein Austrocknen der Probe verhindert.

Tabelle 3-21: Zusammensetzung des Messpuffer der impedanzspektroskopischen Untersuchungen des rekombinanten H<sub>v</sub>1-Kanals.

Puffer	Zusammensetzung
Messpuffer	10 mM HEPES
	5 mM KCl
	pH 4

#### Präparation der tethered Lipiddoppelschicht durch Vesikelspreiten

Proteinhaltige, tethered Lipiddoppelschichten wurden durch die Fusion kleiner unilamellarer Proteoliposomen auf den WK3SH/6MH-Monoschichten präpariert. Zu diesem Zweck wurden 100  $\mu$ L einer Vesikelsuspension, welche eine Konzentration von etwa 8 mg/mL besaßen, auf die impedanzspektroskopisch charakterisierten Monoschichten gegeben. Die überstehende Pufferlösung wurde zuvor abgezogen. Nach der 2 stündigen Inkubation bei Raumtemperatur, wurden die Substrate 10-mal mit 660  $\mu$ L des verwendeten Messpuffers gespült. Für die Herstellung einfacher Lipiddoppelschichten wurden Liposomen, welche ohne Protein präpariert wurden (siehe Kapitel 3.3.3), verwendet.

#### Reinigung der Goldelektroden

Die Goldelektroden wurden bis zu viermal verwendet, daher mussten sie intensiv gereinigt werden. Die Lipiddoppelschicht konnte durch das Spülen mit Ethanol oder einer Tensid-Lösung von den Elektroden entfernt werden. Die Entfernung der Spacer-Monoschicht erforderte jedoch harsche Bedingungen, wobei die Goldschicht nicht beschädigt werden

## Materialien und Methoden

sollte. Die Substrate wurden daher für 1 min in eine 2:1-Lösung aus Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid (*v/v*) getaucht, anschließend mit Reinstwasser gespült und unter dem Stickstoffstrom getrocknet.

### 3.5.2 Elektrochemische Impedanzspektroskopie

In den vergangenen Jahrzehnten hat sich die elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) zu einem vielseitigen Instrument zur Studie von elektrochemischen Vorgängen entwickelt. Mittels Impedanzspektroskopie können für die Materialwissenschaften relevante Korrosions- und Beschichtungsprozesse metallischer Oberflächen verfolgt werden. So konnten Højberg *et al.* die Überspannungen moderner Lithium-O<sub>2</sub>-Batterien auf gebildete Li<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Moleküle mittels IS zurückführen.<sup>[142]</sup> Auch bei der Erforschung medizinische Materialien, wie etwa SiO<sub>2</sub> beschichteter Titanimplantate, wird die IS eingesetzt.<sup>[143]</sup>

In der Biowissenschaft findet die nicht invasive Methode der IS unter anderem Anwendung bei morphologischen Studien ganzer Zellen.<sup>[144]</sup> Sie erlaubt aber ebenso die Untersuchung der DNA Hybridisierung. Vorteilhaft ist dabei, dass auf die Verwendung zusätzlicher Fluoreszenzmarker verzichtet werden kann.<sup>[145,146]</sup> Des Weiteren wird die Impedanzspektroskopie zur Untersuchung von Redoxreaktionen und Transportvorgängen einzelner Proteine herangezogen.<sup>[147, 148,149]</sup> Die Kombination aus EIS und der Präparation festkörperunterstützter Membranen auf Goldoberflächen ist, bei der Untersuchung biologischer Systeme, eine attraktive Methode. Messungen der Impedanz ermöglichen es hierbei sowohl den Aufbau der Membran als auch Änderung ihrer kapazitiven Eigenschaften auf Grund insertierter Kanäle oder Transporter zu analysieren. So konnte durch den Aufbau einer spacergestützten Phospholipiddoppelschicht die Insertion von Gramicidin D-Peptiden untersucht werden. Impedanzmessungen verifizierten hierbei die Formation einer intakten Lipiddoppelschicht als auch die Bildung eines Caesiumkationen leitenden Gramicidin Kanals.<sup>[150]</sup> Die selektive Transport von Kaliumionen gegenüber Natriumionen durch Valinomycin, konnte durch einen analogen Messaufbau mit Hilfe der IS beschrieben werden.<sup>[151]</sup> Eine Weiterentwicklung dieser Systeme sind porenüberspannende, spacergestützte Membranen. Sie bieten zum einen den Vorteil eines größeren wässrigen Kompartimentes unterhalb der Membran. Zum anderen ist auf Grund der abgrenzten Kavitäten die Detektion Einzelereignissen mittels weitere Methoden wie etwa Fluoreszenzmikroskopie möglich.<sup>[152,153]</sup> Ein anderer Ansatz zur Untersuchung von elektrochemischen Vorgängen mittels Impedanz, ist die Immobilisierung von intakten Proteoliposomen auf trägerfixierten Membranen, Hierüber konnten die lichtinduzierten Protonenströme von Bacteriorhodopsin studiert werden.<sup>[154]</sup>

### 3.5.2.1 Physikalische Grundlagen der Impedanzspektroskopie

Die Entwicklung moderner Potentiostaten und Frequenzganganalysatoren (engl. *frequency response analyzer*; FRA) in der Mitte des letzten Jahrhundert, ermöglichte es, die von Heaviside geschaffenen theoretischen Grundlagen der Impedanzspektroskopie, praktisch anzuwenden.<sup>[155]</sup> Die Probe wird hierbei durch eine sinusförmige Wechselspannung kleiner Amplitude angeregt. Über die Detektion des Stromantwortsignals, kann die frequenzabhängige Impedanz der Probe ermittelt werden. Das Antwortsignal kann entweder in der Zeit- oder der Frequenz-Domäne aufgezeichnet werden. Hieraus ergeben sich zwei verschiedene Messweisen. Im ersten Fall wird eine, aus bis zu 42 Frequenzen zusammengesetzten Wechselspannung an die Probe angelegt. Das in der Zeitdomäne detektierte Antwortsignal wird anschließend durch Fourier-Transformation (FT) in die Frequenzdomäne überführt, daher wird diese Methode auch als FT-Impedanzspektroskopie bezeichnet. Im zweiten Fall wird die Frequenz sukzessive im Bereich von Milli- bis Megahertz variiert und die Stromantwort in direkter Abhängigkeit dieser Frequenz aufgezeichnet. Die Methode wird daher auch *frequency-domain* Impedanzspektroskopie (FD-IS) genannt. Diese im Rahmen dieser Arbeit angewandte Technik besticht durch ein geringeres Signal-zu-Rauschverhältnis als die FT-IS, benötigt jedoch längere Messzeiten. Daher ist sie für die Analyse von schnellen Oberflächenprozessen weniger geeignet. Die Auswertung der Impedanzspektren der FD-IS ermöglicht es Aussagen über kapazitive und resistive Eigenschaften der Proben zu treffen.

Als Impedanz wird der frequenzabhängige Wechselstromwiderstand bezeichnet. Dieser kann, analog zu dem Gleichstromwiderstand, nach dem Ohm'schen Gesetz als Quotient des Verhältnis von Wechselspannung ( $U$ ) zu Wechselstrom ( $I$ ) definiert werden (siehe Formel 3-11).

$$Z(\omega) = \frac{U(\omega, t)}{I(\omega, t)} \quad 3-11$$

Die Spannung kann hierbei als zeitabhängige ( $t$ ) Größe betrachtet werden, deren Schwingung von der Kreisfrequenz ( $\omega$ ) abhängt. Diese ist über die Frequenz ( $\nu$ ) definiert als  $\omega = 2\pi\nu$  (siehe Gleichung 3-12). Das Antwortsignal des Wechselstroms folgt der Wechselspannung verschoben um den Phasenwinkel  $\varphi$  (siehe Formel 3-13).

$$U(\omega, t) = U_0 \cdot \sin(\omega t) \quad 3-12$$

$$I(\omega, t) = I_0 \cdot \sin(\omega t + \varphi) \quad 3-13$$

## Materialien und Methoden

Aus der Definition der Impedanz (siehe Gl. 3-11) ergibt sich somit:

$$Z(\omega) = \frac{U_0 \cdot \sin(\omega t)}{I_0 \cdot \sin(\omega t + \varphi\omega)} \quad 3-14$$

Die Lösung der trigonometrischen Funktionen aus Gleichung 3-14 lässt sich durch die Einführung einer komplexen Ebene nach der Eulerschen Formel vereinfachen. Aus der Umschreibung der Gleichung folgt:

$$Z(\omega) = \frac{U_0 \cdot e^{i\omega t}}{I_0 \cdot e^{i(\omega t - \varphi(\omega))}} = |Z|e^{i\varphi(\omega)} \quad 3-15$$

Die Impedanz als komplexe Größe und kann somit auch als Summe eines Real- (Re) und Imaginärteils (Im) beschrieben werden.

$$Z(\omega) = Z^{Re}(\omega) + i \cdot Z^{Im}(\omega) \quad 3-16$$

Unter Einführung eines kartesischen Koordinatensystems lässt sich die Impedanz in der Gaußschen Zahlenebene durch ein Zeigerdiagramm darstellen (siehe Abbildung 3-23).

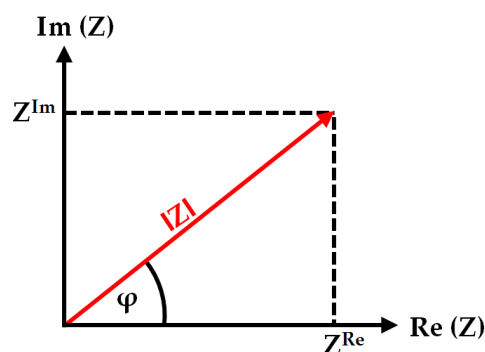


Abbildung 3-23: Auftragung der Impedanz in Form eines Zeigerdiagramms. Der Vektor (rot), welcher den Betrag der Impedanz  $|Z|$  dargestellt, wird durch die Beiträge der realen ( $Z^{Re}$ ) und des imaginären ( $Z^{Im}$ ) Impedanzanteile, sowie den Phasenwinkel ( $\varphi$ ) definiert.

Das Zeigerdiagramm veranschaulicht wie sich der Betrag der Impedanz  $|Z|$  aus der Vektorsumme des realen und imaginären Anteils zusammensetzt. Diese werden in der Elektrotechnik aus als Wirk- und Blindwiderstand bezeichnet. Zudem wird auch die Abhängigkeit des Betrages vom Phasenwinkel  $\varphi$  veranschaulicht.

Mathematische lässt sich der Betrag der Impedanz nach dem Satz der Phytagoras wie folgt definieren:

$$|Z| = \sqrt{(Z^{Re})^2 + (Z^{Im})^2} \quad 3-17$$



Für den Phasenwinkel gilt nach dem Zeigerdiagramm die trigonometrische Beziehung:

$$\varphi = \arctan\left(\frac{Z^{\text{Im}}}{Z^{\text{Re}}}\right) \quad 3-18$$

Neben der Impedanz wird in der Literatur bei der Beschreibung von komplexen Wechselspannungssystemen auch die Admittanz ( $Y$ ) angegeben. Sie ist analog dem Leitwert als Kehrwert des Widerstandes, d.h. der Impedanz definiert.

$$Y = \frac{1}{Z} = Y^{\text{Re}} + i \cdot Y^{\text{Im}} \quad 3-19$$

Die Admittanz setzt sich ebenfalls aus einem Real- und Imaginärteil zusammen. Diese werden auch als Wirkleitwert ( $Y^{\text{Re}}$ ) und Scheinleitwert ( $Y^{\text{Im}}$ ) bezeichnet.

### 3.5.2.2 Elektrische Beschreibung von trägerfixierten Lipiddoppelschichten

Die Analyse von Impedanzspektren erfolgt unter anderem durch Anpassung der Daten über die Beschreibung des untersuchten Systems mittels eines elektrischen Ersatzschaltbildes (engl. *electric equivalent circuit*, EEC). Resistive, kapazitive und nicht ideal kapazitive Eigenschaften des Systems werden im Ersatzschaltbild durch Widerstände, Kondensatoren und dem *Constant Phase Element (CPE)* repräsentiert. Die Impedanzen der einzelnen elektrischen Bauelemente, welche zur Beschreibung der ankergestützten Membran im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sollen im Folgenden dargestellt werden.

Bei einfachen ohmschen Widerständen entspricht die Impedanz eben diesem:

$$Z_R = R \quad 3-20$$

Die Impedanz eines Kondensators mit der Kapazität  $C$  kann über die Definition der Spannung  $U_C$  des Kondensators (siehe Formel 3-21) ermittelt werden.

$$U_C = \frac{\int I dt}{C} \quad 3-21$$

Unter zu Hilfenahme der Definition von Spannung und Strom aus Formel 3-15 folgt für die Impedanz des Kondensator ( $Z_C$ ):

$$Z_C = \frac{1}{i \cdot \omega \cdot C} \quad 3-22$$

## Materialien und Methoden

Für die Berechnung der Impedanz eines nicht idealen Kondensators, dem sogenannten dem *Constant Phase Element (CPE)* gilt:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Q \cdot (i \cdot \omega)^\alpha} \quad 3-23$$

Wobei  $Q$  eine konstante Größe der Einheit  $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$  ist. Für  $\alpha=1$  verhält sich das CP-Element wie ein idealer Kondensator. Einen möglichen Ansatz zur Berechnung der Kapazität eines Systems aus dem CP-Element lieferten Hsu und Mansfeld.<sup>[156]</sup>

$$C = Q \cdot (\omega''_{\max})^{\alpha-1} \quad 3-24$$

Wobei  $\omega''_{\max}$  die Frequenz bei maximalem Betrag des Imaginärteils von  $Z$ , der Auftragung  $Z^{\text{Im}}$  gegen  $\omega$  darstellt. CPE-Elemente werden unter Anderem zur Beschreibung von rauen oder inhomogenen Oberflächen, oder porösen Elektroden eingesetzt.<sup>[157]</sup> Sie eignen sich daher um tethered Lipiddoppelschichten und deren nicht idealen Verhalten im Bereich kleiner Frequenzen zu repräsentieren.<sup>[158,159]</sup>

Bei der Addition von Impedanzen einer Reihen- bzw. Parallelschaltung wird analog zu der Regeln für Ohm'sche Widerstände verfahren. Daraus ergibt sich für die Gesamtimpedanz ( $Z_{\text{ges}}$ ) einer RC-Parallelschaltung:

$$Z_{\text{ges}} = Z_R + Z_C \quad 3-25$$

Biologische Membranen dienen als Barrieren zwischen wässrigen Kompartimenten. Sie bilden die Grundlage für einen gezielten Stoffaustausch und den Aufbau von elektrischen Potentialen. Die hydrophoben Schwänze der Lipide wirken dabei auf geladene Teilchen wie ein Widerstand. Daneben besitzt die Membran Eigenschaften analog denen eines Plattenkondensators, so dass sich ihre Kapazität wie folgt beschreiben lässt.<sup>[160]</sup>

$$C = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 A}{d} \quad 3-26$$

Hierbei beschreibt  $A$  die Elektrodenfläche und  $d$  deren Abstand. Dies entspricht der Fläche und Dicke der betrachteten Membran. Je nach Lipidzusammensetzung besitzt die Membran eine Dicke von 4–6 nm. Die Parameter  $\epsilon_0$  und  $\epsilon_r$  geben die elektrische Feldkonstante des Vakuums und relative Permittivität des Dielektrikums an. Dabei besitzen die Säurereste ( $\epsilon_r = 2.1\text{--}2.8$ ) eine deutlich geringere Dielektrizitätskonstante, als die Lipidkopfgruppen ( $\epsilon_r = 20\text{--}60$ ). Dabei hängt die eigentliche Höhe der Dielektrizitätskonstante von der Stärke

ihrer Hydratation ab, sodass diese einen Wert nahe den von Wasser ( $\epsilon_r = 80$ ) erreicht. Unter Berücksichtigung einer Reihenschaltung und einer Schichtdicke der Kopfgruppen von 0.6–1 nm, lässt sich die Gesamtkapazität aus den einzelnen inversen Beiträgen berechnen. Diese wird durch den Beitrag des hydrophoben Bereichs bestimmt. In einem elektrischen Schaltkreis können Membranen daher in einfacher Näherung durch eine Parallelschaltung eines Widerstandes und eines Kondensators beschrieben werden (siehe Abbildung 3-24). Hierbei gibt  $R_{el}$  den Widerstand der elektrolytischen Lösung wieder.  $R_m$  und  $C_m$  bezeichnen den Membranwiderstand und deren Kapazität.

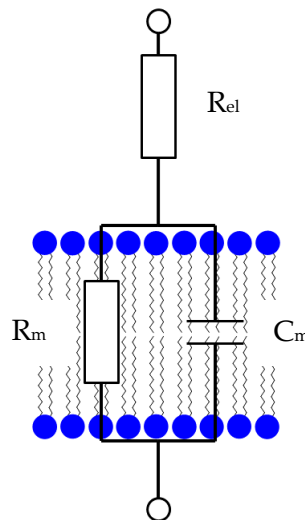


Abbildung 3-24: Ersatzschaltbild einer einfachen Lipiddoppelschicht im wässrigen Medium. Der Widerstand der Elektrolytlösung ( $R_{el}$ ) ist in Serie zu dem Widerstand der Membran ( $R_m$ ) und dessen Kapazität ( $C_m$ ) geschaltet.

### 3.5.2.3 Darstellung der Spektren

Die Darstellung von Impedanzspektren erfolgt häufig in einfachen 2-dimensionalen Auftragungen, statt in komplizierten dreidimensionalen Darstellungen. Der Nyquist-Graph folgt, einer dem Zeigerdiagramm (siehe Abbildung 3-23) analogen Darstellung der Daten. Hierbei wird der Imaginärteil der Impedanz gegen den Realteil aufgetragen. Aus der Simulation des oben gezeigten Ersatzschaltbild ergibt sich für  $R_{el} = 1 \text{ k}\Omega$ ,  $R_m = 1 \text{ M}\Omega$  und  $C_m = 0.1 \text{ }\mu\text{F}$ , die in Abbildung 3-25 gezeigte charakteristische Halbkreisform des Nyquist-Diagramms. Da sowohl der Real-, als auch der Imaginärteil der Impedanz von der Kreisfrequenz abhängen, können die zwei Schnittpunkte mit der x-Achse den Grenzfällen einer  $\omega \rightarrow \infty$  und  $\omega \rightarrow 0$  zugeordnet werden. Hierbei nimmt der Wert der Kreisfrequenz mit abnehmendem  $Z^{Re}$  zu. Für den Fall hoher Frequenzen, d.h.  $\omega \rightarrow \infty$ , wird die x-Achse bei dem Wert von  $R_{el}$  geschnitten. Bei niedrigen Frequenzen ( $\omega \rightarrow 0$ ) liegt der Schnittpunkt bei der Summe der Widerstände, d.h.  $R_{el} + R_m$ . Analog zum Zeigerdiagramm, kann jeder Punkt auf

## Materialien und Methoden

dem Halbkreis durch einen Vektor durch den Ursprung beschrieben werden, dessen Länge dem Betrag der Impedanz ( $|Z|$ ) entspricht. Diese ist um den Phasenwinkel ( $\varphi$ ) von der x-Achse verschoben.

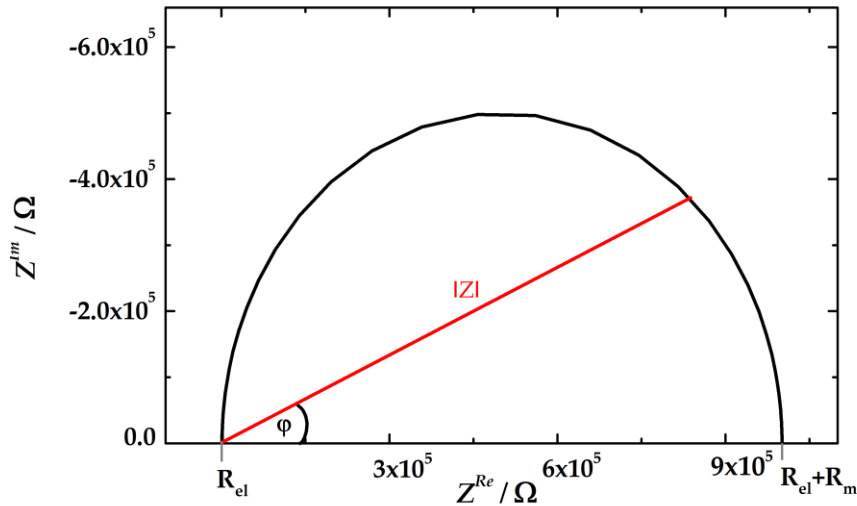


Abbildung 3-25: Nyquist-Diagramm der Simulation des Ersatzschaltbildes aus Abbildung 3-24. Es wurden hierbei die Parameter  $R_{el} = 1 \text{ k}\Omega$ ,  $R_m = 1 \text{ M}\Omega$  und  $C_m = 0.1 \text{ }\mu\text{F}$  zu Grunde gelegt. Der halbkreisförmige Graph schneidet die reelle-Achse für große Kreisfrequenzen bei  $R_{el}$  und für kleine Frequenzen bei  $R_{el} + R_m$ . Jeder Datenpunkt des Graphen lässt sich durch den Vektor der Länge  $|Z|$  und den Phasenwinkel  $\varphi$  beschreiben.

Der Bode-Plot stellt die Daten des Betrages der Impedanz  $|Z|$  und des Phasenwinkels  $\varphi$ , getrennt voneinander aber in einem Diagramm dar (siehe Abbildung 3-26). Hierbei werden diese jeweils gegen die Frequenz  $f$  aufgetragen, wobei  $|Z|$  und  $f$  logarithmisch dargestellt werden. Bei idealen Verhalten kann das Bode-Diagramm in drei Bereiche eingeteilt werden. Die Bereiche I und III sind durch ein rein resistives Verhalten der Impedanz geprägt. Diese ist hierbei rein durch den ohmschen Widerstand  $R_{el}$  bei hohen Frequenzen (Bereich III) bzw. durch die Summe der Widerstände  $R_{el} + R_m$  bei niedrigen Frequenzen (Bereich I) definiert. Der Phasenwinkel nähert sich in beiden Fällen einem Wert von Null an. Frequenzabhängiges Verhalten der Impedanz, auf Grund der kapazitiven Eigenschaften der Membran, kann hingegen innerhalb des Bereiches II beobachtet werden. Für ideale Kondensatoren erreicht der Phasenwinkel hierbei einen maximalen Wert von  $90^\circ$ .

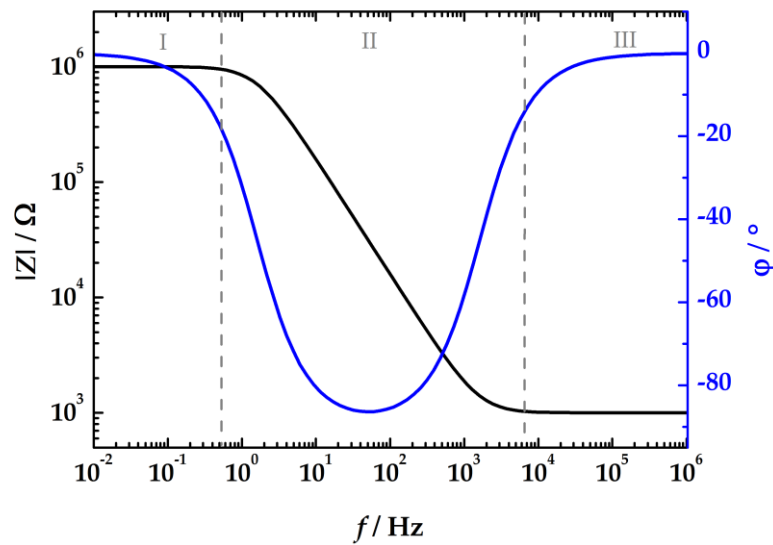


Abbildung 3-26: Bode-Diagramm des Ersatzschaltbildes aus Abbildung 3-24 mit  $R_{el} = 1 \text{ k}\Omega$ ,  $R_m = 1 \text{ M}\Omega$  und  $C_m = 0.1 \text{ }\mu\text{F}$ . Phasenwinkel  $\varphi$  und Betrag der Impedanz  $|Z|$  werden als Funktion der Frequenz  $f$  dargestellt. Bei idealen Verhalten kann zwischen Bereichen resistiven (I und III) und kapazitiven, frequenzabhängigen (II) Impedanzverhaltens differenziert werden. Bei hohen Frequenzen dominiert der Beitrag des Widerstandes  $R_{el}$ , während bei kleinen Frequenzen die Summe der Widerstände  $R_{el} + R_m$  die Impedanz bestimmt. In den Bereichen I und II nimmt der Phasenwinkel einen Wert nahe Null an, während er sein Maximum von  $90^\circ$  in Bereich II erreicht.

Die dritte 2D-Darstellungsform von Impedanzspektren, der Cole-Cole-Plot, ähnelt dem Nyquist-Plot (siehe Abbildung 3-27). Allerdings werden hierbei nicht der reale und imaginäre Beitrag der Impedanz, sondern der Admittanz ( $Y$ ), dem Kehrwert der Impedanz, dargestellt. Der Realteil ( $Y^{Re}$ ) der Admittanz wird in Abhängigkeit des negativen Imaginärteils ( $Y^{Im}$ ) aufgetragen. Beide Teile werden dabei durch die Kreisfrequenz dividiert, sodass eine Frequenzgewichtung der Daten vorliegt. Wie auch im Nyquist-Diagramm nimmt die Kreisfrequenz für kleinere Werte von  $-Y^{Im}$  zu. Der Cole-Cole-Plot eignet sich sehr gut für die Betrachtung von sich ändernden Kapazitäten. Da aus dem Cole-Cole-Diagramm die halbe Kapazität  $C_m$  einfach ablesen werden kann. Der Wert entspricht dem Schnittpunkt  $Y^{Im}$  einer gedachten, vertikalen Linie durch das Maximum des Halbkreises (siehe Abbildung 3-27, graue Linie).

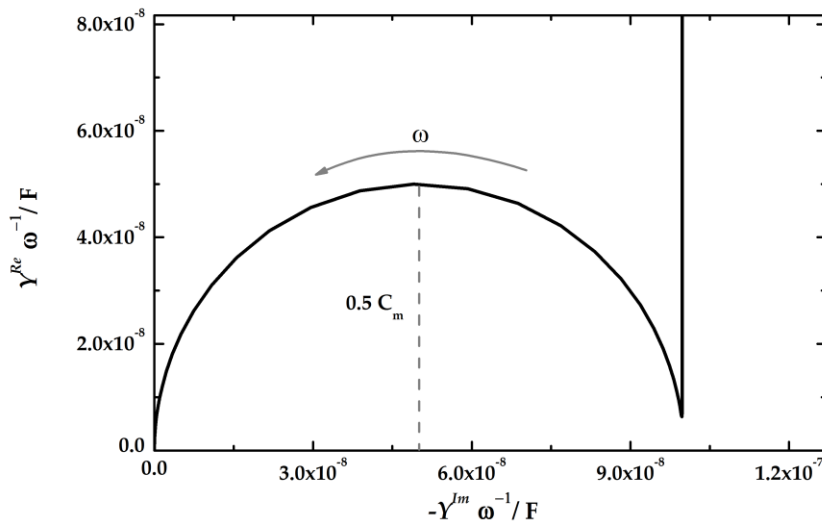


Abbildung 3-27: Cole-Cole-Plot der Simulation des dazugehörigen Ersatzschaltbildes (siehe Abbildung 3-24). Der reale Anteil der Admittanz ( $Y^{\text{Re}}$ ) ist frequenzgewichtet gegen den negativen Imaginärteil ( $Y^{\text{Im}}$ ) aufgetragen. Aus dem Diagramm kann die der halbe Wert der Kapazität  $C_m$  abgelesen werden. Der Wert entspricht dem gedachten Radius des Halbkreises (graue Linie).

### Durchführung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Impedanzspektroskopie genutzt werden, um die  $H_V1$ -Kanal vermittelte Protonentranslokation zu untersuchen. Im Vorfeld der Messungen wurde zunächst die erfolgreiche Präparation einer selbstorganisierten Monoschicht bzw. einer lipidgestützten Lipiddoppelschicht mittels Impedanzspektren (siehe Kapitel 3.5.1) kontrolliert. Die Impedanzmessungen erfolgten in analoger Weise, wobei ein Frequenzganganalysator (Solartron) und ein Potentiostat (Solartron) kombiniert wurden. Hierdurch konnten neben einer konstanten Wechselspannung, verschiedene Membranpotentiale (DC-Potentiale) appliziert werden. Für diesen Zweck wurde eine Dreielektrodenanordnung gewählt (siehe Abbildung 3-28).

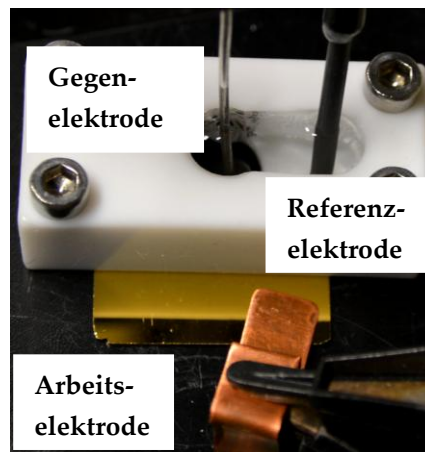


Abbildung 3-28: Fotografie der Dreielektrodenanordnung während der impedanzspektroskopischen Messungen. Die über einen Kupferdraht kontaktierte Goldelektrode dient als Arbeitselektrode. Ein Platindraht und eine Silber-Silberchlorid-Elektrode (3 M KCl) wurden im Pufferreservoir platziert und fungierten als Gegen- bzw.- Referenzelektrode.

Die Goldelektrode stellte wie bereits erwähnt die Arbeitselektrode dar. In der Lösung über ihr wurde die Gegenelektrode, ein platinierter Platindraht platziert. Als Referenz- zur Platinelektrode, wurde eine Silber-Silberchlorid-Elektrode in den Aufbau integriert. Sie sollte das Anlegen eines konstanten Membranpotentials gewährleisten. Die Steuerung der Messungen erfolgte durch die Software Zplot und Spektren wurden durch das Programm ZView aufgezeichnet. Die verwendeten Zplot- Parameter sind in Tabelle 3-22 aufgeführt.

Tabelle 3-22: Parameter der Impedanzspektroskopie.

Parameter	Einstellungen
DC-Potential	-0 bis -150 mV
Messmodus	vs. Referenz
AC-Potential	30 mV
Frequenzbereich	$10^{-1}$ – $10^6$ Hz
Datenpunkte pro Dekade	10

### 3.5.2.4 Auswertung der Daten der Impedanz-Spektroskopie

Die Auswertung der Impedanzspektren erfolgte mit Hilfe der Software ZView. Diese ermöglicht die Extraktion der für das elektrochemische System charakteristischen Parameter auf Basis einer nicht-linearen Kurvenanpassung (engl. *non-linear-least-square-fit*) nach dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus. Dieser berücksichtigt, dass die Messung über mehrere

## Materialien und Methoden

Größenordnungen erfolgt und gewichtet daher die Fehler.<sup>[161]</sup> Grundlage der Anwendung der nicht-linearen-Anpassung, ist die Beschreibung des elektrochemischen Systems durch ein geeignetes Ersatzschaltbild. Dieses wird basierend auf der Kenntnis bereits charakterisierter Systeme erstellt und weiter entwickelt.

Ein weiterer Ansatz zur Analyse der Impedanz Daten beruht auf der Adaption einer Darstellungsstrategie der *Electric Cell-Substrat Impedance Sensing* (ECIS) Methode.<sup>[162]</sup> Sie wird zur Darstellung von Impedanzspektren, welche die Änderungen vor und nach der Kultivierung von Zellen auf einer Goldelektrode verdeutlichen, angewendet. Hierbei wird eine Annahme genutzt, wodurch die Gleichungen 3-16 und 3-25 quasi gleichgesetzt werden. Alle imaginären Anteile  $Z^{Im}$ , die also einen Phasenwinkel von  $0^\circ < \varphi \leq 90^\circ$  besitzen, werden kapazitiven Verhalten zu geordnet (vgl. Gleichung 3-28). Hingegen werden alle Impedanzanteile welche sich in Phase zu der angelegten Wechselspannung befinden und somit den realem Anteilen  $Z^{Re}$  entsprechen dem resistiven Verhalten zugeordnet (vgl. Formel 3-27).<sup>[163]</sup>

Aus der Annahme folgt für die Gleichungen 3-20 und 3-22 somit:

$$R = Z^{Re} \quad 3-27$$

$$C = \frac{1}{i\omega Z^{Im}} \quad 3-28$$

Die Daten des Widerstandes und der Kapazität, welche in Abhängigkeit der Frequenz detektiert wurden, werden zur Vereinfachung der Darstellung normiert. Analog den Auftragungen der ECIS Spektren, werden die entsprechenden Werte der Impedanzanteile für eine Lipiddoppelschicht  $Z_{tBLM}$ , durch die Werte vor der reinen selbstorganisierten Monoschicht  $Z_{SAM}$  dividiert. Es gilt somit:

$$C_{norm} = \frac{1}{\frac{Z_{tBLM}^{Im}}{Z_{SAM}^{Im}}} \quad 3-29$$

$$R_{norm} = \frac{Z_{tBLM}^{Re}}{Z_{SAM}^{Re}} \quad 3-30$$



### 3.6 Oberflächenverstärkte Infrarotabsorptions-Spektroskopie

Aufbauend auf der Untersuchung des spannungsabhängigen Verhaltens des H<sub>v</sub>1-Protonenkanals innerhalb einer *tethered bilayer lipid membrane* (tBLM) mittels Impedanzspektroskopie wurden potentialabhängige Strukturänderungen studiert. Die Infrarot (IR)-Spektroskopie gehört zu den aussagekräftigsten Methoden bei der Strukturaufklärung. Moderne Geräte basieren auf der Fourier-Transform-IR-Spektroskopie (FTIR-Spektroskopie). Diese bietet, im Kontrast zur dispersen IR-Spektroskopie, ein verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis sowie geringere Messzeiten. Das wesentliche Bauteil eines solchen Spektrometers ist ein Michelson-Interferometer. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Messaufbau basiert auf dem Prinzip der abgeschwächten Totalreflexion (engl. *attenuated total reflection*, ATR). Hierbei wird der IR-Strahl, bei der Überschreitung eines kritischen Winkels, an der Grenzfläche des optisch dichten Siliziumkristalls zur optisch dünneren Probe totalreflektiert. Die so erzeugte evaneszente Welle dringt dabei tief (im µm-Bereich) ins Probenmaterial ein.<sup>[164]</sup> Absorbiert dieses im eingestrahlten IR-Bereich kommt es zu einer Abschwächung der Strahlung. Auf Grund der wiederkehrenden Totalreflexion entlang der Grenzfläche wird diese Schwächung verstärkt. Die ATR-FTIR-Spektroskopie erlaubt es daher Proben, welche an der Kristallgrenzfläche immobilisiert sind zu untersuchen und ist gleichzeitig die Grundlage für eine weitere Variante der IR-Spektroskopie. Die oberflächenverstärkte Infrarotabsorptions-Spektroskopie (engl. *surface-enhanced infrared absorption spectroscopy*, SEIRA-Spektroskopie) basiert auf dem ATR-Aufbau und erlaubt die Kombination von FTIR- und elektrochemischer Impedanz-Spektroskopie. Durch diese spektroelektrochemische Methode können u. a. spannungsabhängige Strukturänderungen untersucht werden. Die Abscheidung von Metallen, wie Silber oder Gold, auf der Kristalloberfläche ist ursächlich für die Verstärkung des IR-Signals.<sup>[165]</sup> Hartstein *et al.* beschrieben dabei eine Abhängigkeit der Verstärkung des Signal von der Schichtdicke der Metallschicht und gaben einen maximalen Verstärkungsfaktor von 1000 an.<sup>[165]</sup> Der Effekt Verstärkung beruht dabei auf elektromagnetischen Effekten wie der Plasmonenresonanz, als auch auf der Chemisorption.<sup>[166]</sup> Gleichzeitig fungiert die Metalloberfläche als leitende Schicht und erlaubt ein Dreielektrodenaufbau zur Potentialapplikation. Wird eine nanostrukturierte Goldoberfläche auf dem ATR-Kristall ausgebildet, ermöglicht diese zudem den Aufbau einer SAM mittels Chemisorption Thiol-funktionalisierter Spacermoleküle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das speziell für SEIRA-Anwendungen designte Dihydrocholesteryl-2-(2-(2-ethoxy)ethoxy)-ethanethiol (WK3SH) als Spacer eingesetzt. WK3SH (siehe Abbildung 3-29) hat gegenüber dem kommerziellen (Cholesterylpolyethylenoxy)thiol (CPEO3) den Vorteil, dass es keine Carbamatfunktion besitzt, dessen Absorption im Bereich der Amid-I Bande von Proteinen stattfindet. Zudem wurde die Doppelbindung des Steroidgerüsts, welche Angriffspunkt für Oxidationsreaktionen ist, entfernt.

## Materialien und Methoden

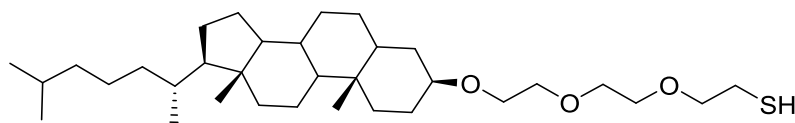


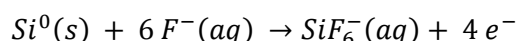
Abbildung 3-29: Strukturformel des Dihydrocholesteryl-2-(2-(2-ethoxy)ethoxy)ethanethiol (WK3SH),  $C_{33}H_{60}O_3S$ ,  $M = 536.9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Die Präparation der SEIRA-Substrate und die Ausführung der Messungen der SEIRA-Spektroskopie erfolgten, im Rahmen einer Kooperation, durch Dr. Jacek Kozuch und Enrico Forbrig im Arbeitskreis Prof. Dr. Peter Hildebrandt an der Technischen Universität Berlin.

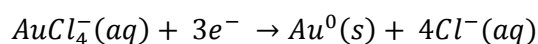
### Durchführung

#### Präparation des ATR-Kristalls

Auf dem ATR-Kristall (25x20x10 mm) wurde zunächst nach einem Protokoll von Miyake *et al.* eine dünne nanostrukturiert Goldschicht abgeschieden.<sup>[167]</sup> Hierzu wurde der Kristall zunächst 1 min mit Aluminiumoxid ( $Al_2O_3$ ) poliert, wodurch die Oberfläche oxidiert wurde (Siehe Abbildung 3-30 a). Anschließend wurde die Oxidschicht durch 2 min Inkubation mit einer Ammoniumfluorid-Lösung ( $NH_4F$ , 40 % (*w/w*)) entfernt. Anschließend wurde das Substrat mit Reinstwasser gespült (b). Die Metallisierung-Lösung zur Abscheidung des Goldes, einer 1:1:1 (*v/v/v*) Mischung der Reduktionslösung (0.3 M  $NaSO_3$ , 0.1 M  $NH_4Cl$ , 0.1 M  $Na_2S_2O_3$ ) und  $NaAuCl_4$  (15 mM) sowie HF (2 %), wurde frisch angesetzt (c). Die Mischung wurde bei einer Temperatur von 65 °C über einen Zeitraum von 1 min auf den Kristall gegeben. Die Abscheidung des Goldes basiert auf der Reduktion des Goldes bei gleichzeitiger Oxidation des Siliziums (siehe Redoxgleichung 3-31)



3-31



Im Anschluss an die Goldfunktionalisierung wurde erneut mit Reinstwasser gespült, die Oberfläche dreimal mit  $HClO_3$  (0.1 M) angeraut und mittels Cyclovoltammetrie (6 Zyklen, 0.1 bis 1.4 V in 0.1 M  $H_2SO_4$ ) gereinigt (d). Hierbei wurde die Lösung konstant mit Argon gespült um die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu unterbinden.

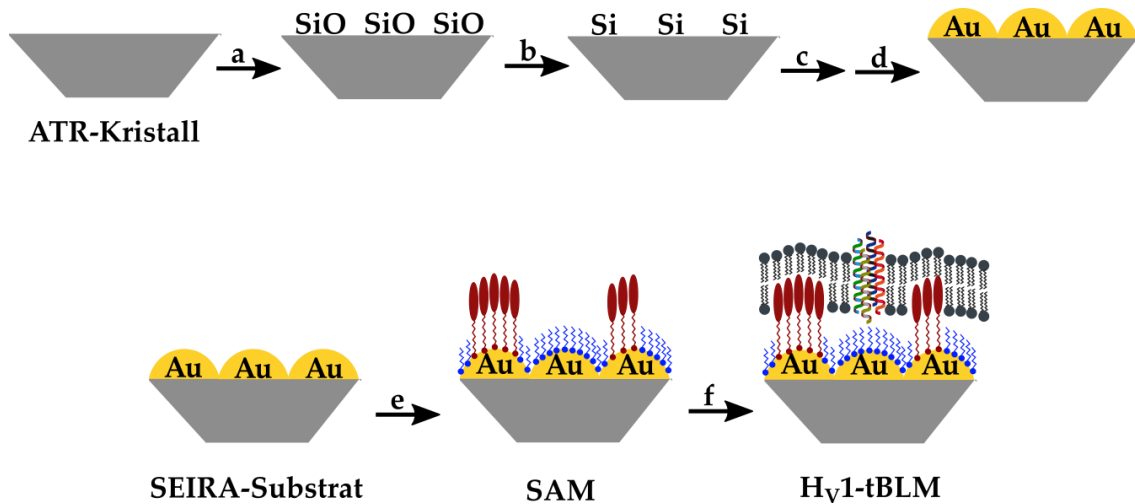


Abbildung 3-30: Schematische Darstellung des Prozesses der SEIRA-Elektroden Präparation. (a) Zunächst wurde der ATR-Kristall mit Aluminiumoxid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) 1 min poliert, wobei wurde die Oberfläche des Siliziumkristalls oxidiert wurde. (b) Die Oxidschicht wurde direkt im Anschluss durch 2 minütige Benetzung mit einer Ammoniumfluorid-Lösung ( $\text{NH}_4\text{F}$ , 40 % ( $w/w$ )) entfernt. (c) Die stromlose Goldabscheidung nach Miyake *et al.* erfolgte durch Inkubation mit einer Metallierungslösung für 1 min bei 65 °C. Diese wurde frisch aus einer 1:1:1 ( $v/v/v$ ) Mischung der Reduktions- (0.3 M  $\text{NaSO}_3$ , 0.1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ),  $\text{NaAuCl}_4$ - (15 mM) und HF-Lösung (2 %) angesetzt. (d) Im Anschluss wurde mit Reinstwasser und  $\text{HClO}_3$  (0.1 M) gespült sowie eine Reinigung per Cyclovoltammetrie (6 Zyklen 0.10 bis 1.40 V in 0.1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) durchgeführt. (e) Die selbstorganisierende Monoschicht (SAM) wurde durch die Inkubation, der nanostrukturierten Goldschicht, mit einer WK3SH/6MH-Lösung (13:7, 1 mM) in Isopropanol (über Nacht bei Raumtemperatur) gebildet. (f) Die Ausbildung einer proteinhaltigen, trägerfixierten Lipiddoppelschicht (tBLM) erfolgte durch das Spreiten von Proteoliposomen auf der SAM.

Die Präparation der selbstorganisierenden Monoschicht aus WK3SH/6MH erfolgte analog der der in Kapitel 3.5.1 beschriebenen Prozedur. Hierbei wurde jedoch eine 70:30-Mischung ( $n/n$ ) von WK3SH/6MH in Isopropanol eingesetzt. Diese wurde nach der Inkubation, über Nacht bei Raumtemperatur, mit Messpuffer (20 mM HEPES; 100 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 4) gespült. Die tBLM wurde durch Spreiten von Liposomen bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 2–3 h gebildet. Im Anschluss wurde die Messzelle nochmals mit Messpuffer gespült. Die Ausbildung der Monoschicht, wie auch der Aufbau der tBLM, wurden mittels Impedanzspektroskopie analysiert.

### SEIRA-Spektroskopie

Die Messungen der SEIRA-Spektroskopie wurden an einem der beiden FT-IR-Spektrometer der Firma Bruker, dem Tensor 27 oder dem IFS66v/s, durchgeführt. Die Spektren wurden in einem Wellenzahlbereich von 4000 bis 1000  $\text{cm}^{-1}$ , mit einer Auflösung von 4  $\text{cm}^{-1}$ , aufgenommen. Je Spektrum wurden dabei 400 Scans akkumuliert. Die Potentialapplikation wurde, wie bei den Impedanzmessungen, durch einen Dreielektrodenaufbau ermöglicht. Die SEIRA-Spektren wurden mit der herstellereigenen Software *OPUS* aufgezeichnet und ausgewertet. Die Impedanzspektren wurden hierbei mit dem  $\mu\text{AutolabIII}/\text{FRA2}$  (Metrohm Autolab) in einem Bereich von 0.1 bis 100 kHz aufgenommen. Die Steuerung erfolgte dabei über die FRA-Software. Während der Messungen wurde die Pufferlösung in der Messzelle

## **Materialien und Methoden**

mit Argon gespült um die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale und Oxidationsreaktionen zu vermeiden.

## 4 Ergebnisse

Die Expression des humanen spannungsgesteuerten Protonenkanals in *E. coli* sowie dessen funktionelle Rekonstitution in unilamellare Vesikel bilden die Grundlage für eine Studie der spannungsabhängigen Konformationsänderung des Proteins, auf Basis einer Kombination von Impedanz- und SEIRA-Spektroskopie, im Rahmen dieser Arbeit.

Studien zur Expression und Rekonstitution des H<sub>V</sub>1-Kanals in vorgefertigte unilamellare Vesikel wurden in Zusammenarbeit mit Gregor Psotta, Rebecca Rixen und Kristina Kramer im Rahmen eines Fachvertiefungspraktikums bzw. einer Bachelorarbeit durchgeführt.

SEIRA-Spektroskopie-Studien wurden von Enrico Forbrig, Dr. Jacek Kozuch und Prof. Dr. Peter Hildebrandt am Institut der Chemie der Technischen Universität Berlin durchgeführt.

### 4.1 Heterologe Expression des rekombinanten H<sub>V</sub>1-Proteins

Mit Hilfe der heterologen Expression von H<sub>V</sub>1 in *Pichia pastoris* durch Ramsey *et al.* konnte nachgewiesen werden, dass einzig das H<sub>V</sub>1-Protein für den beobachteten Protonentransport verantwortlich ist.<sup>[1]</sup> Dieses Erkenntnis stützte die Theorie, dass im Protonenkanal im Gegensatz zu klassischen spannungsgesteuerten Kationenkanälen die membrangängigen Domänen S1–S4 die Aufgaben von Pore und Spannungssensor erfüllen. Die Bedeutung der heterologen Proteinexpression liegt daher, neben der biotechnologischen Herstellung pharmazeutischer Proteine, u. a. in der Möglichkeit Proteine isolieren und innerhalb definierbarer Bedingungen untersuchen zu können. Die Expression in *E. coli* stellt dabei ein einfaches und kostengünstiges System dar, wobei auf einen Apparat zur posttranslationale Modifikation verzichtet werden muss. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression des H<sub>V</sub>1-Proteins aus *E. coli* etabliert werden.

#### 4.1.1 Isolation und Transformation des Plasmids pH<sub>V</sub>1WT

Ein essenzieller Schritt bei der Isolation rekombinanter Proteine ist deren Aufreinigung. Diese wird durch die Herstellung so genannter Fusionsproteine erleichtert. Hierbei wird dem Wildtyp (WT)-Protein durch gentechnische Modifikation eine DNA-Sequenz angefügt, welche z. B. eine Polyhistidin-Sequenz kodiert. Diese erlaubt die Aufreinigung und Aufkonzentration des Proteins mittels Affinitätschromatographie. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Tag am N-Terminus angefügt werden, daher wurde der Vektor pET-28b(+) verwendet. Zudem ermöglicht dieser Vektor, in Kombination mit den verwendeten *E. coli*-Stämmen, die Regulation der Expression über den T7-Promoter. Bevor die Ligation zum

## Ergebnisse

Zielplasmid pH<sub>V</sub>1WT erfolgen konnte, wurde die kodierende DNA aus dem Ausgangsplasmid pCDNA3.1X mittels Doppelverdau durch die Restriktionsenzyme HindIII und XhoI extrahiert und wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben aus dem Agarosegel isoliert. In analoger Weise erfolgte die vorbereitende Präparation des Vektors pET-28b(+). Abbildung 4-1 zeigt die Auftrennung der entsprechenden DNA-Banden nach der Restriktion (A) und der anschließenden Aufreinigung der ausgeschnittenen Gel-Banden (B) in einem Agarosegel. Als Folge der erfolgreichen, zweifachen Restriktion des Plasmids pCDNA3.1X (Abbildung 4-1 A und B DNA) können zwei Banden beobachtet werden. Erstere ist über einen Größenbereich von etwa 5–8 Kilobasenpaaren (kbp) verteilt, während die zweite Bande verschwommen zwischen 750–1000 bp (grüner Rahmen) lokalisiert werden kann. Der Verdau des pET-28b(+) liefert nur eine verschmierte Bande im Bereich von 5–6 kbp (oranger Rahmen). Dies schließt einen erfolgreichen Verdau jedoch nicht aus, da das entfernte Fragment eine Länge von 15 bp besitzt und somit unter der Detektionsgrenze liegt.

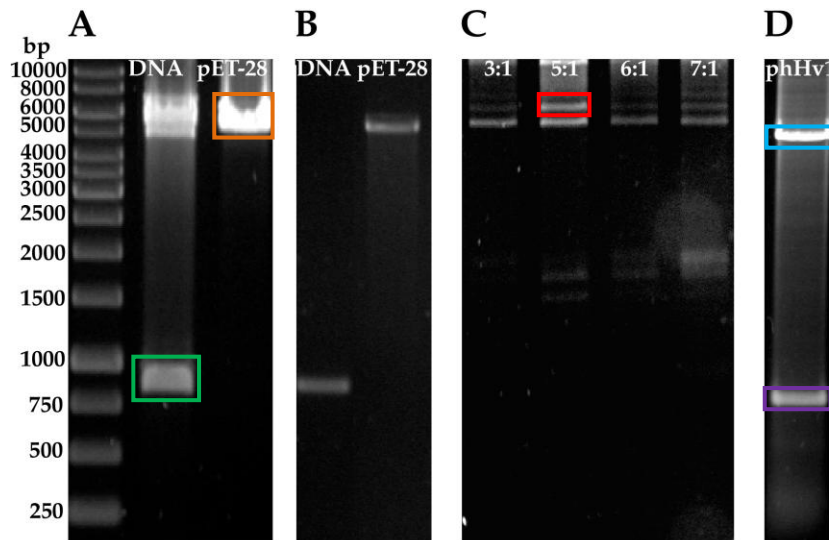
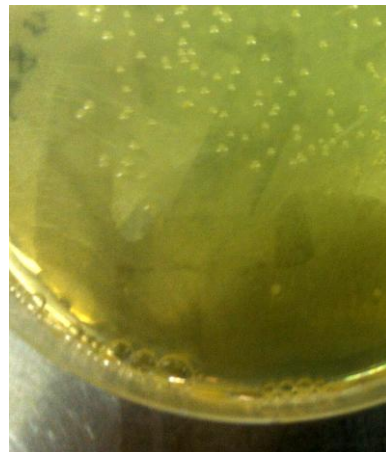


Abbildung 4-1: Dokumentation der einzelnen Umklonierungsschritte veranschaulicht anhand der zugehörigen Agarosegele. (A) Der Doppelverdau des Plasmids pCDNA3.1X, mittels der Restriktionsendonukleasen XhoI und HindIII, liefert zwei Banden. Von Interesse ist die Bande in einem Größenbereich von 750–1000 bp (grüne Umrahmung), da dies der Masse der H<sub>V</sub>1 kodierenden DNA entspricht. Der Verdau des Zielvektors pET-28b(+) liefert nur eine Bande. Die geringe Auflösung des Gels erlaubt es nicht, das abgetrennte Fragment von etwa 15 bp zu detektieren. (B) Die Banden im Bereich von 5000 bp und 800–900 bp bestätigen die erfolgreiche Isolation der in A markierten Banden aus einem Gelausschnitt. (C) Die Ligation der aufgereinigten DNA-Fragmente, welche in B gezeigt sind, erfolgte mit variierendem Insert-zu-Vektor-Verhältnis. Es zeigt sich hierbei, dass ein fünffacher Insertüberschuss eine starke Bande im Bereich von 6000 bp liefert (rote Umrahmung). Dies entspricht etwa der Gesamtmasse des Vektors inkl. kodierender DNA. (D) Nach erfolgreicher Transformation des 5:1 Ligationsansatzes wurde das Zielplasmid pH<sub>V</sub>1WT aus *E. coli* isoliert und zweifach verdaut. Es konnten zwei Banden im Bereich von 5000 bp (blauer Rahmen) und 800 bp (lila Rahmen) beobachtet werden.

Im Anschluss der Gelextraktion zeichnen sich die isolierten Banden präziser ab (siehe Abbildung 4-1 B). Hierdurch kann den Insert- und Vektorfragmenten eine Länge von etwa 800–900 bp bzw. 5000 bp zugeordnet werden. Die erfolgreiche Ligation beider DNA-Sequenzen sollte demnach ein Plasmid mit einer Länge im Bereich von 6000 bp liefern. Eine stark ausgeprägte Bande dieser Größenordnung konnte lediglich bei einem Insert/Vektor-Verhältnis von 5:1 beobachtet werden (siehe Abbildung 4-1 C; roter Rahmen). Bei geringerem oder höherem Insertüberschuss liegt die Hauptbande bei etwa 5000 bp und kann somit dem unligierten Vektorfragment zugeordnet werden. Die Bande bei etwa 6000 bp ist hingegen nur schwach zu erkennen. Aus diesem Grund wurde der 5:1-Ligationsansatz für die anschließende Transformation in *E. coli*-Zellen des Typs BL21(DE3)pLysS und BL21(DE3) ausgewählt. Im Anschluss an die Kultivierung des Transformationsausstrichs, welche bei 37 °C über Nacht erfolgte, konnten für beide Zelltypen gewachsene Einzelkolonien beobachtet werden (siehe Abbildung 4-2). Einzelkolonien dienten als Grundlage für die weitere Vermehrung der Zellkulturen, aus welchen das Zielplasmid pH<sub>V</sub>1WT zur weiteren Analyse isoliert werden konnte. Der durchgeführte Doppelverdau mittels HindIII und XhoI des so erhaltenen Plasmids liefert 2 Fragmente im Größenbereich von 5000 bp (blauer Rahmen) und 800 bp (lila Rahmen) und bestätigt die erfolgreiche Transformation der ligierten DNA-Teilstücke (siehe Abbildung 4-1 D). Die Sequenzierung des pH<sub>V</sub>1WT durch die Firma SeqLab (Göttingen) bestätigte die korrekte Kodierung des H<sub>V</sub>1-Proteins inkl. N-terminalen His<sub>6</sub>-Tags. Die vollständige DNA-Sequenz des Fusionsproteins ist im Anhang aufgeführt (siehe Kapitel 8.2).



**Abbildung 4-2:** Fotografie einer LB-Agarplatte (inkl. Kanamycin) nach der Kultivierung über Nacht bei 37 °C. Deutlich sind die gewachsenen Einzelkolonien der BL21(DE3) *E. coli*-Zellen nach Transformation des 5:1-Ligationsansatzes zu erkennen. Für BL21(DE3)pLysS wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet.

Nachdem die erfolgreiche Transformation des pH<sub>V</sub>1WT-Plasmids sowie die korrekte DNA-Sequenz bestätigt wurden, sollte die intakte Funktion des T7-Promoter-Expressionssystems untersucht werden. Zudem sollte im Folgenden die Überexpression des Proteins im Hinblick

## Ergebnisse

auf Ausbeute und Reinheit optimiert werden. Zu diesem Zweck wurde zusätzlich die Transformation des isolierten Plasmids in den *E. coli*-Stamm BL21 Gen-X durchgeführt. Dieser verspricht, laut Hersteller, eine im Vergleich zu BL21(DE3) höhere Ausbeute bei gleichzeitiger Reduktion der Expression der bakterieneigenen Proteine.

### 4.1.2 Zellkultivierung während der Expression

*E. coli*-Zellen zählen zu den häufigsten verwendeten prokaryotischen Expressionssystemen. Sie ermöglichen eine relativ hohe Proteinexpressionsrate bei vergleichsweise geringen Kosten. Zahlreiche Stellschrauben der Zellkultivierung wie etwa Temperatur, Wahl der Codonsequenz des Gens, Mediumzusammensetzung, Antibiotikazugabe und Klonierung von Fusionsproteinen, erlauben eine gezielte Optimierung der heterologen Expression rekombinanter Proteine. <sup>[168,169]</sup> Die Kultivierung der Zellen kann über die Bestimmung der Zelldichte verfolgt werden. Diese wird indirekt über die Messung der Trübung der Suspension bestimmt. Hierzu erfolgt die Detektion der optischen Dichte (*OD*) bei einer Wellenlänge von 600 nm (*OD*<sub>600</sub>). Das Wachstum der Zellen kann dabei in vier Phasen unterteilt werden (siehe Abbildung 4-3). In der ersten, der sogenannten lag-Phase erfolgt die Anpassung der Bakterien an die äußere Umgebung. Es findet keine Zellteilung statt, d. h. die Zelldichte bleibt konstant. Es folgt die log-Phase, in der es zum exponentiellen Wachstum der Zellen kommt. Dieses kann anhand der Gleichung 4-1 beschrieben werden. Hierbei entspricht  $N(t)$  der Zellzahl zum Zeitpunkt  $t$ ,  $N(t_0)$  der Zellzahl zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase und  $k$  der Wachstumsrate. Aus dieser kann die Verdopplungszeit  $t_D$  nach Gleichung 4-2 berechnet werden:

$$N(t) = N(t_0) \cdot e^{k \cdot t}, \quad 4-1$$

$$t_D = \frac{\ln(2)}{k}. \quad 4-2$$

In der dritten, der stationären-Phase, nimmt die Teilungsrate ab und liegt im Gleichgewicht zur Sterberate vor. Hierfür ist zum einen das Nahrungsangebot, als auch das *Quorum sensing* verantwortlich.<sup>[170]</sup> Letzteres beschreibt die chemische Kommunikation der Zellen zum Zweck der Ermittlung der Zelldichte. In der Absterbephase überwiegt die Sterberate, somit nimmt die Zelldichte konstant ab. Grund hierfür ist, dass die Nahrung der Zellen erschöpft ist und ausgeschiedene, zelleigene Toxine das Wachstum beeinflussen.



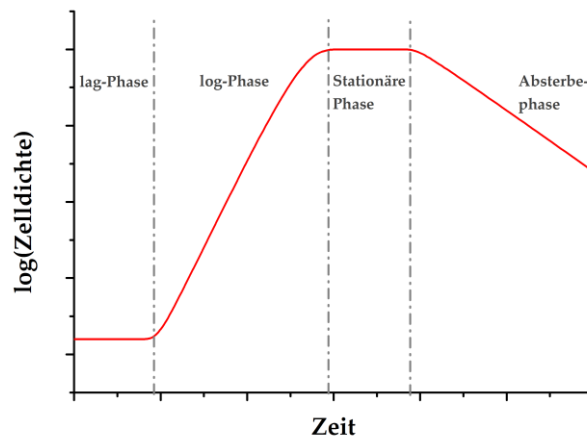


Abbildung 4-3: Das theoretische Wachstum von *E. coli*-Zellen während der Kultivierung verläuft in 4 Phasen. In der Latenz- oder lag-Phase passen sich die Zellen der äußeren Umgebung an, die Zelldichte bleibt daher nahezu unverändert. Es folgt die log-Phase. Diese ist durch ein exponentielles Wachstum der Zelldichte gekennzeichnet. In der stationären Phase nimmt die Wachstumsrate ab. Es liegt ein Gleichgewicht zwischen der Vermehrung und dem Absterben der Zellen vor, die Zelldichte bleibt daher unverändert. Während der Absterbephase lässt sich hingegen eine Abnahme der Zelldichte beobachten.<sup>[106]</sup>

Zellen der Stämme BL21(DE3) und BL21 Gen-X wurden, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, zunächst in LB-Medium (pH 8) bei 37 °C angezchtet. Sie wurden eingesetzt, da sie zusammen mit dem Vektor pET-28b(+), die Regulation der H<sub>v</sub>1-Protein Expression durch das T7-Promoter Expressionsystem erlauben. Hierdurch soll u. a. eine möglichst geringe Verunreinigung erzielt werden. Das Zellwachstum wurde während der Kultivierung anhand der Messung der optischen Dichte verfolgt. Die Wachstumskurve (siehe Abbildung 4-4) ist beispielhaft für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kultivierung der Stämme des Typs BL21 Gen-X und BL21(DE3) nach Transformation des Plasmids pH<sub>v</sub>1WT. Sie folgt dem zuvor beschriebenen theoretischen Verlauf (siehe Abschnitt 4.1.2). Im Anschluss an die lag-Phase, welche etwa nach 60 min endet, gehen die Zellen in die log-Phase über. In dieser vermehren sich die Zellen exponentiell mit einer mittleren Verdopplungszeit von  $t_D = 43$  min. Diese wurde sowohl für die BL21 Gen-X ( $t_D = 43 \pm 9$  min, N = 6)-, als auch die BL21(DE3) ( $t_D = 43 \pm 7$  min; N = 7)-Zellen (Verlauf nicht dargestellt) ermittelt. Bei einer OD<sub>600</sub> = 1 erfolgte die Zugabe von IPTG (siehe Abbildung 4-4 blaue Datenpunkte, Endkonzentration 1 mM). Im Anschluss an die Induktion der Expression verlangsamt sich die Wachstumsrate. Es schließt sich nach etwa 60 min die stationäre Phase an. Im uninduzierten Fall (siehe Abbildung 4-4 grüne Datenpunkte) erreichen die Zellkulturen die stationäre Phase zu einem späteren Zeitpunkt und erzielen dabei eine bis zu 100 % höhere optische Dichte.

## Ergebnisse

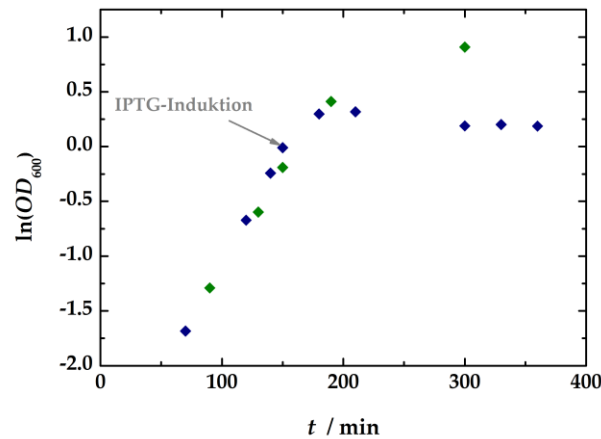


Abbildung 4-4: Zellwachstum des *E. coli*-Stammes BL21 Gen-X im Fall der IPTG induzierten HVCN1-Expression (blau) und ohne IPTG (grün). Das Zellwachstum (in LB-Medium bei 37 °C und pH 8), aufgetragen als natürlicher Logarithmus der  $OD_{600}$ , folgt im induzierten Fall (blau) dem theoretischen Modell (siehe Abbildung 4-3) und kann in eine Latenz-, eine log- und eine stationäre Phase unterteilt werden. Im Vergleich zu Kulturen ohne IPTG (grün) zeigt sich während der log-Phase kein Unterschied in der Vermehrungsrate. Für beide Fälle kann eine Verdopplungszeit von  $t_D = 43$  min ermittelt werden. Die endgültige optische Dichte der IPTG-freien Kulturen liegt jedoch bis zu 100 % über dem Wert der Zellen, deren Expression induziert wurde. Hier wurde die stationäre Phase erst zu einem späteren Zeitpunkt erreicht. Für *E. coli*-Stämme des Typs BL21(DE3) konnte ein analoges Verhalten beobachtet werden. Hierbei wurde während der log-Phase ebenfalls eine mittlere Verdopplungszeit von  $t_D = 43$  min bestimmt.

Das veränderte Zellwachstum bei Zugabe von IPTG gibt einen ersten Hinweis auf die Funktionalität des T7-Promoter Expressionssystems.

### 4.1.3 Identifikation des rekombinanten Proteins

Die eigentliche Herausforderung besteht in der Identifikation und Isolation des gewünschten Proteins. Je nachdem ob das Protein gelöst im Zytoplasma der Zelle, verankert in dessen Membran oder aggregiert in *Inclusion Bodies* vorliegt, ergeben sich verschiedene Strategien zur Isolation. Daher muss das Protein zunächst lokalisiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Isolation in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen lysiert, anschließend wurden lösliche und unlösliche Bestandteile mittels Zentrifugation getrennt. Die SDS-Proben der Lyse, sowie der löslichen Bestandteile des Überstandes und des unlöslichen Pellets nach der Zentrifugation werden im Folgenden als L1 (Lysat), S1 (Überstand, engl. *supernatant*) und P1 (Pellet) bezeichnet. DNA-Fragmente wurden zuvor durch DNase-Zugabe hydrolysiert. Anschließend wurde das erhaltene Pellet in detergentenhaltigem Puffer resuspendiert. Hierdurch sollten Proteine, welche in der Zellmembran oder Proteinaggregaten eingelagert waren, solubilisiert werden.

In Abbildung 4-5 sind die Schritte der zweistufigen Isolation aus BL21 Gen-X (Expression bei pH 8 in LB-Medium, siehe Kapitel 3.2.2 ) anhand eines SDS-Gels nach Schagger dargestellt.

Da eine deutliche Überexpression ausbleibt, kann dem Zielprotein H<sub>v</sub>1 nach der Lyse (L) mittels Lysepuffer A (siehe Spur L1) zunächst keine Bande zugeordnet werden. Proteinbanden treten über den gesamten dargestellten Größenbereich von 10 bis 250 kDa auf. Nach der Zentrifugation kann beobachtet werden, dass die Intensität einer Proteinbande im Größenbereich zwischen 35 und 55 kDa (siehe Markierung) im Überstand (engl. *supernatant*; S) (siehe Spur S1) gegenüber L1 verschwunden ist. Gleichzeitig war eine Bande dieser Größenordnung im Pellet (P) deutlich dominant (siehe Spur P1). Daneben können weitere gering konzentrierte Banden über das komplette Größenspektrum beobachtet werden.

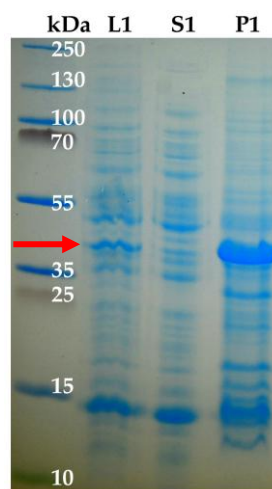


Abbildung 4-5: SDS-Gel des Zellaufschlusses der BL21 Gen-X-Zellen. Nach Lyse der Zellen (Spur L1), welche in LB-Medium (pH 8) bei 37 °C kultiviert wurden, ist keine eindeutige Überexpression erkennbar, da Proteinbanden ähnlicher Intensitäten über den gesamten Größenbereich verteilt auftreten. Jedoch kann nach der anschließenden Zentrifugation eine überladene Bande im Pellet (Spur P1) zwischen 35 und 55 kDa identifiziert werden (siehe Markierung). Während eine Bande derselben Größe in L1 noch beobachtet werden konnte, ist sie im Überstand (Spur S1) nahezu verschwunden.

#### 4.1.4 Detergens Screening

Nachdem das Zielprotein im unlöslichen Teil der lysierten Zellen lokalisiert werden konnte (siehe Kapitel 4.1.3 und Abbildung 4-5), wurden verschiedene Detergenzien auf ihre Eignung zur Solubilisierung des Proteins untersucht (siehe Kapitel 3.2.2). Auf Grund des Verwendungszweckes werden an die Tenside verschiedene Ansprüche gestellt. Zum einen sollten sie, das Protein nicht denaturieren, so dass dessen aktive Konformation beibehalten bleibt. Zum anderen sollte das Detergens dialysierbar sein, so dass es im späteren Verlauf leicht abgetrennt werden kann. Untersucht wurden das Alkylrest tragende Natriumdodecylsulfat (SDS), *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM), Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid (DM), Sulfobetain 12 (SB-12) und das auf einem Steroidgerüst basierende CHAPS. Während SDS anionisch ist, sind CHAPS und SB-12 zwitterionisch. Alle drei eignen sich für die

## Ergebnisse

Trennung von Protein-Protein Wechselwirkungen. Die neutralen Alkylmaltoside lösen hingegen bevorzugt Lipid-Protein Wechselwirkungen.<sup>[14]</sup> Für das *Screening* wurde ein Teil des Pellets P1, einer Isolation aus BL21 Gen-X, in Grundpuffer (20 mM HEPES; 150 mM NaCl, pH 8) resuspendiert. Die Suspension wurde zu gleichen Teilen aufgeteilt. Es wurde eine Konzentration von 0.25, 0.5 und 1 % (*w/v*) für jedes Detergens eingestellt, gerührt und im Anschluss zentrifugiert. Zur Beurteilung der Solubilisierungseigenschaften wurde jeweils nur der erhaltene Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Durch die zwitterionischen Tenside konnte eine Lösung des Proteins, in dem untersuchten Konzentrationsbereich, nicht erzielt werden. Bilder der entsprechenden SDS-Gele werden daher nicht aufgeführt. Lediglich SDS, DDM und DM konnten das Zielprotein in ausreichendem Umfang solubilisieren, wie Abbildung 4-6 zeigt. Dargestellt ist der Ausschnitt des SDS-Gels im Größenbereich von 25 bis 55 kDa. Es kann bei allen Detergenzien beobachtet werden, dass der Anteil an Protein im Überstand mit steigender Konzentration zunimmt. Die Intensität der Proteinbande bei etwa 40 kDa ist bei 1 %iger SDS-Lösung am stärksten, gefolgt von der Spur bei 1 % DDM. DM weist die geringste Fähigkeit zur Proteinlösung auf.

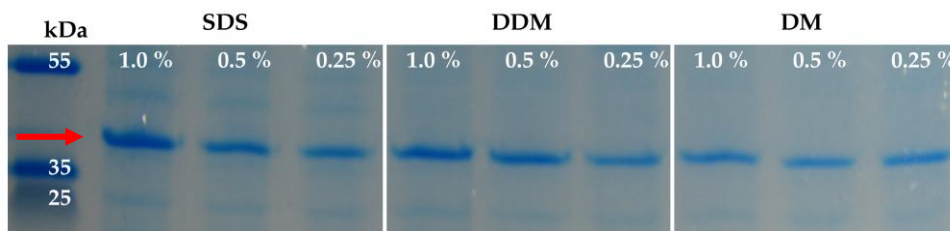


Abbildung 4-6: Der Ausschnitt des SDS-Gels zeigt die Überstände (S2) aus dem Detergens *Screening*. Die Solubilisierung des Zielproteins verlief in dem Konzentrationsbereich von 0.25 bis 1 % (*w/v*) mit den Detergenzien SDS, DDM und DM erfolgreich. Deutlich wird hierbei, dass in allen Fällen die stärkste Intensität der gesuchten Bande, bei jeweils 1 %iger-Lösung vorliegt. Der Grad der Solubilisierung ist bei SDS am höchsten, gefolgt von DDM und DM.

SDS erfüllt zwar die Ansprüche größtmöglicher Solubilisierung und Dialysierbarkeit, jedoch denaturiert es das zu isolierende Protein und lässt sich später nicht zusammen mit dem, für die Aktivitätsuntersuchung wesentlichen, kaliumhaltigen Puffer verwenden (siehe Kapitel 3.4). Des Weiteren fällt es bei niedrigen Temperaturen, die zur Lagerung des Proteins notwendig sind, aus. DDM hingegen ist ein mildes Detergens, lässt sich jedoch auf Grund der geringen kritischen Mizellkonzentration von 0.15 mM nicht dialysieren. DM wurde als Detergens zur Isolation ausgeschlossen, da der Grad der Solubilisierung zu gering erschien. Aus diesem Grund wurde die Isolation in zwei Schritte unterteilt. Die Zellyse wurde zunächst bei 4 °C durchgeführt, während die Solubilisierung des Proteins mittels SDS bei Raumtemperatur erfolgte. Im Anschluss wurde SDS mittels Dialyse gegen Dialysepuffer mit sehr geringer Konzentration an DDM ausgetauscht. Der Schritt diente der Rückfaltung des Fusionsproteins. Des Weiteren konnte das Protein in diesem Puffer bei 4 °C gelagert werden.

#### 4.1.5 Solubilisierung des H<sub>v</sub>1-Proteins

Nachdem eine Strategie zur Solubilisierung des Proteins aus den unlöslichen Bestandteilen der Zelle ausgearbeitet wurde (siehe Kapitel 4.1.4), wurde die Isolation des Proteins fortgesetzt. Die zugehörigen SDS-Proben werden in Bezug auf die vorherige Nomenklatur als L2, S2 und P2 bezeichnet.

Nach der erneuten Resuspension des erhaltenen Pellets in 1 %igen SDS Isolationspuffer B und anschließender Zentrifugation sind die Verunreinigungen im Überstand (siehe Spur S2) im Vergleich zu P1 (siehe Abbildung 4-5) weitgehend verschwunden. Die Bande bei 40 kDa ist weniger überladen, sie erscheint gegenüber den schwachen Banden anderer Hintergrundproteine jedoch als Hauptbande. Verunreinigungen sind zum größten Teil im niedermolekularen Massenbereich des Gels unterhalb dieser Proteinbande zu finden. Die Spuren von S2 und L2 unterscheiden sich nicht. Das Protein wurde somit erfolgreich solubilisiert. Das Pellet (P2) weist undefinierte Banden im Bereich von 100–250 kDa auf und enthält hauptsächlich Protein mit einer Masse von etwa 40 kDa. Zudem können schwache niedermolekulare Banden (< 40 kDa) identifiziert werden.

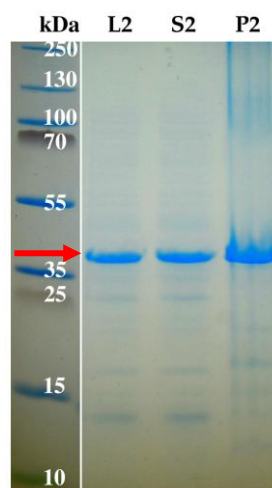


Abbildung 4-7: SDS-Gel nach dem zweiten Isolationsschritt, d. h. der Solubilisierung des Proteins. Im Anschluss an die Resuspension der Pellets in SDS-haltigem Isolationspuffer B (L2) kann bei 40 kDa die Hauptbande identifiziert werden. Der Überstand nach erneuter Zentrifugation (S2) lässt keine Unterschiede zu L2 erkennen. Verunreinigungen sind nur noch schwach im Bereich zwischen 10 und 35 kDa vorhanden. Das zweite Pellet (P2) enthält nach wie vor eine große Menge des ungelösten Proteins, sowie Verunreinigungen.

Obwohl SDS im Allgemeinen ein sehr wirkungsvolles Detergens ist, konnte ein deutlicher Rückstand von Protein im zweiten Pellet beobachtet werden (siehe Abbildung 4-7).<sup>[171]</sup> Dies deutet auf eine unvollständige Solubilisierung hin und ist ein Indiz für Bildung von *Inclusion Bodies* während der Überexpression des Proteins. Rebecca Rixen konnte im Rahmen eines Fachvertiefungspraktikums und ihrer Bachelorarbeit nachweisen, dass der Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator zu einer gesteigerten Homogenisation führt. Dies ist auf

## Ergebnisse

die auftretenden hohen Scherkräfte zurückzuführen. Hieraus resultierte, im Vergleich zum Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung, eine erhöhte Reinheit der Probe (vgl. Abbildung 4-8).<sup>[172,173]</sup> Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Protein in unlöslichen Aggregaten vorliegt, welche höhere Kräfte zur Solubilisierung notwendig machen.

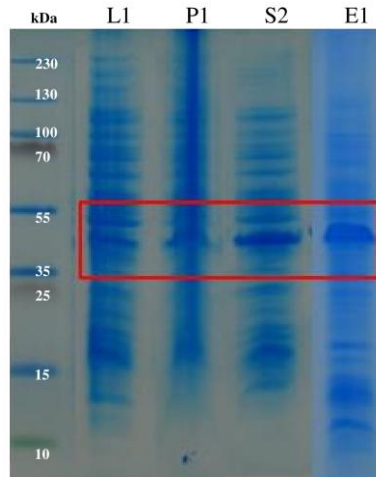


Abbildung 4-8: SDS-Gel der Isolation des spannungsgesteuerten Protonenkanals aus BL21 Gen-X.<sup>[172]</sup> Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallbehandlung (3 x 45 s, 4 Zyklen; Leistung 50 %). Dies resultiert in einer geringeren Homogenisation der Probe und einer stärkeren Verunreinigung des zweiten Überstandes (S2) sowie der eluierten Fraktionen. Dies wird exemplarisch durch Fraktion E1 verdeutlicht.

### 4.1.6 Aufreinigung des H<sub>v</sub>1-Proteins

Die erfolgreiche Solubilisierung des Proteins (siehe Abschnitt 4.1.5) stellte die Grundlage für dessen weitere Aufreinigung dar. Wie Abbildung 4-7 zeigt enthält der Überstand S2 neben dem Zielprotein weitere Verunreinigungen, welche mittels immobilisierter Metallchelator-Affinitätschromatographie (IMAC; siehe Abschnitt 3.2.3) entfernt werden sollten. Zu diesem Zweck wurde zu Beginn dieser Arbeit durch gezielte Umklonierung ein Fusionsprotein erzeugt, welches einen N-terminalen, sechsfachen Histidin-Tag besitzt (siehe Abschnitt 3.1). Dieser sollte mit hoher Affinität an zweiwertige Kationen wie Nickel und Cobalt binden. Diese werden durch Chelatisierung mittels Nitritotriessigsäure (NTA) an der stationären Phase, in diesem Fall quervernetzte Agarose, der Chromatographiesäule immobilisiert.

Die Inkubation der Ni-NTA-Agarose mit dem Überstand S2 erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht unter konstanten Schwenken. Im Anschluss wurde die stationäre Phase in die Säule gegeben. Verunreinigungen sollten durch einen Waschschrift entfernt werden, bevor die Elution des Zielproteins unter Verwendung eines imidazolhaltigen Puffers erfolgte. Der Prozess der Aufreinigung wurde anhand eines SDS-Gels nach Schägger verfolgt und analysiert (siehe Abbildung 4-9). Als Durchlauf (DL) wird dabei die zurückbleibende Lösung



bezeichnet, nach dem das Gemisch in die Säule überführt wurde. Die Proben der Wasch- und Elutionsfraktionen werden mit W bzw. E gekennzeichnet.

Wie Abbildung 4-9 zeigt, weist der Durchlauf im Vergleich zum Überstand S2 (siehe Abbildung 4-7) einen geringen Proteingehalt auf. Neben der Hauptbande des Zielproteins bei etwa 40 kDa (siehe Markierung), können nur noch schwach niedermolekulare Verunreinigungen wahrgenommen werden. Während sich die erste Waschfraktion nicht vom DL unterscheidet, kann in Probe W2 nur noch eine schwache Hauptbande beobachtet werden, welche in W3 (nicht dargestellt) völlig verschwunden ist. Die Elution des Proteins erfolgt mit einem raschen Anstieg der Konzentration von E1 nach E2. In E2 und E3, welche sich in der enthaltenen Proteinmenge kaum differenzieren, lassen sich im Gegensatz zu den übrigen Elutionsfraktionen zwei deutliche Banden identifizieren. Neben der Hauptbande kann eine weitere im Bereich von 10–15 kDa beobachtet werden. In den folgenden Fraktionen sinkt die Intensität deutlich. Die Fraktionen E1 bis E5 wurden vereinigt und zur Entfernung von SDS und Imidazol gegen den DDM-haltigen Puffer dialysiert (siehe Abschnitt 3.2.6). Die Probe nach der Dialyse (D1-5) zeigt eine deutliche Bande bei 40 kDa und kaum sichtbare Verunreinigungen zw. 10–15 kDa. Mit Hilfe des zugehörigen Western Blot (WB), bei dem ein Penta-His Antikörper verwendet wurde, konnte die Bande bei 40 kDa dem H<sub>v</sub>1-Fusionprotein inkl. His<sub>6</sub>-Tag zugeordnet werden. Dieses besitzt eine theoretische Masse von 36.7 kDa.

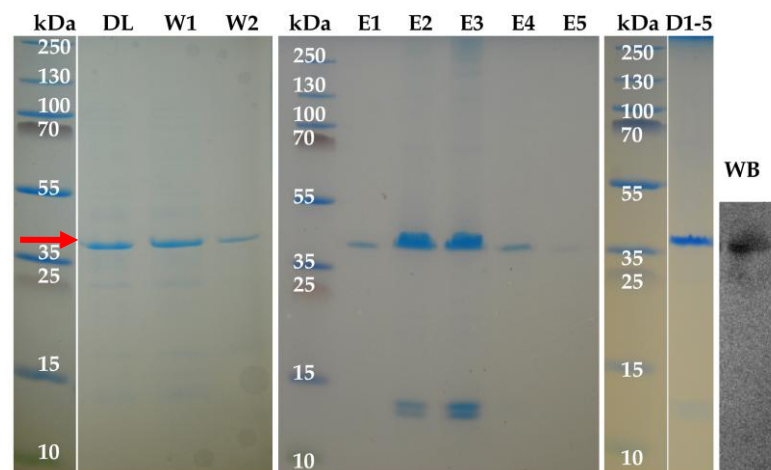


Abbildung 4-9: SDS-Gel Analyse der Aufreinigung. Der Durchlauf enthält, neben kleineren Verunreinigungen, das Zielprotein (siehe Markierung), dessen Konzentration während des Waschvorganges (W1 und W2) deutlich sinkt. Die Elution mittels imidazolhaltigen Puffers resultiert in einem sprunghaften Anstieg des Proteingehalts von E1 nach E2. E2 und E3 unterscheiden sich in ihrer Intensität dabei kaum, weisen jedoch im Kontrast zu E1, E4 und E5 eine weitere Bande zwischen 10–15 kDa auf. Mit steigender Fraktionszahl nimmt die Proteinmenge wieder deutlich ab. Die vereinigten dialysierten Fraktionen E1–E5 (D1-5) weisen nahezu keine Verunreinigungen sowie eine deutliche Bande bei 40 kDa auf. Diese konnte mit Hilfe des Western Blot (WB) dem H<sub>v</sub>1-Fusionprotein zugeordnet werden.

Die Konzentration der vereinigten Fraktionen nach Dialyse betrug 0.67 mg/mL bzw. 18.3  $\mu$ M und wurde mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt (siehe

## Ergebnisse

Abschnitt 3.2.7). Die Gesamtmenge des isolierten Proteins betrug somit etwa  $6.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Kultur.

### 4.1.7 Isolation von H<sub>v</sub>1 aus BL21(DE)

Neben dem Stamm BL21 Gen-X, welcher eine nicht genauere charakterisierte Mutation besitzt, wurden des Weiteren Zellen des Typs BL21(DE3) für die Expression des H<sub>v</sub>1-Proteins eingesetzt. Die Eigenschaften des BL21(DE3)-Stammes sowie zahlreiche Isolationen aus selbigen Zellen sind in der Literatur bereits umfassend beschrieben worden. Die Zelllinie dient daher als Alternative bzw. Vergleichssystem zu dem BL21 Gen-X-Stamm. Hierbei wurde das zuvor präsentierte Protokoll angewendet. Anhand eines SDS-Gels (siehe Abbildung 4-10) soll der Verlauf der Isolation und Aufreinigung von H<sub>v</sub>1 im Folgenden beschrieben werden. Die Kennzeichnung der Proben erfolgt in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Kapiteln. Nach der Lyse der Zellen (siehe Spur L1) kann eine leichte Überexpression des H<sub>v</sub>1-Proteins anhand einer Bande bei 40 kDa beobachtet werden. Daneben sind jedoch starke Verunreinigungen über den gesamten Größenbereich von 10 bis 250 kDa zu beobachten. Der Überstand (siehe Spur S1) unterscheidet sich in der Zusammensetzung kaum von L1, lediglich die Konzentration des Zielproteins (siehe Markierung) ist deutlich verringert. Die Bestandteile des Pellets (Spur P1) konnten durch die Elektrophorese nicht vollständig aufgetrennt werden, sodass das enthaltene Protein keinem genauen Größenbereich zugeordnet werden konnte. Im Anschluss an die Resuspension des Pellets in Isolationspuffer B kann eine Reduzierung der Verunreinigungen verzeichnet werden. L2 und S2 unterscheiden sich wie im Fall der Isolation aus BL21 Gen-X nicht, jedoch sind in diesem Fall deutlich mehr Verunreinigungen, speziell im Massenbereich oberhalb 40 kDa enthalten (vgl. Abbildung 4-7). Das zweite Pellet enthält hauptsächlich das zu isolierende Protein. Nach der Inkubation der Ni-NTA-Agarose mit dem Überstand S2, zeigt der Durchlauf (siehe Spur DL), eine Verringerung der gesamten Proteinkonzentration. Dies korreliert mit den Beobachtungen aus der vorherigen Isolation aus BL21 Gen-X. Die Waschfraktionen zeigen mit sukzessiver Nummerierung eine analoge Zusammensetzung abnehmender Konzentration und sind daher nicht aufgeführt. Die Elution des Proteins folgt dem zuvor beschriebenen Verlauf. Während E1 nur wenig Protein enthält, steigt die Konzentration in E2 rasch an. Sowohl E2 und E3 enthalten dabei Verunreinigungen, welche besonders im Bereich knapp oberhalb von 10 und 15 kDa auftreten. In E4 ist nur noch eine schwache H<sub>v</sub>1 Bande zu erkennen. Die Fraktionen E1 bis E4 wurden vereinigt, dialysiert, aufkonzentriert (siehe Spur D1-4) und bis zur späteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Im direkten Vergleich mit der Fraktion E2 ist der Gehalt an Protein unterhalb von 40 kDa nochmals gesunken. Die Konzentration der Fraktion D1-4 nach der Dialyse betrug  $0.33 \text{ mg/mL}$  bzw.  $9 \text{ } \mu\text{M}$ . Es konnten somit etwa  $2.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Kultur Protein isoliert werden.



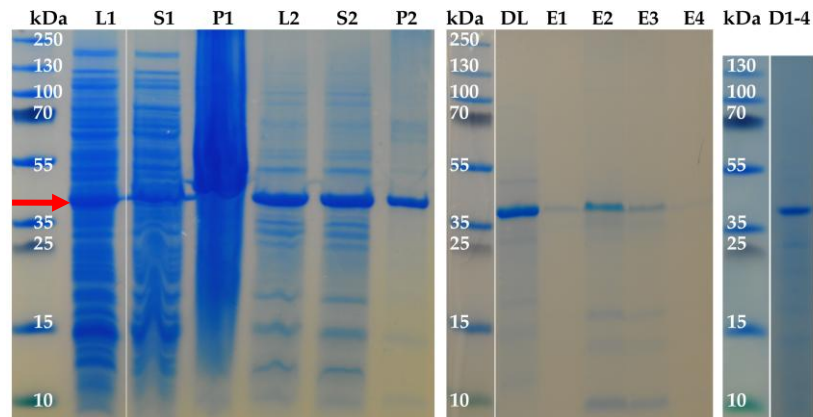


Abbildung 4-10: SDS-Gel der Isolation und Aufreinigung des  $H_v1$ -Proteins aus BL21(DE3). Nach der Lyse der Zellen sind neben der leichten Überexpression des Zielproteins, mit einer Masse von etwa 40 kDa (siehe Markierung), Verunreinigungen im gesamten Größenbereich erkennbar. Die Verunreinigungen bleiben zu einem Großteil im Überstand (S1) zurück, während die Konzentration des Zielproteins abnimmt. Die Spur des Pellets P1 ist unvollständig aufgetrennt und ermöglicht keine genauere Identifikation. Es lässt sich jedoch erkennen, dass dieses eine große Menge Protein enthält. Die Resuspension des Pellets (L2) bestätigt dies und zeigt auch, dass der Anteil an Verunreinigungen gegenüber der Hauptbande abgenommen hat. Nach der erneuten Zentrifugation lässt sich im Überstand keine Änderung der Zusammensetzung im Vergleich zu L2 erkennen. Der Durchlauf der Aufreinigung (DL) weist hingegen kaum noch Fremdprotein auf. Nahezu die Gesamtheit des eluierten  $H_v1$ -Proteins befindet sich in den Fraktionen E2 und E3, zusammen mit niedermolekularen Verunreinigungen. E1 und E4 weisen nur geringe Proteinkonzentrationen auf. Nach der Dialyse der vereinigten, aufkonzentrierten Fraktionen E1–E4, ist der Anteil der Verunreinigungen abermals gesunken.

#### 4.1.8 Charakterisierung des rekombinanten Proteins

Zum Zweck der genaueren Identifizierung des isolierten Proteins, wurde die dem  $H_v1$ -Kanal zugeordnete Bande mittels Flüssigkeitschromatographie gekoppelter Massenspektrometrie (engl. *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*, LC-MS) untersucht. Des Weiteren sollte die Verunreinigung, welche als Bande im Bereich von 10–15 kDa auftritt charakterisiert werden. Hierzu wurden die entsprechenden SDS-Gelbanden dialysierter Fraktionen nach der Isolation und Aufreinigung aus BL21 Gen-X, welche im Rahmen der Bachelorarbeit von Rebecca Rixen durchgeführt wurde, aus dem Gel ausgeschnitten (siehe Abbildung 4-11 A). Beide Banden konnten zuvor mit Hilfe eines Western Blot unter Verwendung des Penta-His Antikörpers, dem Fusionsprotein bzw. einem Proteinfragment zugeordnet werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der  $His_6$ -Tag durch einen Thrombinverdau zu entfernen ist.

Die Vorbereitung und massenspektrometrische Analyse der Proteinbanden wurden freundlicherweise von Frau Monika Raabe (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) vorgenommen. Hierzu wurde zunächst ein *In Gel* Trypsin-Verdau nach

## Ergebnisse

Shevchenko *et al.* durchgeführt.<sup>[174]</sup> Die Prozedur beinhaltet im Allgemeinen vier Schritte, die Entfärbung des Proteins, die Reduktion mittels Dithiothreitol und Alkylierung der enthaltenen Cysteine mittels Iodacetamid. Abschließend erfolgt der proteolytische Verdau.<sup>[175]</sup> Trypsin spaltet hierbei spezifisch nach den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Die erhaltenen Peptidfragmente werden durch schonende Elektrosprayionisation ionisiert und anschließend durch LCMS analysiert. Die identifizierten Peptide wurden mit der theoretischen Aminosäuresequenz des H<sub>v</sub>1-Fusionsproteins verglichen. Übereinstimmende Sequenzabschnitte wurden rot markiert (siehe Abbildung 4-11 B). Anhand einer 68 %igen Übereinstimmung konnte das H<sub>v</sub>1-Protein verifiziert werden. Hierbei wurden vor allem Peptidfragmente aus dem N- und C-Terminus identifiziert. Peptidsequenzen der Transmembransegmente S1-S4 (siehe farbige Unterstreichung) konnten nur zu einem sehr geringen Teil nachgewiesen werden. Die zusätzliche Analyse der Verunreinigung bestätigte mit einer 55 %igen Übereinstimmung, dass es sich hierbei um einen N-terminalen Proteinrest handelt. Die Zuordnung der Segmente erfolgte in Anlehnung an die *universal protein database* (UniProt) Nr. Q96D96.



Abbildung 4-11: Kombinierte Analyse zur Identifikation des isolierten Proteins. (A) Das im Rahmen der Bachelorarbeit von Rebecca Rixen isolierte Protein (Spur D), weist im SDS-Gel zwei deutliche Banden bei 40 kDa (roter Pfeil) und 15 kDa (grüner Pfeil) auf. Beide konnten mittels Western Blot (WB) dem Fusionsprotein zugeordnet werden. Durch einen Verdau mit Thrombin (T) wurde zudem der His<sub>6</sub>-Tag partiell entfernt (Spur D+T). (B) Die Analyse der 40 kDa Bande, im Anschluss an deren proteolytischen Trypsin-Verdau, mittels LCMS bestätigt eine 68 %iger Übereinstimmung (rote Markierung) mit der Aminosäuresequenz des H<sub>v</sub>1-Fusionsproteins. Hierbei wurden hauptsächlich Peptide des N- und C-Terminus detektiert. Die transmembranen Segmente (S1-S4, farbige Unterstreichung) konnten nicht direkt bestätigt werden. Die Verunreinigung bei etwa 15 kDa konnte mittels LCMS einem N-terminalen Proteinrest zugeordnet werden (Ergebnis nicht dargestellt).

Die CD-spektroskopische Charakterisierung der Sekundärstruktur des H<sub>v</sub>1-Fusionsproteins erfolgte im Anschluss an dessen Rückfaltung in Dialysepuffer (siehe Abschnitt 3.2.9). Hierbei wurden jeweils fünf Spektren akkumuliert und um das Puffersignal korrigiert. Die korrigierten CD-Daten wurden unter Berücksichtigung der Schichtdicke der Küvette, der Probenkonzentration und der Aminosäureanzahl nach Formel 3.9 normiert. Der Datensatz der normierten, mittleren residualen Elliptizität wurde mit Hilfe des Onlineprogramms Dichroweb unter Verwendung des Algorithmus CDSSTR, Referenzdatensatz 4 angepasst.

Das zugehörige Spektrum über den fernen UV-Bereich (190-260 nm) ist in Abbildung 4-12 dargestellt. Es weist zwei Minima bei 208 und 221 nm, sowie ein Maximum im Bereich von 190 nm auf. Der Verlauf des Spektrums ist charakteristisch für  $\alpha$ -helikale Strukturelemente. Die Anpassung der Daten ergab bei einer normierten Abweichung (engl. *normalized root mean squared deviation*, NRMSD) von 0.022 einen  $\alpha$ -helikalen Anteil von 40 %, sowie einen  $\beta$ -Faltblattanteil von 16 %. Daneben liegen 25 % als ungeordnete Struktur und 18 % als Schleifen vor.

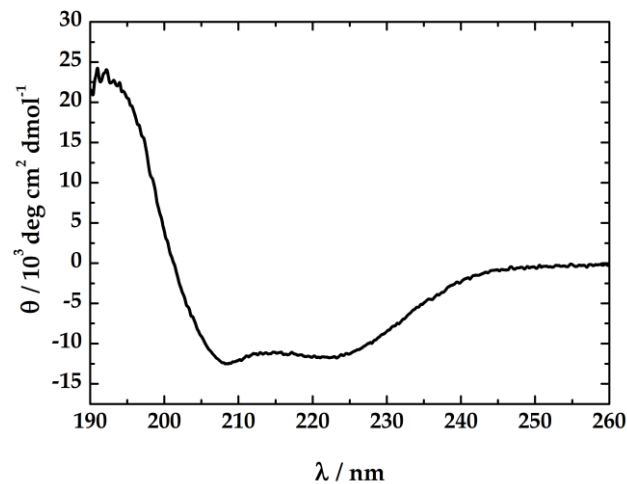


Abbildung 4-12: Gemitteltetes CD-Spektrum von  $H_v1$  in Dialysepuffer. Die auftretenden Minima im Bereich von 208 und 221 nm, sowie das Maximum um 190 nm sind ein Hinweis auf  $\alpha$ -helikale Sekundärelemente. Die Anpassung der Daten an den Algorithmus CDSSTR und dem Referenzdatensatz 4, ergab einen  $\alpha$ -helikalen Anteil von 40 %, während  $\beta$ -Faltblätter und Schleifen 16 bzw. 18 % der Strukturelemente ausmachen. 25% der Struktur liegen demnach ungeordnet vor.

## 4.2 ACMA basierter Rekonstitutions- und Aktivitätsnachweis

### 4.2.1 Rekonstitutionsnachweis mittels Dichtegradientenzentrifugation

Neben dem ACMA basierten Protonenfluss-Test zur Bestätigung der funktionellen Rekonstitution des  $H_v1$ -Proteins wurde ergänzend eine Dichtegradientenzentrifugation, auch bekannt als *Flotation-Assay*, auf Basis von Nycodenz durchgeführt. Hierbei wurden Proteoliposomen eines Protein-zu-Lipid-Verhältnisses von 1:9700 ( $n/n$ ) über Mischung einer 80 %igen und 30 %igen Nycodenzlösung geschichtet und anschließend durch Ultrazentrifugation aufgetrennt. Hierdurch entsteht ein Konzentrationsgefälle von 0 bis 40 % Nycodenz (siehe Abbildung 4-13 A). Liposomen wie Proteoliposomen, die in ihrem inneren Kompartiment Puffer enthalten, wandern in Regionen, deren Dichte der des Puffers entspricht. Freies, nicht rekonstituiertes Protein hingegen sinkt in Bereiche hoher Dichte ab.

## Ergebnisse

Die im Anschluss entnommenen Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot auf die Anwesenheit von H<sub>v</sub>1 untersucht.

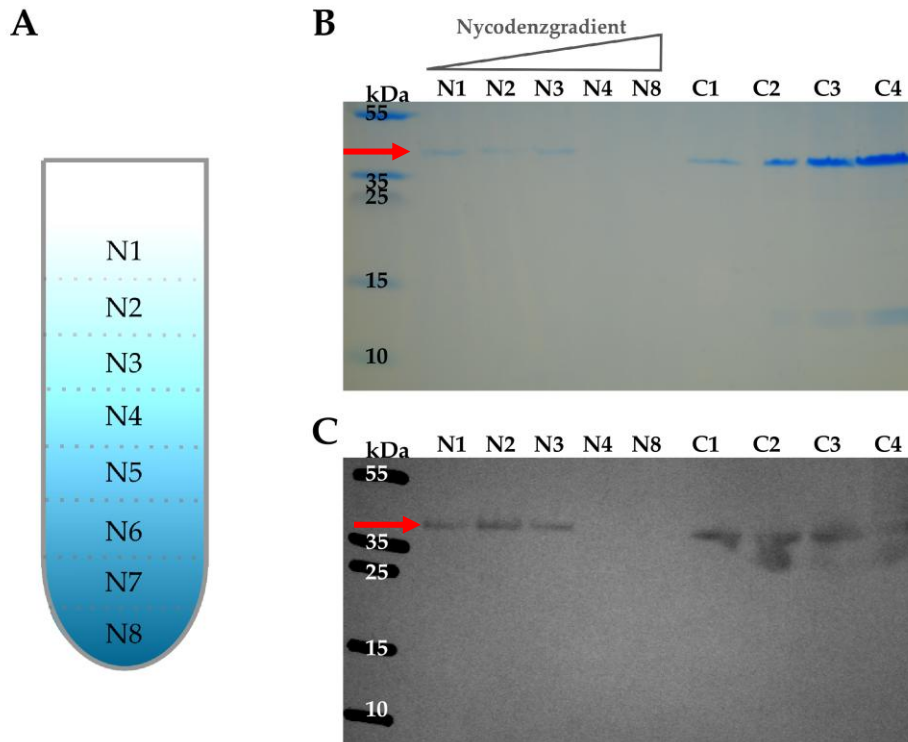


Abbildung 4-13: SDS-Gel und Western Blot nach Dichtegradientenzentrifugation von POPC/POPG/Chol (55:25:20) Proteoliposomen mit einem nominalen Protein-zu-Lipid-Verhältnis von 1:9700 (*n/n*). (A) Schematische Darstellung des durch Zentrifugation aufgebauten Nycodenzgradienten zur Analyse der Rekonstitutionseffizienz. Es wurden jeweils Fraktionen zu je 20  $\mu$ L entnommen. (B) Der Nycodenz basierte Dichtegradient (0–40 % (*w/v*)) wurde in Vesikelpuffer durchgeführt. Das SDS-Gel der Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation (N1–N4 und N8) zeigt, dass das H<sub>v</sub>1-Protein (40 kDa) in den oberen drei Fraktionen N1–N3 lokalisiert ist. Im Gegensatz zu den Referenzproben (C1–C4) kann in den Proteoliposomen keine Bande im Bereich von 10–15 kDa beobachtet werden. (C) Der Westen Blot bestätigt, dass das Protein in den oberen Fraktionen des Nycodenz-Gradienten lokalisiert ist. Antikörper: Penta-His (Qiagen). Vesikelpufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 2 mM  $\beta$ -ME, pH 7.

Das H<sub>v</sub>1-Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa wurde, wie das SDS-Gel und der zugehörige Western Blot (siehe Abbildung 4-13 B und C) übereinstimmend belegen, nur in den oberen drei Fraktionen (N1–N3) lokalisiert. Diese besitzen eine Dichte, welche der des Puffers entspricht. Die vierte sowie die achte Fraktion, welche am Boden entnommen wurde, enthalten kein Protein. Proben des dialysierten H<sub>v</sub>1-Proteins (vgl. Abbildung 4-9, Fraktion D1-5) dienen als Referenz (C1–C4, 0.75, 1.5, 3.0 und 6.0  $\mu$ g). Sie weisen im Kontrast zu den Proben rekonstituierten Proteins Verunreinigungen im Bereich von 10–15 kDa auf. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die Konzentration der Verunreinigungen unterhalb der Detektionsgrenze liegt oder eine Insertion dieser Proteinteilfragmente in die Membran ausbleibt.

Mit Hilfe der Software *ImageJ* und dem Tool *Analyzer* → *Gel* wurde die Intensität der SDS-Banden, anhand der Flächen unterhalb des Intensitätsprofil bestimmt. Aus der Korrelation des Proteingehalts der Referenzproben (0.75, 1.5, 3.0 und 6.0  $\mu\text{g}$ ) und deren Intensität wurde eine Kalibrationskurve erstellt (siehe Abbildung 4-14). Anhand dieser wurde die Menge des rekonstituierten Proteins und somit die Rekonstitutionseffizienz ermittelt. Diese betrug 56 % der eingesetzten Masse. Das tatsächliche Protein-zu-Lipid-Verhältnis muss somit von nominal 1:9700 ( $n/n$ ) auf 1:17300 ( $n/n$ ) korrigiert werden. Im Folgenden werden daher die Protein-zu-Lipid-Verhältnisse unter Berücksichtigung der Korrektur angegeben.

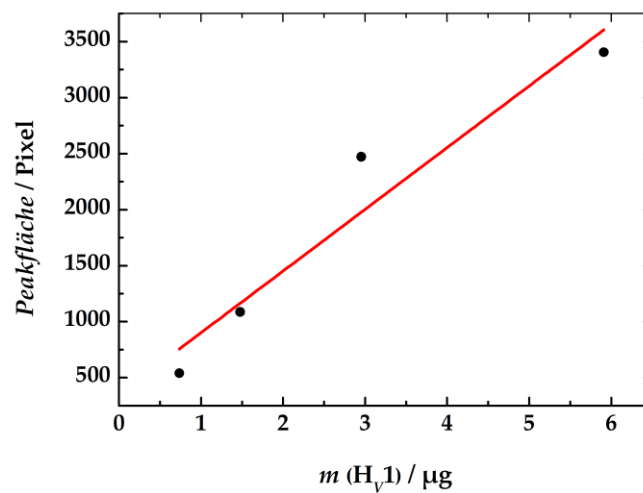


Abbildung 4-14: Kalibrationskurve der Peakflächen der  $\text{Hv}1$ -Referenzproben. Die lineare Anpassung der Datenpunkte für Proteinmengen von 0.75, 1.5, 3.0 und 6.0  $\mu\text{g}$  ermöglichte die Bestimmung der Menge des rekonstituierten  $\text{Hv}1$ .

Um im späteren Verlauf der Arbeit aus dem Protein-zu-Lipid-Verhältnis auf die Anzahl der  $\text{Hv}1$ -Proteine pro Vesikel schließen zu können, wurde zunächst die mittlere Vesikelgröße durch Messung der dynamischen Lichtstreuung bestimmt. Diese wurde freundlicherweise von Christian Roßner in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Vana (Institut für physikalische Chemie an der Georg-August-Universität Göttingen) durchgeführt. Die Messung erfolgte durch ein Zetasizer Nano S mit einem Laser der Wellenlänge 633 nm. Hierbei wurden Vesikel der Lipidzusammensetzung POPC/POPG/Chol (55:25:20) mit einem Protein-zu-Lipidverhältnis von 1:17300 ( $n/n$ ) untersucht. Die Analyse der Daten ergab, dass die Vesikel einen mittleren Durchmesser von 100 nm (Halbwertsbreite 150 nm) besitzen (siehe Abbildung 4-15).

## Ergebnisse

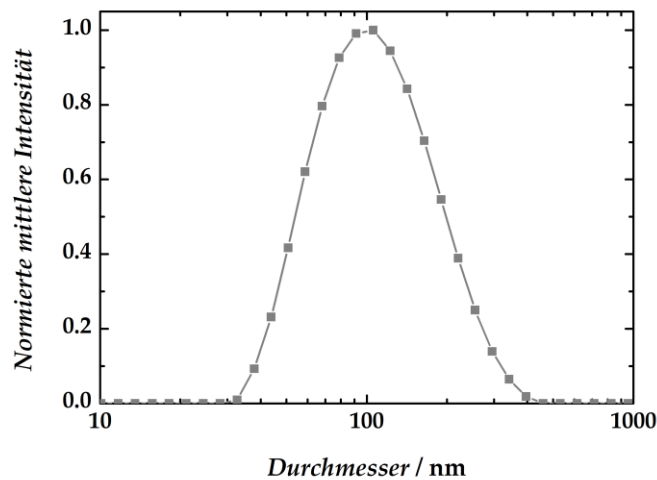


Abbildung 4-15: Bestimmung der Verteilung der Durchmesser der Proteoliposomen durch dynamische Lichtstreuung. Für Proteoliposomen der Lipidzusammensetzung POPC/POPG/Chol (55:25:20) konnte bei einem vorliegenden Protein-zu-Lipidverhältnis von 1:17300 ( $n/n$ ) ein mittlerer Durchmesser von 100 nm (Halbwertsbreite 150 nm) bestimmt werden.

Aus der Kenntnis des Vesikeldurchmessers und dem vorliegenden Protein-zu-Lipid-Verhältnis kann die Anzahl der in der Vesikelmembran insertierten  $H_V1$ -Proteine berechnet werden (siehe Anhang Kapitel 8.3). Unter der Annahme, dass die Rekonstitution mit einem realen Protein-zu-Lipid-Verhältnis von 1:17300 ( $n/n$ ) in Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von 100 nm erfolgt, liegen pro Proteoliposom etwa fünf  $H_V1$ -Kanäle im Mittel vor.

### 4.2.2 ACMA basierten Protonenfluss-Test

Die funktionelle Rekonstitution des Proteins des spannungsgesteuerten Protonenkanal  $H_V1$  ist grundlegend für dessen weitere elektrophysiologische Charakterisierung sowie der Erforschung geeigneter Inhibitoren bzw. Aktivatoren. In Rahmen dieser Arbeit wurde die Rekonstitution in einem zweistufigen Prozess nach dem Prinzip der direkten Insertion durchgeführt. Hierfür wurden zunächst unilamellare Vesikel mittels Ultraschall-Methode gebildet, in welche anschließend das Protein, vermittelt durch ein Detergens, integriert. Die Funktion des Kanals wurde anschließend mittels eines 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin (ACMA) Fluorophor-basiertem Protonen Fluxtest untersucht. Der Erfolg der Rekonstitution soll im Folgenden anhand der Ergebnisse des Fluxtests und dem hieraus bestimmten Anteil an Proteoliposomen beurteilt werden. Dieser korreliert nach der Arbeit von Lee *et al.* mit der maximalen Löschung der normierten Intensität, welche anhand der Gleichung 4-3 aus den Rohdaten (siehe Abbildung 4-16) berechnet wird.<sup>[1]</sup>

$$I_{\text{norm}} = \frac{I_t - I_{\text{min}}}{I_{\text{max}} - I_{\text{min}}} \quad 4-3$$

Hierbei ist  $I_t$  die gemessene Intensität des Fluorophors zum Zeitpunkt  $t$ ,  $I_{\text{max}}$  die maximale Intensität nach der Zugabe von Valinomycin (siehe rote Markierung Abb. 4-12) und  $I_{\text{min}}$  die minimale Intensität nach Injektion des Protonophors CCCP (siehe blaue Markierung Abb. 4-12).

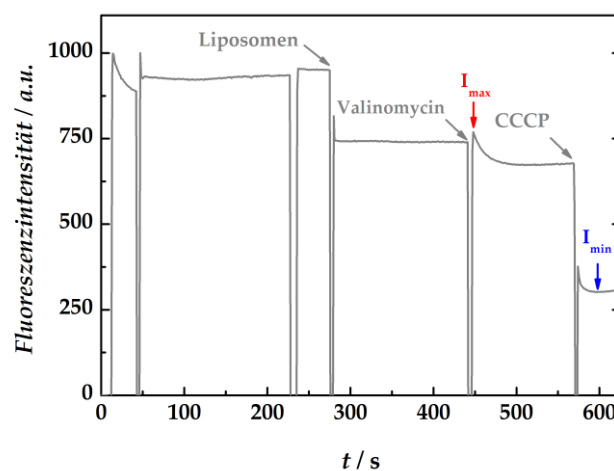


Abbildung 4-16: Exemplarischer ACMA (2.3  $\mu\text{M}$ ) basierter Fluxtest des Protonenkanals  $H_V1$  in kleinen unilamellaren Vesikeln bestehend aus POPC/POPG (75:25). Das Protein-zu-Lipid-Verhältnis betrug hierbei 1:9500 ( $n/n$ ). Dargestellt sind die Rohdaten der Fluoreszenzintensitäten. Die Zugabe des Fluorophors ( $t = 10$  s) in den Puffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 0.2 mM EDTA; pH 7) resultiert in einer sprunghaften Zunahme der Fluoreszenzintensität. Auf die Injektion des Kaliumionophors Valinomycin (12.9 nM) folgt ein geringer Anstieg der Fluoreszenz, dessen Maximum den  $I_{\text{max}}$ -Wert markiert, im Anschluss daran kann eine exponentielle Löschung der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Der Intensitätswert nach abschließender Zugabe des Protonophors CCCP (5.8 nM) definiert die minimale Intensität ( $I_{\text{min}}$ ). Die Fluoreszenz von ACMA wurde detektiert bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 410/490$  nm. Extravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 0.2 mM EDTA; pH 7. Intravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 2 mM  $\beta$ -ME pH 7.

Anhand der in Abbildung 4-16 dargestellten Rohdaten soll der generelle Verlauf eines ACMA basierten Fluxtests erläutert werden. Im Anschluss an die Zugabe des ACMA Fluorophors ( $t = 10$  s) sinkt die Intensität zunächst auf Grund der thermischen Äquilibration leicht ab. Die Zugabe der Proteoliposomen, wie auch einfacher Liposomen, resultiert in einer deutlichen, sprunghaften Reduktion der Intensität. Diese ist nicht auf Verdünnungseffekte zurückzuführen. Vielmehr verursacht die Insertion des ACMA Fluorophors in der Membran, auf Grund seiner hydrophoben Eigenschaft, die Löschung der Fluoreszenz.<sup>[133,134]</sup> Im Fall der funktionellen Rekonstitution des  $H_V1$ -Proteins, kann nach der



## Ergebnisse

Valinomycin Injektion ( $t = 600$  s) ein kleiner Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden, dessen Maximum definiert den  $I_{\max}$  Wert. Ein ähnliches Phänomen beobachteten Okamoto *et al.* nach der Zugabe von Valinomycin zu ATPase-Proteoliposomen, im Rahmen der Durchführung eines ACMA basierten Fluxtests.<sup>[176]</sup> Die Ursache des Anstiegs liegt wahrscheinlich in einer unspezifischen direkten oder indirekten Wechselwirkung des ACMA mit dem Valinomycin. Denkbar ist zum Beispiel eine Protonenverdrängung von der Vesikeloberfläche während der Insertion des Valinomycin, hierdurch würde der pH-Wert an der Oberfläche steigen und die Fluoreszenzlösung sinken. Der Valinomycin induzierte Kaliumausstrom entlang des Gradienten und der damit verbundenen Änderung der Membranspannung resultiert in einer Öffnung des Protonenkanals. Hieraus resultiert eine begünstigte Protonentranslokation, welche negative Überschussladung im Vesikelinneren entgegen wirkt und die Protonierung des Fluorophors induziert. Dies lässt sich anhand einer exponentiellen Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachten. Im Kontrast hierzu wurde für den unspezifischen Protoneneinstrom in Blindvesikel, d. h. Liposomen ohne  $H_V1$ , eine deutlich langsamer und linear verlaufende Fluoreszenzlösung ermittelt (siehe Abbildung 4-17). Nach dem ein stabiles Intensitätsniveau erreicht wurde, wird durch die abschließende Zugabe des Protonophors CCCP die minimale Intensität ( $I_{\min}$ ) ermittelt. Der Protonophor leitet den spezifischen Einstrom von Protonen in Blindvesikel ein.  $I_{\min}$  korreliert mit dem maximalen Anteil an ACMA, welches innerhalb der gesamten Vesikelpopulation gequenchet werden kann. Ähnliche Verläufe des Protonenfluss-Tests auf ACMA Basis wurden bereits in der Literatur beschrieben.<sup>[1,79]</sup>

Wurde während der Zugaben die Geräteabdeckung geöffnet werden, so wurde die Datenaufnahme automatisch gestoppt. Hieraus resultieren innerhalb der Spektrums Bereiche in denen die Intensität plötzlich unter null sinkt.

### 4.2.3 Nachweis der Rekonstitution des $H_V1$ -Kanals in vorgefertigte kleine unilamellare Vesikel

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Gregor Psotta wurde eine erste Rekonstitution des  $H_V1$ -Protonenkanals in kleine unilamellare Vesikel der Lipidzusammensetzung POPC/POPG (75:25) untersucht. Hierbei wurde  $H_V1$  in einem Protein-zu-Lipid-Verhältnis von etwa 1:4300 ( $n/n$ ) eingesetzt. Exemplarische Ergebnisse der Messungen des ACMA basierten Protonenfluss Tests von Proteoliposomen (schwarze Kurve) als auch der Blindproben (rote Kurve), sind als Verlauf der normierten Fluoreszenzintensität (siehe Gleichung 4-3 ) nach Zugabe von Valinomycin ( $t = -2$  s) in Abbildung 4-17 dargestellt. In beiden Fällen folgt direkt auf die Zugabe des Kaliumionophors ein sprunghafter Anstieg der Fluoreszenzintensität, nach etwa 2 s ist die maximale Intensität von 1 ( $t = 0$  s) erreicht. Im Fall der funktionellen Proteoliposomen schließt sich eine exponentielle Abnahme, auf Grund der Kanal



vermittelten Protonentranslokation, an. Diese erreicht nach etwa 60 s ein stabiles Niveau bei 80 %. Hieraus resultiert nach von Lee *et al.* ein Anteil intakter Proteoliposomen an der Gesamtheit der Vesikel von 20 %. Erst durch Zugabe des Protonophors CCCP, welcher den Protoneneinstrom in proteinlose Vesikel ermöglicht, wird die Fluoreszenzintensität auf das Minimum von null gesenkt. Die Intensität der Blindvesikel (Blindprobe) folgt einem deutlich differenzierten, linearen Verlauf und erreicht nach 60 s lediglich einen Wert von 95 %. Somit findet in den Liposomen, innerhalb von 60 s, eine unspezifische Protonentranslokation statt, welche die 5%ige Löschung der Fluoreszenz zur Folge hat. Eine Sättigung konnte auch innerhalb von 300 s nicht beobachtet werden.

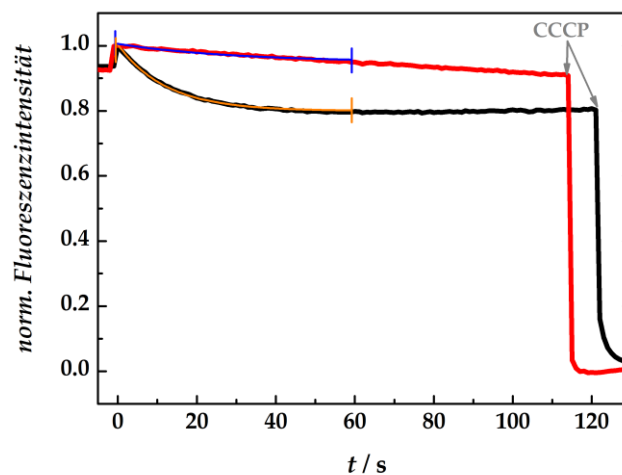


Abbildung 4-17: Relative Änderungen der normierten Fluoreszenzintensitäten eines ACMA ( $2.3 \mu\text{M}$ ) basierten Protonen-Fluxtests. Das Protein-zu-Lipid-Verhältnis der Rekonstitution in Liposomen bestehend aus POPC/POPG (75:25) betrug 1:7600 (n/n). Innerhalb der Proteoliposomen (schwarz) wird durch die Valinomycinzugabe ( $12.9 \text{ nM}$ ,  $t = -2 \text{ s}$ ), wie zuvor beschrieben, eine exponentielle Fluoreszenzlöschung induziert. Durch eine exponentielle Anpassung der Daten der ersten 60 s, wurde eine 21%iger Abnahme (Beginn bei  $t = 0 \text{ s}$ ) ermittelt (siehe Gleichung 4-4). Die Konstante  $k$  hierbei betrug  $-0.082 \text{ s}^{-1}$ . Für die Blindprobe (rot) wurde nach 60 s eine Restintensität von 95 % bestimmt. Eine Sättigung der Abnahme konnte jedoch über den gesamten Zeitraum der Detektion nicht ermittelt werden. Extravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 0.2 mM EDTA, pH 7. Intravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 2 mM  $\beta$ -ME, pH 7. Die Fluoreszenz von ACMA wurde detektiert bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 410/490 \text{ nm}$ .

Die Beurteilung der Effizienz der verschiedenen Rekonstitutionen wie auch die Quantifizierung der Proteineigenschaften, zu der u. a. die Inhibition und Temperaturabhängigkeit der Protonentranslokation zählen, soll im Folgenden auf Grundlage der Verläufe der normierten Fluoreszenzintensitäten erfolgen. Zu diesem Zweck werden zwei Parameter aus den Graphen extrahiert. Ausgehend von einem idealen exponentiellen Verlauf wird zum einen wird die prozentuale Abnahme ( $A_p$ ) bis zum Erreichen eines

## Ergebnisse

Plateaus manuell ausgelesen. Zum anderen wird eine exponentielle Abnahme der Gleichung 4-4 an die Daten angepasst.

$$I_{\text{norm}}(t) = I_p + A_p * e^{(k*t)} \quad 4-4$$

$$\tau_{1/2} = -\frac{\ln(2)}{k} \quad 4-5$$

Hierbei entspricht  $I_{\text{norm}}$  der normierten Intensität zum Zeitpunkt  $t$ .  $A_p$  entspricht der Amplitude des negativen exponentiellen Wachstums. Die Konstante  $k$  ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Intensitätsabnahme und somit auch für die hierfür ursächliche Protonentranslokation. Aus ihr kann die Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$  bestimmt werden (siehe Gleichung 4-5).  $I_p$  beschreibt die Achsenverschiebung parallel zur x-Achse. Sie entspricht der restlichen prozentualen Intensität, welche nach der Zugabe des Kaliumionophors und dem Abklingen der Fluoreszenzlöschung erreicht wird. Aus der Normierung der Daten folgt somit, dass  $I_p + A_p = 1$ . Wie Abbildung 4-17 zeigt, wird eine Sättigung der Fluoreszenzlöschung innerhalb von 60 s nach der Injektion des Valinomycin erreicht. Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei der Rekonstitution in Vesikel anderer Lipidzusammensetzungen sowie den Studien zur Inhibition des Kanals beobachtet. Der Zeitraum ist somit ausreichend um den exponentiellen Verlauf widerzuspiegeln und wird daher selektiv bei der anschließenden Auswertung berücksichtigt. Die korrespondierenden  $A_p$  und  $I_p$  Werte werden daher im Folgenden als  $A_{60}$  bzw.  $I_{60}$  betitelt. In den übrigen Fällen wurde der Zeitraum der Auswertung entsprechend verlängert (siehe Abschnitt 4.2.5 und 4.2.9). Nach Lee *et al.* ist der Anteil an Proteoliposomen, welche eine Proteinaktivität zeigen, mit dem  $A_p$ -Wert gleich zu setzen.

Die Anpassungen der zugehörigen Daten sind in Abbildung 4-17 blau bzw. orange dargestellt und liegen mit den experimentellen Kurvenverläufen weitgehend übereinander. Es konnte für die Proteoliposomen mit  $I_{60} = 0.79$  ein  $A_{60}$ -Wert von 0.21 bestimmt werden. Dies entspricht einer Abnahme der Fluoreszenzintensität von 21 % innerhalb der ersten 60 s und lässt somit einen Proteoliposomenanteil von 21 % schließen. Die Konstante hierbei betrug  $-0.082 \text{ s}^{-1}$  und korrespondiert mit einer Halbwertszeit von 8.45 s. Dieser Wert kann ebenfalls nach der, aus Gleichung 4-6 abgeleiteten Definition, aus der Abbildung 4-17 abgelesen werden.

$$A(\tau_{1/2}) = A_p/2 \quad 4-6$$

$A(\tau_{1/2})$  gibt hierbei die Intensitätsabnahme nach der Halbwertszeit an und stimmt mit der Hälfte des  $A_p$ -Wertes überein. Für die Blindprobe wurde ebenfalls eine Anpassung durchgeführt. Die Konstante bzw. Halbwertszeit in dem oben gezeigten Fall betrug  $-0.034 \text{ s}^{-1}$  bzw. 20.4 s. Da die Abnahme in diesem Fall nicht exponentiell erfolgte und somit kein

konstantes Minimum erreicht wird, stimmt die theoretische Anpassung der Daten an Gleichung 4-4 nicht mit den zugrundeliegenden experimentellen Daten überein. Die Halbwertszeit soll daher basierend auf Gleichung 4-6 ermittelt werden. Ausgehend von einem linearen Verlauf und der Annahme, dass die Fluoreszenzlöschung innerhalb der Blindvesikel zu 100 % erfolgt, gilt das  $\tau_{1/2}$  vorliegt wenn eine Restintensität von 50 % vorliegt. Wann dieser Zeitpunkt eintritt kann anhand der negativen Steigung extrapoliert werden. Hierzu wird die Annahme getroffen, dass wenn nach 1 min 5 % der Intensität gelöscht wurden, werden 50 % Intensität nach  $\tau_{1/2} = 600$  s erreicht. Im Vergleich zu Proteoliposomen erfolgt die Löschung der Fluoreszenz daher um einen Faktor 71 verlangsamt. Der  $A_{60}$ -Wert von 5 % korreliert hierbei naturgemäß nicht mit dem Anteil an Proteoliposomen, sondern kann als ein Maß für die Dichtigkeit bzw. unspezifische Protonendurchlässigkeit der Blindvesikel betrachtet werden.

Erste systematische Studien zur Rekonstitutionseffizienz wurden u. a. im Rahmen der Bachelorarbeit von Gregor Psotta und einem Abteilungspraktikum von Kristina Kramer durchgeführt. Hierbei wurden die vorgefertigten Vesikel während der Rekonstitution eine Stunde mit Detergens und drei Stunden mit Protein inkubiert. Das verwendete  $H_V1$  Protein wurde mittels 0.5 % DDM (in 50 mM HEPES, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH7.4) aus *E. coli*-Zellen isoliert.

Die Ergebnisse des Anteils der aktiven Proteoliposomen der durchgeführten Rekonstitutionen und deren Fehler sind in Abhängigkeit der Lipidzusammensetzung in Abbildung 4-18 dargestellt.

## Ergebnisse

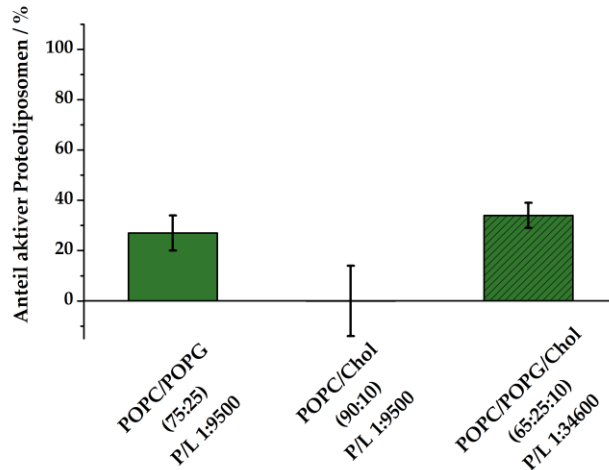


Abbildung 4-18: Ergebnisse für  $A_{60}$  nach exponentieller Anpassung der Daten der ACMA basierten Flusstests, zum Nachweis der erfolgreichen Rekonstitution aktiven  $H_v1$ -Proteins. Für Proteoliposomen der Lipidzusammensetzung POPC/POPG (75:25, P/L = 1:9500 ( $n/n$ )) konnte ein Anteil aktiven Proteins von  $27 \pm 7$  % (5 Präparationen, N = 10) bestimmt werden. Rekonstituierte POPC/Chol (90:10; P/L = 1:9500 ( $n/n$ )) Vesikel zeigten nach Zugabe von Valinomycin einen Anstieg der Fluoreszenz, demnach wird der Anteil der Proteoliposomen als durch einen Betrag von  $0.0 \pm 14$  % (3 Präparationen, N = 7) dargestellt. Die Kombination der Lipide in einem Verhältnis von POPC/POPG/Chol (65:25:10, P/L = 1:34600 ( $n/n$ )) lieferte einen Proteoliposomenanteil von  $34 \pm 5$  % (3 Präparationen, N = 5). Die Fluoreszenz von ACMA wurde detektiert bei  $\lambda_{ex/em} = 410/490$  nm. Fluxpuffer Zusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 0.2 mM EDTA; pH 7. Vesikelpuffer Zusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 2 mM  $\beta$ -ME pH 7.

Der Anteil an Proteoliposomen konnte ausgehend von POPC/POPG (75:25, 5 Präparationen, N = 12) mittels der Substitution von 10 mol% POPC durch Cholesterin von  $27 \pm 7$  % auf  $34 \pm 5$  % (6 Präparationen, N = 13) gesteigert werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass unterschiedliche Protein-zu-Lipid-Verhältnisse von 1:9500 ( $n/n$ ) bzw. 1:34600 ( $n/n$ ) vorlagen. Bei dem Einsatz der 3.6-fachen Proteinmenge bei der Rekonstitution in POPC-Chol-Vesikel, wäre bei gleichbleibender Rekonstitutionseffizienz ein, gegenüber POPC/POPG/CHOL-Vesikeln, gesteigerter Proteoliposomenanteil zu erwarten. Da dieser nicht vorliegt, ist anzunehmen, dass die Rekonstitution in Chol-haltige Liposomen begünstigt ist. Messungen des fluoreszenzbasierten Fluxtests, welche im Anschluss an die Rekonstitution in Vesikel der Zusammensetzung POPC/Chol (90:10) durchgeführt wurden, zeigten keinen exponentiellen Zerfall. Es konnte teilweise sogar ein Anstieg der Fluoreszenz von bis zu 5 % detektiert werden. Dieser kann auf einen unspezifischen Protonenausstrom oder Schwankungen in der lokalen Protonenkonzentration in der Nähe der Membranoberfläche zurückzuführen sein. Letztere resultiert aus dem Fehlen von negativ geladenen Lipiden in der Membran. Da in allen Fällen ein linearer Verlauf (Anstieg bzw. Abfall) der Fluoreszenzintensität vorliegt, ist die exponentielle Datenanpassung zur genauen Beschreibung ungeeignet. Dies führt zu einem relativ großen Fehler von 14 % (3 Präparationen, N = 7).

Das Protein, welche bei den Studien zur weiteren Optimierung der Rekonstitutionseffizienz eingesetzt wurde, wurde mittels des in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen SDS-Protokolls isoliert. Die Ergebnisse des gemittelten  $A_{60}$ -Wertes bzw. der Anteil der Aktivität zeigenden Proteoliposomen ist in Abbildung 4-19 dargestellt.

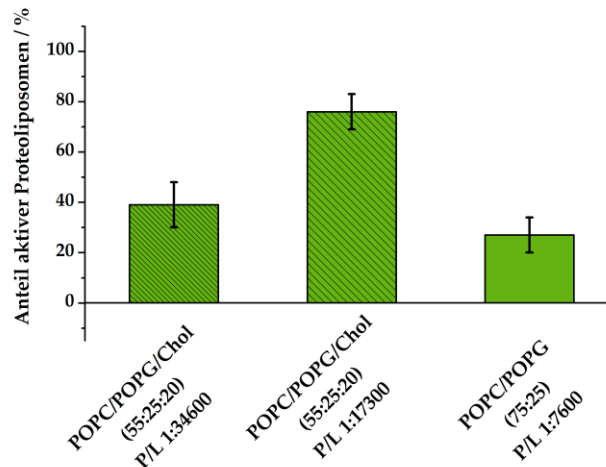


Abbildung 4-19: Ermittelte Anteile der Proteinaktivität aufweisenden Liposomen. Für Proteoliposomen der Lipidzusammensetzung POPC/POPG/Chol (55:25:20, P/L = 1:34600 ( $n/n$ )) konnte ein Anteil der Proteoliposomen von  $39 \pm 8$  % (4 Präparationen, N = 13) bestimmt werden. Bei einem verringerten Protein-zu-Lipid-Verhältnis von 1:17300 ( $n/n$ ) wurde ein erhöhter Proteoliposomenanteil von  $76 \pm 7$  % (6 Präparationen, N = 11) ermittelt. Für Liposomen der Zusammensetzung POPC/POPG (75:25; P/L = 1:7600 ( $n/n$ )) wurde trotz gesenktem Protein-zu-Lipid-Verhältnis ein proteinhaltiger Anteil von  $27 \pm 7$  % (3 Präparationen, N = 6) festgestellt. Extravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 0.2 mM EDTA, pH 7. Intravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 2 mM  $\beta$ -ME, pH 7. Die Fluoreszenz von ACMA wurde detektiert bei  $\lambda_{ex/em} = 410/490$  nm.

Ein Vergleich mit den Daten, welche im Rahmen vorangegangener Arbeiten ermittelt wurden (siehe Abbildung 4-18) zeigt, dass die Erhöhung des Cholesterin-Anteils in den Vesikeln keine signifikante Änderung des Proteoliposomenanteil bewirkt hat. Dieser liegt bei einer Lipidzusammensetzung von POPC/POPG/Chol (55:25:20) und einem Protein-zu-Lipid-Verhältnis von 1:34600 ( $n/n$ ) bei  $39 \pm 8$  % (4 Präparationen, N = 13). Aus der Verdopplung der Proteinmenge konnte der Anteil auf  $76 \pm 7$  % (6 Präparationen, N = 11) ebenfalls nahezu verdoppelt werden. Eine weitere Erhöhung des Proteingehalts während der Rekonstitution in vorgefertigte Vesikel der Zusammensetzung POPC/POPG (75:25) resultierte jedoch nicht in einem Anstieg des Proteoliposomengehaltes. Dieser blieb bei unveränderten  $27 \pm 7$  % (3 Präparationen, N = 6). Dies deutet auf eine Sättigung hin.

Um die Güte dieser Werte abschätzen zu können, ist es notwendig die korrespondierenden Blindproben zu beachten, wobei auf die Auswertung der Lipidmischung POPC/Chol verzichtet wurde. Der Wert von  $A_{60}$  kann hierbei als Maß für den Leckstrom betrachtet werden, da eine Fluoreszenzlöschung, wie sie in Abbildung 4-17 zu beobachten ist, auf den unspezifischen Einstrom von Protonen zurückgeführt werden kann. Die gemittelten

## Ergebnisse

Ergebnisse sind in Abbildung 4-20 aufgeführt. So wurden für Vesikel der Lipidmischung POPC/POPG (75:25) Abnahmen der Intensitäten von  $9 \pm 8 \%$  (3 Präparationen,  $N = 5$ ) sowie  $18 \pm 3 \%$  für POPC/POPG/CHOL (65:25:10) (3 Präparationen,  $N = 5$ ) und  $12 \pm 6 \%$  POPC/POPG/Chol (55:25:20) (4 Präparationen,  $N = 8$ ) ermittelt. Bei diesen Blindproben wurde die Dialyse zur Entfernung des Detergens über Nacht durchgeführt. Es wurde vermutet, dass die Blindströme auf den Detergens vermittelten Einstrom von Protonen zurückzuführen sind.<sup>[177]</sup> Eine Verlängerung der Dialysedauer um einen Tag sollte die restliche Detergenmenge reduzieren und führte zu einer Verringerung der prozentualen Löschung auf  $5 \pm 1 \%$  für POPC/POPG-Vesikel (75:25; 3 Präparationen,  $N = 4$ ) bzw.  $7 \pm 2 \%$  für POPC/POPG/Chol-Liposomen (55:25:20; 6 Präparationen,  $N = 8$ ). Die Ergebnisse liegen daher in Einklang mit den Erwartungen.

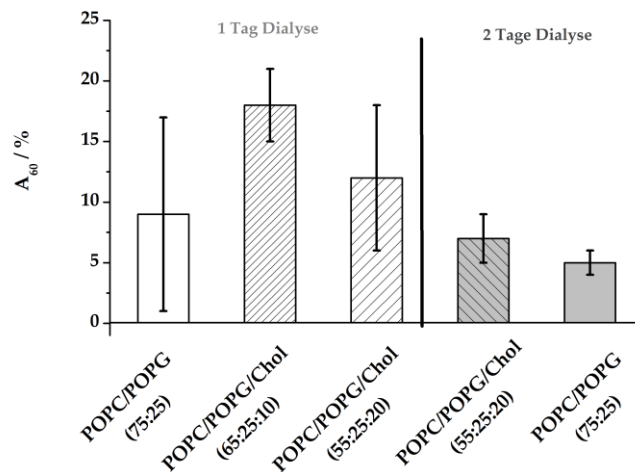


Abbildung 4-20: Gemittelter  $A_{60}$ -Wert der ACMA basierten Fluxtests der Blindproben. Für Liposomen der Lipidzusammensetzung POPC/POPG (75:25) resultiert der unspezifische Protoneneinstrom in einer Fluoreszenzlöschung von  $9 \pm 8 \%$  (3 Präparationen,  $N = 5$ ). Die Vesikel mit einem Lipidverhältnis von POPC/POPG/Chol (65:25:20) weisen eine ähnliche Intensitätsabnahme von  $18 \pm 3 \%$  (3 Präparationen,  $N = 5$ ) auf. Für POPC/POPG/Chol-Liposomen (55:25:20) wurde eine Löschung von  $12 \pm 6 \%$  (4 Präparationen,  $N = 8$ ) ermittelt. Bei verlängerter Dialysedauer sinkt diese auf  $7 \pm 2 \%$  für POPC/POPG/Chol (55:25:20) (6 Präparationen,  $N = 8$ ) bzw.  $5 \pm 1 \%$  (3 Präparationen,  $N = 4$ ) für POPC/POPG (75:25). Extravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 0.2 mM EDTA, pH 7. Intravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 2 mM  $\beta$ -ME, pH 7. Die Fluoreszenz von ACMA wurde detektiert bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 410/490$  nm.

Davon ausgehend, dass jeder Protonenkanal die Protonentranslokation mit einer konstanten Geschwindigkeit durchführt, kann aus einer Veränderung der Konstanten  $k$  auf eine Änderung des Gehalts funktionell rekonstituierter Kanäle geschlossen werden. Dies ist somit ein weiterer Faktor, der bei der Beurteilung der Rekonstitution zu berücksichtigen ist. Auf Grund der besseren Vergleichbarkeit ist im Folgenden statt  $k$  die Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$  angegeben.

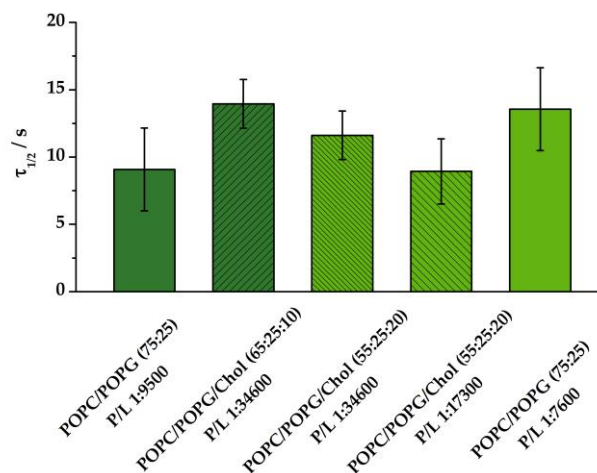


Abbildung 4-21: Gemittelte Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$  der ACMA basierten Fluxtests. Proteoliposomen der Lipidzusammensetzungen POPC/POPG (75:25, P/L = 1:9500 ( $n/n$ )) weisen eine exponentielle Abnahme mit Halbwertszeiten von  $\tau_{1/2} = 9.1 \pm 3.1$  s (5 Präparationen, N = 10) bzw. von  $\tau_{1/2} = 14 \pm 2$  s (3 Präparationen, N = 5) für POPC/POPG/Chol-Vesikel (65:25:10, P/L = 1:34600 ( $n/n$ )). Für POPC/POPG/Chol-Proteoliposomen der Lipidzusammensetzung (55:25:20, P/L = 1:19500 ( $n/n$ )) konnte eine Halbwertszeit von  $\tau_{1/2} = 11.6 \pm 1.8$  s (4 Präparationen, N = 13) bestimmt werden. Bei einem verringerten Protein-zu-Lipid-Verhältnis von 1:17300 ( $n/n$ ) konnte eine Abnahme der Dauer auf  $\tau_{1/2} = 8.9 \pm 2.4$  s (6 Präparationen, N = 11) beobachtet werden. Für Liposomen der Zusammensetzung POPC/POPG (75:25; P/L = 1:7600 ( $n/n$ )) wurde trotz gesenktem Protein-zu-Lipid-Verhältnis eine Halbwertszeit von  $\tau_{1/2} = 13.6 \pm 3.1$  s (3 Präparationen, N = 6) festgestellt. Extravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 0.2 mM EDTA, pH 7. Intravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 2 mM  $\beta$ -ME, pH 7. Die Fluoreszenz von ACMA wurde detektiert bei  $\lambda_{ex/em} = 410/490$  nm.

Die in Abbildung 4-21 aufgeführten Halbwertszeiten der exponentiellen Fluoreszenzlöschungen, entstammen Datensätzen, welche ebenfalls der Abbildung 4-18 und der Abbildung 4-19 zugrunde liegen. POPC/POPG Proteoliposomen der Mischung 75:25 besitzen eine Halbwertszeit zwischen  $9.1 \pm 3.1$  s (P/L = 1:9500 ( $n/n$ )) und  $13.6 \pm 3.1$  s (P/L = 1:7600 ( $n/n$ )). Die Abnahmen der Proteoliposomen der Zusammensetzung POPC/POPG/Chol (65:25:10) und (55:25:20) weisen bei einem Protein-zu-Lipid-Verhältnis von 1:34600 ( $n/n$ ) ähnliche Werte von  $\tau_{1/2} = 14 \pm 2$  s und  $\tau_{1/2} = 11.6 \pm 1.8$  s auf. Bei einer Erhöhung des Proteinanteils der Proteoliposomen auf 1:17300 ( $n/n$ ) sinkt  $\tau_{1/2}$  auf  $8.9 \pm 2.4$  s. Die Fluoreszenzlöschung der Blindproben erreicht ihre halbe Intensität, unter Berücksichtigung der  $A_{60}$ -Werte für Blindvesikel nach 2-tägiger Dialyse (siehe Abbildung 4-20), nach 385–545 s. Dies entspricht der in der Literatur beschriebenen Größenordnung.<sup>[1,79]</sup>

## Ergebnisse

### 4.2.4 Substitution von POPG gegen POPS

Neben den negativ geladenen POPG-Lipiden wurde auch POPS eingesetzt. Exemplarisch soll dies anhand einer Rekonstitution in Vesikel der Zusammensetzung POPC/POPX/Chol (55:25:20; X=S oder G; P/L = 1:34600 ( $n/n$ )) beschrieben werden. Die beiden in Abbildung 4-22 gezeigten normierten Fluoreszenzintensitäten des Fluxtests nach Valinomycinzugabe ( $t = 0$  s) zeigen einen ähnlichen Verlauf. Die maximale Löschung beträgt etwa 30 % und die exponentielle Anpassung der Daten liefert eine Halbwertszeit von 13.6 s (POPG) bzw. 10.8 s (POPS).

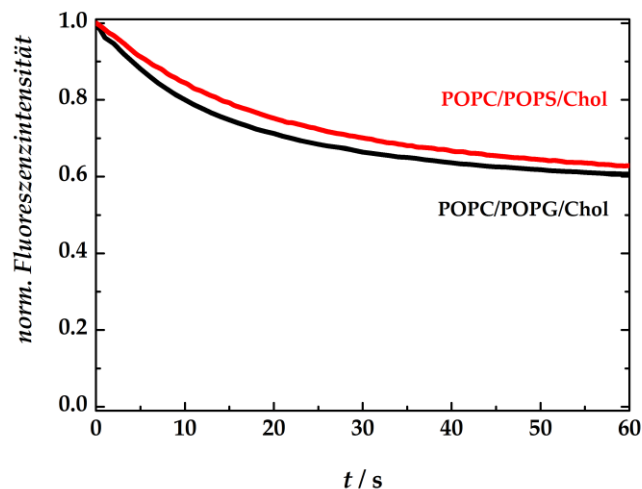


Abbildung 4-22: Normierte Fluoreszenzintensitäten des ACMA-Fluxtests an POPG bzw. POPS-haltigen Proteoliposomen. Die Rekonstitution in die Liposomen der Zusammensetzung POPC/POPX/Chol (55:25:20; X = S oder G) erfolgte in einem Protein-zu-Lipid-Verhältnis von 1:34600 ( $n/n$ ). Beide Präparationen weisen nach Valinomycin Injektion eine ähnliche Abnahme von etwa 30 % sowie eine Konstante von  $k = 0.051 \text{ s}^{-1}$  (POPG) bzw.  $k = 0.063 \text{ s}^{-1}$  (POPS) auf. Fluxpuffer Zusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 0.2 mM EDTA; pH 7. Vesikelpuffer Zusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 2 mM  $\beta$ -ME, pH 7. Die Fluoreszenz von ACMA wurde detektiert bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 410/490 \text{ nm}$ .

Zwischen den jeweils einfach negativ geladenen Lipiden besteht daher kein Unterschied in der Effizienz der Rekonstitution.

### 4.2.5 Variation des Protein-zu-Lipid-Verhältnisses

Systematische Studien zum Einfluss des Protein-zu-Lipid-Verhältnisses sollten zu einer Optimierung der Rekonstitution beitragen. Hierbei wurden Liposomen der Zusammensetzung POPC/POPX/Chol (55:25:20; X = S oder G) verwendet. Für die Untersuchung der Abhängigkeit der Rekonstitutionseffizienz wurde H<sub>v</sub>1 in Verhältnissen von 1:8700 ( $n/n$ ), 1:17300 ( $n/n$ ), 1:34600 ( $n/n$ ), 1:69200 ( $n/n$ ), 1:138400 ( $n/n$ ) und 1:276800 ( $n/n$ ) rekonstituiert.



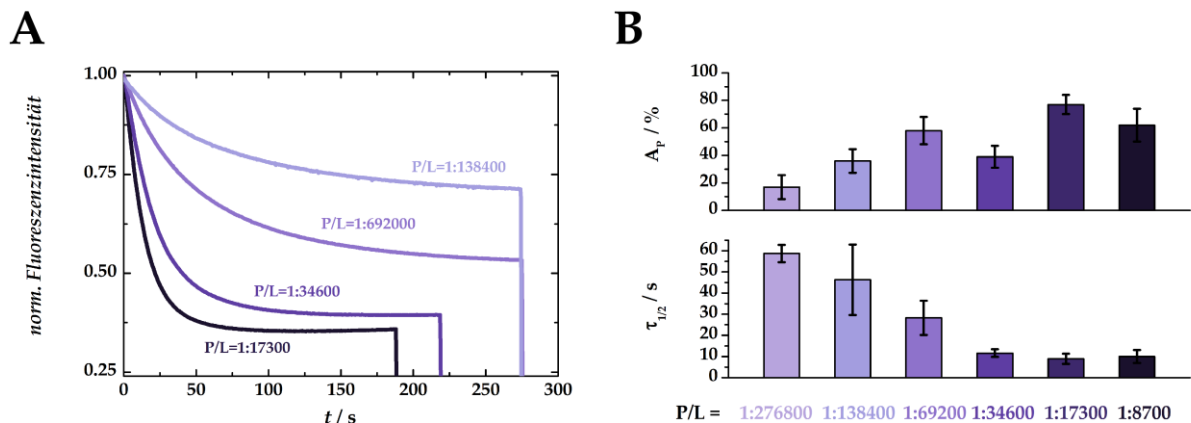


Abbildung 4-23: Einfluss des Protein-zu-Lipidverhältnisses auf die Rekonstitution von H<sub>v</sub>1 in POPC/POPX/Chol (X=S oder G, 55:25:20) Liposomen. (A) Anhand des Protonenfluss-Tests wird deutlich, dass die negative Steigung der exponentiellen Abfälle der normierten Fluoreszenzintensitäten mit den P/L-Verhältnissen der Proteoliposomen korreliert. (B) Aus der Datenanpassung wurde der A<sub>p</sub>-Wert sowie die exponentielle Halbwertszeit τ<sub>1/2</sub> bestimmt. Hierbei ist zu erkennen, dass eine Sättigung im Bereich von 1:4850 (*n/n*) und 1:9700 (*n/n*) erreicht wird. Extravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 0.2 mM EDTA, pH 7. Intravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 2 mM β-ME, pH 7. Die Fluoreszenz von ACMA wurde detektiert bei λ<sub>ex/em</sub> = 410/490 nm.

Die Verläufe des ACMA basierten Protonenfluss-Tests (siehe Abbildung 4-23 A) wurden wie zuvor, anhand der Parameter der prozentualen Abnahme sowie dessen Geschwindigkeitskonstante, analysiert. Bei den Präparationen mit einem hohen Proteinanteil (P/L = 1:4850 und 1:9700) wird nach einer exponentiellen Abnahme ein konstantes Intensitätsniveau bereits nach 30–50 s erreicht. In den übrigen Fällen wird dies erst nach über 200 s erzielt. Dennoch wurde auch hier ein Vergleich anhand der A<sub>p</sub>-Werte angestrebt. Mit zunehmenden H<sub>v</sub>1-Gehalt steigt der Proteoliposomenanteil von 17 ± 9 % (P/L = 1:276800 (*n/n*)) auf 36 ± 9 % (P/L=1:138400 (*n/n*)), 58 ± 10 % (P/L = 1:692000 (*n/n*)), 42 ± 7 (P/L = 1:34600 (*n/n*)) und erreicht bei P/L = 1:17300 (*n/n*) einen Wert von 76 ± 7 %. Dieser Wert konnte auch bei einem P/L = 1:8700 (*n/n*) und einem Wert von 62 ± 12 % (6 Präparationen, N = 12) nicht übertroffen werden. Durch eine Steigerung des Proteingehalts während der Rekonstitution konnte erwartungsgemäß der Proteoliposomenanteil gesteigert werden. Die zu den oben genannten Protein-zu-Lipid-Verhältnissen korrespondierenden Halbwertszeiten sind 10 ± 3.1 s, 8.9 ± 2.4 s, 11.6 ± 1.8 s, 28.3 ± 8.1 s, 46.3 ± 16.7 s und 58.7 ± 4.1 s (mit steigendem Protein-zu-Lipid-Verhältnis). Sie weisen im Bereich unterhalb eines P/L von 1:34600 (*n/n*) eine Sättigung auf und steigen oberhalb dieses Verhältnisses nahezu linear mit einem Faktor von 1.6 pro Halbierung des P/L. Ausgehend von einem sehr geringen Protein-zu-Lipid-Verhältnis von 1:276800 (*n/n*) steigt durch Erhöhung der Proteinkonzentration zunächst der Anteil an Proteoliposomen einer Rekonstitution sowie die Anzahl an Proteinen pro Vesikel an. Ab einem P/L von 1:34600 (*n/n*) bleibt die Halbwertszeit nahezu unverändert, lediglich der Proteoliposomenanteil steigt weiter an. Dies deutet darauf hin, dass eine maximale

## Ergebnisse

Anzahl an Kanälen pro Vesikel erreicht wurde und die Insertion des Kanals in weitere Liposomen erfolgt.

Für die Rekonstitutionen mit einem Protein-zu-Lipid-Verhältnis von 1:138400 ( $n/n$ ) und 1:69200 ( $n/n$ ) wurden die Daten aus 5 Messungen (2 Präparationen) gemittelt. Die Daten des nominal P/L = 1:276800 ( $n/n$ ) wurden aus drei Messungen einer Präparation erhalten. Jeweils 6 Präparationen und 11 bzw. 12 Messungen lagen den Daten der Messungen mit einem P/L = 1:17300 bzw. 1:8700 zugrunde. Die Daten der Proteoliposomen mit einem P/L = 1:34600 basierten auf 4 Präparationen und 13 Messungen.

### 4.2.6 Charakterisierung der 2-Guanidinbenzimidazol Inhibition des H<sub>v</sub>1-Kanals

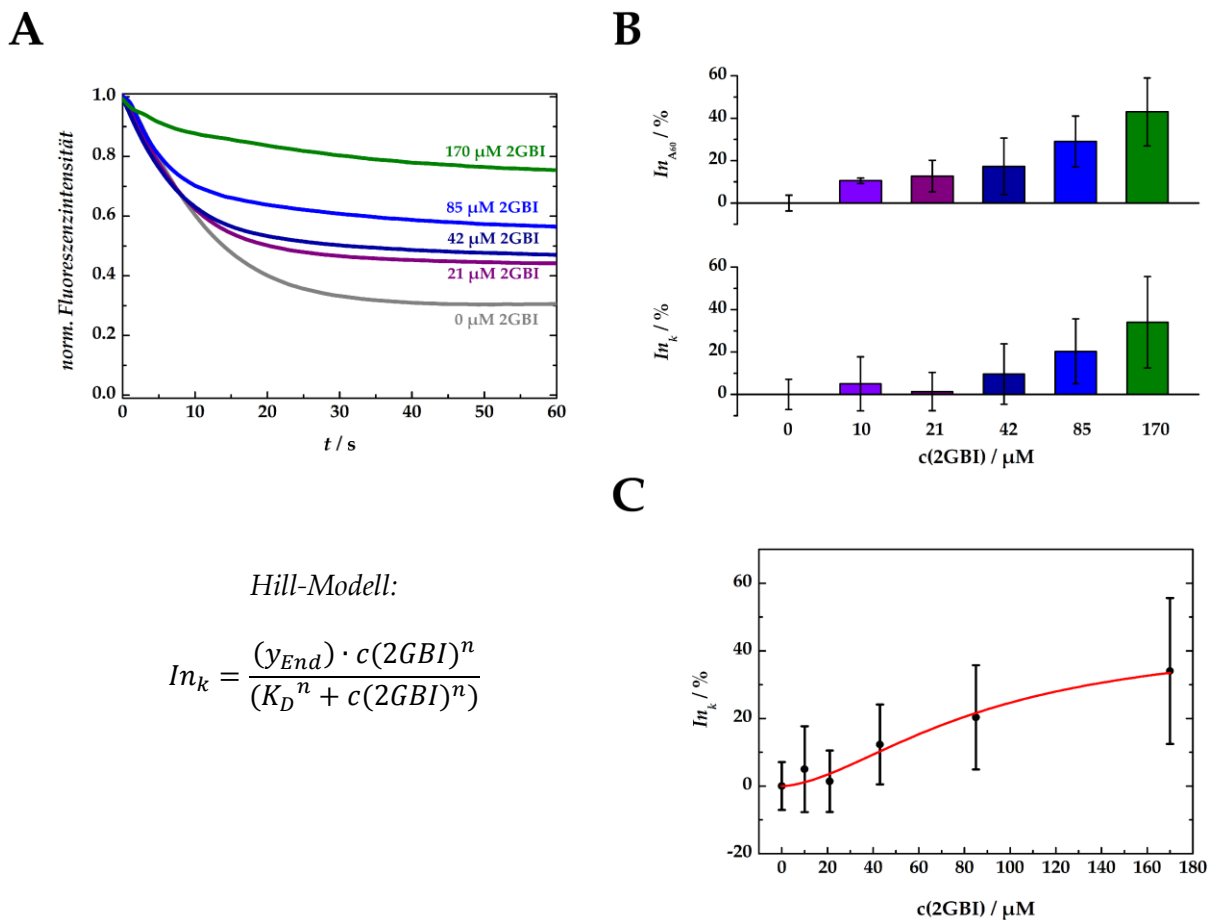
Auf Grund seiner vielfältigen physiologischen Bedeutung, ist der H<sub>v</sub>1-Protonenkanal ein möglicher Ansatzpunkt für Medikamente.<sup>[37]</sup> Die Inhibition des Kanals durch Guanidinderivate wie 2-Guanidinbenzimidazol (2GBI) sowie dessen Aktivierung durch Arachidonsäuren und deren Derivat Arachidonylethanolamid (AEA, Anandamid) wurden bereits in den letzten Jahren diskutiert.<sup>[2,66,93,99]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluss des bekannten Inhibitors 2GBI und des Aktivators AEA auf das rekombinante H<sub>v</sub>1-Protein untersucht werden. Parallel hierzu wird die Frage der Anwendbarkeit des Fluxtest für das *Screening* von möglichen Arzneimitteln beantwortet. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Studien zum Einfluss von 2GBI auf den Protonenkanal, welche auch im Rahmen der Bachelorarbeit von Rebecca Rixen durchgeführt wurden, vorgestellt. Hierbei wurden Proteoliposomen mit einem POPC- und einem Cholesteringehalt von 55 bzw. 20 mol% eingesetzt. Die verbleibenden 25 mol% der Zusammensetzung der Lipidfilme machten die negativ geladenen Lipide POPG oder POPS aus. Für jede der durchgeführten Präparationen wurden die Durchschnittswerte der Konstanten  $k$  und des normierten  $A_{60}$ -Wertes für Messungen ohne Inhibitor ermittelt. Auf dieser Grundlage wurden die relativen  $k$ - und  $A_{60}$ -Werte der Messungen unter Zusatz von 2GBI sowie die daraus resultierende prozentuale Inhibition ( $In_k$  bzw.  $In_{A_{60}}$ ) berechnet (siehe Gleichung 4-7 und 4-8).

$$In_k = 1 - \left( \frac{k_{2GBI}}{k} \right) \quad 4-7$$

$$In_{A_{60}} = 1 - \left( \frac{1 - I_{60,2GBI}}{1 - I_{60}} \right) = 1 - \left( \frac{A_{60,2GBI}}{A_{60}} \right) \quad 4-8$$

Hierbei entspricht  $k_{2GBI}$  der Konstanten des exponentiellen Abfalls, welche für den inhibierten Fall ermittelt wurde und  $k$  der gemittelten Konstanten der Messung ohne 2GBI. Analog entspricht  $I_{60,2GBI}$  der ermittelten Fluoreszenzintensität 60 s nach der Valinomycinzugabe im Fall der Messungen inkl. 2GBI. Der  $A_{60,2GBI}$ -Wert gibt den korrespondieren prozentualen Abfall nach 60 s wieder. Die  $I_{60}$  bzw.  $A_{60}$ -Werte repräsentieren

die Mittelwerte, welche aus den Tests ohne 2GBI, d. h. für die reinen Proteoliposomen dieser Präparation ermittelt wurden. Diese mittleren Werte für  $In_k$  bzw.  $In_{A60}$  sowie deren Fehler sind in Abbildung 4-24 B dargestellt.



Hill-Modell:

$$In_k = \frac{(y_{End}) \cdot c(2GBI)^n}{(K_D^n + c(2GBI)^n)}$$

Abbildung 4-24: Inhibition des  $H_v1$ -Kanals mittels 2GBI in POPC/POPS/Chol (55:25:20) Liposomen. (A) Normierte Fluoreszenzintensitäten in den ersten 60 s nach Valinomycinzugabe des Protonenfluss-Tests der Proteoliposomen (P/L = 1:25000 ( $n/n$ )). Sowohl der Anteil der Fluoreszenzlöschung, als auch dessen Geschwindigkeit, werden durch die erhöhte Konzentration des 2-Guanidinbenzimidazol verringert. (B) Die Inhibition des Kanals kann deutlich anhand der Abnahme und der Konstanten  $k$  der exponentiellen Fluoreszenzlöschung und des Anteils aktiver Proteoliposomen verfolgt werden. (C) Aus der Anpassung der Auftragung der Inhibition der Konstanten  $k$  mittels Hill-Modell konnte eine Dissoziationskonstante von  $88 \pm 64 \mu\text{M}$  bestimmt werden. Extravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 0.2 mM EDTA., pH 7 Intravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 2 mM  $\beta$ -ME pH 7. Die Fluoreszenz von ACMA wurde detektiert bei  $\lambda_{ex/em} = 410/490$  nm.

Wie Abbildung 4-24 A zeigt, wird der Grad der Fluoreszenzlöschung durch den Einsatz des Inhibitors 2GBI stark reduziert. In dem dargestellten Experiment wurde dieser von etwa 70 % im uninhibierten Fall, auf 25 % bei Vorlage von  $170 \mu\text{M}$  2GBI gesenkt. Dies entspricht einer prozentualen Inhibition von 65 %. Zudem verlangsamt sich die Abnahme und geht von einem exponentiellen in einen fast linearen Verlauf über. Ein Maß für die Inhibition ist ebenso, die Änderung der Geschwindigkeit der Protonentranslokation, welche mit der Fluoreszenzlöschung einhergeht. Diese wird repräsentiert durch die Konstante  $k$ . Diese

## Ergebnisse

wurde daher zusätzlich zu dem  $A_{60}$ -Wert als Parameter für die Inhibition des  $H_V1$ -Kanals in Abhängigkeit der 2GBI Konzentration ausgewertet. Aus dem resultierenden Balkendiagramm (siehe Abbildung 4-24 B) ist ersichtlich, dass beide Parameter in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 21  $\mu\text{M}$  kaum Änderungen aufweisen. Erst ab einer 2GBI Konzentration von 42  $\mu\text{M}$  kann eine signifikante Inhibition des Kanals registriert werden. Diese liegt für die prozentuale Abnahme  $A_{60}$  bei  $17 \pm 10 \%$  und für die Konstante  $k$  bei  $12 \pm 12 \%$ . Durch weitere Verdopplungen der Konzentration an 2GBI konnte die Inhibition, veranschaulicht durch eine Erhöhung von  $A_{60}$  auf  $29 \pm 12 \%$  bzw.  $43 \pm 16 \%$ , gesteigert werden. Analog wurde bei Konzentrationen von 85  $\mu\text{M}$  und 170  $\mu\text{M}$  2GBI eine Reduktion der Konstanten um  $20 \pm 15 \%$  und  $34 \pm 22 \%$  ermittelt. Die Inhibition des Kanals Abhängigkeit der 2GBI-Konzentration folgt, wie Abbildung 4-24 C verdeutlicht, einem sigmoidalen Verlauf. Aus der Anpassung der Daten an das Hill-Modell konnte eine Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $88 \pm 64 \mu\text{M}$  und ein Hill-Koeffizienten  $n = 1.7 \pm 0.8$  ermittelt werden. Die Anpassung an die  $A_{60}$ -Daten lieferte  $K_D = 27 \pm 8 \mu\text{M}$  wobei ein Hill-Koeffizient von  $n = 1$  auf Basis der Studien von Hong *et al.* angenommen wurde.<sup>[2]</sup> Diese Annahme war Voraussetzung für eine erfolgreiche Anpassung an die Daten, da der Koeffizient ansonsten nicht definiert werden konnte. Bereits durch Konzentrationen von 43  $\mu\text{M}$  an 2GBI wurde eine nahezu vollständige Unterdrückung des unspezifischen Protoneneinstroms in Blindproben erreicht. Zum Teil konnte auch ein minimaler Anstieg der Fluoreszenz um 1–2 % beobachtet werden. Hieraus kann eine unspezifische Inhibition des unspezifischen Protonenstroms abgeleitet werden. Diese fällt jedoch geringer als der Fehler der spezifische Inhibition des Kanals aus.

### 4.2.7 Untersuchung des Einflusses von $\text{Zn}^{2+}$ und AEA auf den $H_V1$ -Protonenkanal

Neben der Inhibition des  $H_V1$ -Protonenkanals durch 2GBI wurde die inhibierende Wirkung von  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen auf den rekombinanten Kanal, im Rahmen der Bachelorarbeit von Kristina Kramer, sowie dessen mögliche Aktivierung durch das Endocannabinoid *N*-Arachidonylethanolamid (Anandamid, AEA), im Rahmen der Bachelorarbeit von Rebecca Rixen, untersucht. Hierbei sollte neben der direkten Auswirkung auf den Kanal, auch die Beeinflussung des Tests durch die beiden Substrate untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden analoge Messungen unter der Verwendung von Blindvesikeln durchgeführt. In beiden Fällen wurde ein deutlicher Einfluss der getesteten Substanzen auf den Verlauf der Fluoreszenzintensität nach Valinomycinzugabe beobachtet (siehe Abbildung 4-25). Die Präsenz von Zinkionen in einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  resultierte in einer verlangsamten Fluoreszenzlöschung im Fall der Proteoliposomen (POPC/POPS/Chol 65:15:20, nominal P/L = 1:19500 ( $n/n$ )) (siehe Abb. 4-21 A). Dass die Fluoreszenzlöschung hierbei nicht dem idealen exponentiellen Verlauf folgt, welcher zuvor beschrieben wurde (vgl. hierzu Abschnitt 4.2.3), ist auf den von Kristina Kramer verwendeten geringeren Anteil negativ

geladener Lipide zurückzuführen. Im Kontrast zu den Proteoliposomen wurde eine Steigerung der Rate der Intensitätsabnahme im Fall der Blindproben detektiert. Der Inhibition des Kanals um 14 % steht somit eine „Aktivierung“ der unspezifischen Protonentranslokation von 300 % gegenüber. Durch den Zusatz des Endocannabinoid AEA wurde ebenfalls eine deutliche gesteigerte Fluoreszenzlöschung verursacht. Bereits bei einer Konzentration von 2.8  $\mu\text{M}$  wurde die Abnahme innerhalb der 60 s von 19 % auf 64 % erhöht. Der Effekt des AEA auf die Proteoliposomen (POPC/POPG/Chol 55:25:20, nominal P/L = 1:17300 ( $n/n$ )) fällt geringer aus und hat lediglich eine 23 %ige Steigerung der Fluoreszenzlöschung zur Folge.

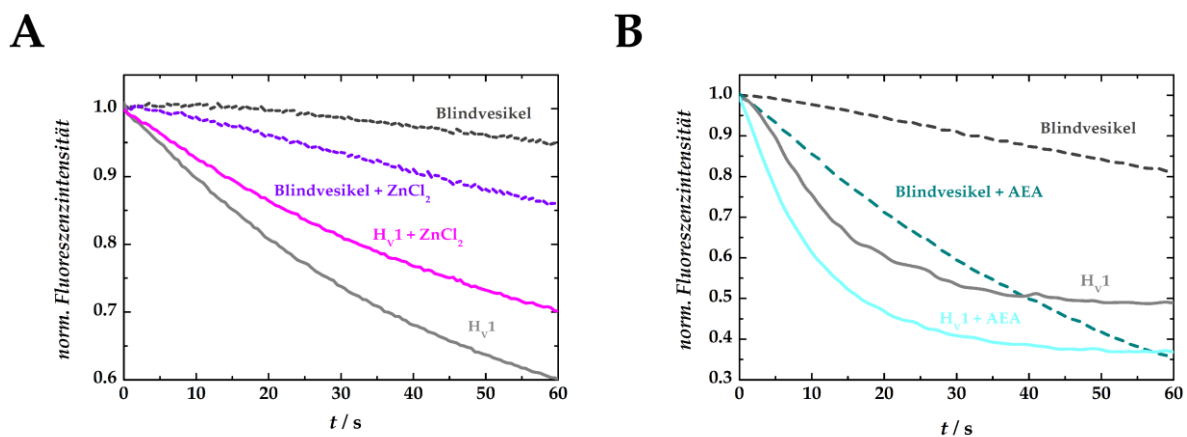


Abbildung 4-25: Spektren der normierte Intensitäten des ACMA basierten Fluxtests. (A) Während die Abnahme der normierten Fluoreszenzintensität der H<sub>V</sub>1-Proteoliposomen (POPC/POPS/Chol 65:15:20; nominales P/L = 1:34600 ( $n/n$ )) durch die Vorlage von 300  $\mu\text{M}$  ZnCl<sub>2</sub> geringer ausfällt, wird eine schnellere Abnahme im Fall der Blindvesikel beobachtet (violette Kurve). Durch exponentielle Anpassung der Daten wurde eine 14 %ige Inhibition der H<sub>V</sub>1-Liposomen bzw. eine Steigerung des Betrages der Konstanten der Blindproben ermittelt. (B) Der Zusatz des potentiellen Aktivators *N*-Arachidonylethanolamid in einer Konzentration von 2.8  $\mu\text{M}$  bewirkt ebenfalls eine gesteigerte Abnahmerate der Intensität innerhalb der Blindproben (POPC/POPG/Chol 55:25:20) (dunkle Cyankurve). Diese liegt deutlich über dem Niveau der Blindproben ohne AEA. Für den Protonenkanal (nominal P/L = 1:17300 ( $n/n$ )) wurde lediglich ein 23 %iger Zuwachs bei gleicher AEA-Konzentration ermittelt. Extravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 0.2 mM EDTA; pH 7. Intravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 2 mM  $\beta$ -ME, pH 7. Die Fluoreszenz von ACMA wurde detektiert bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 410/490$  nm.

Sowohl die Zugabe von Zinkionen als auch AEA induzieren einen verstärkten Einstrom von Protonen in die Blindvesikel. Die Aktivierung durch AEA übertrifft hierbei den Effekt, welcher in H<sub>V</sub>1-Proteoliposomen beobachtet werden konnte. Dies kann auf eine Wechselwirkung der Stoffe mit der Lipidmembran hindeuten, welche in einer erhöhten Durchlässigkeit resultiert. Dies würde systematische Studien zur Beeinflussung der H<sub>V</sub>1 vermittelten Protonentranslokation durch den vorgestellten Assay ausschließen.

## Ergebnisse

### 4.2.8 Rekonstitution in große unilamellare Vesikel

Neben der Rekonstitution in kleine unilamellare Vesikel, untersuchte Kristina Kramer im Rahmen ihrer Bachelorarbeit die Insertion des H<sub>v</sub>1-Kanals in große unilamellare Vesikel mit einem Durchmesser von 1000 nm. Die Vesikel der Zusammensetzung POPC/POPS/Chol (55:25:20) wurden zuvor durch Extrusion hergestellt. Das Protein-zu-Lipid-Verhältnis lag bei nominalen 1:34600 (*n/n*). Die Auswertung der Rekonstitutionsnachweise (5 Präparationen, N = 10) mittels ACMA basierendem Protonenfluss-Test erfolgte analog zu Kapitel 4.2.3. Die Fluoreszenzlöschung erfolgte mit einer mittleren Konstanten von  $k = -0.08 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ . Aus dem gemittelten A<sub>60</sub>-Wert wurde ein Proteoliposomenanteil von  $35 \pm 12 \%$  bestimmt.

### 4.2.9 Einfluss der Temperatur auf die Protonentranslokation

Neben der offensichtlichen Eigenschaft des H<sub>v</sub>1-Kanals in Abhängigkeit des Membranpotentials Protonen zu leiten, besitzt dieser auch eine Temperaturabhängigkeit. Beeinflusst wird diese vor allem durch den C-Terminus des Proteins. Diese wurde aus einer erhöhten Protonentranslokationsrate mit steigender Temperatur bestimmt, welche nicht auf die erhöhte Diffusion der Moleküle zurückgeführt werden konnte.<sup>[43]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde sie anhand der Korrelation der Geschwindigkeit Fluoreszenzlöschung und der Temperatur der Messkammer untersucht. Ein exemplarischer Datensatz, bei dem in 10 °C Schritten verfahren wurde, in Abbildung 4-26 veranschaulicht die Temperaturabhängigkeit. Während die Abnahme der ACMA Fluoreszenzintensität bei 0 °C nahezu linear verläuft, folgt diese bei höheren Temperaturen einem exponentiellen Verlauf. Die minimale Fluoreszenzintensität wird bei 20 °C erreicht und liegt bei etwa 23 %. Dieses Niveau wird bei höheren Temperaturen nicht erreicht. Indes wird beobachtet, dass nach einer kurzen Abnahme die Intensität wieder ansteigt. Dies ist vermutlich auf einen sehr schnellen Protoneneinstrom zurückzuführen, welcher auf Grund des sich schnell ändernden pH-Wertes und dem entstehenden osmotischen Gradienten zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Vesikel führt. Dabei steigt die Konstante der Fluoreszenzintensität ausgehend von 0 °C ( $k = -0.013 \text{ s}^{-1}$ ) bis 50 °C ( $k = -0.40 \text{ s}^{-1}$ ) um das etwa 31-fache an (siehe Abbildung 4-26 B). Die unspezifische Protonentranslokation der Blindvesikel wird durch die Änderung der Temperatur kaum beeinflusst, wie in Abbildung 4-26 A (siehe graue Messkurven) exemplarisch anhand der Messungen bei 10 °C und 50 °C gezeigt wird.

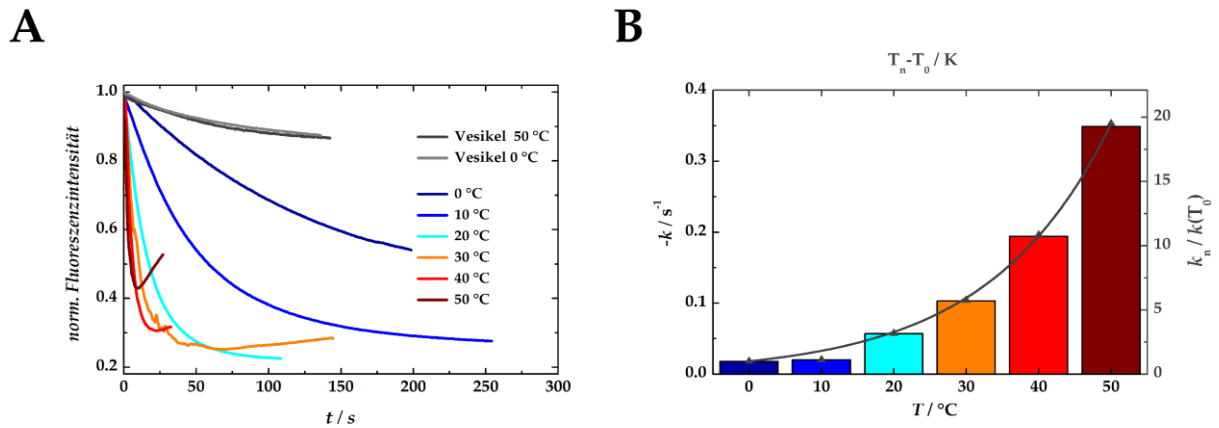


Abbildung 4-26: Temperaturabhängige Protonentranslokation veranschaulicht anhand des ACMA Protonenfluss-Test. (A) Die normierten Verläufe der ACMA Fluoreszenzintensitäten der Proteoliposomen (POPC/POPG/Chol; 55:25:20; P/L: 1:17300 ( $n/n$ )) folgen bis zu einer Temperatur von 20 °C einer konstanten exponentiellen Abnahme. Bei höheren Temperaturen erfolgt ein zusätzlicher Anstieg, dieser tritt mit steigender Temperatur zu einem früheren Zeitpunkt ein. Die minimale Intensität von 23 % wird daher bei einer Temperatur von 20 °C erreicht. Der Temperatureinfluss auf die Blindvesikel (hier als Vesikel gekennzeichnet) ist weniger stark. Zwischen den Messungen bei 10 °C (graue Kurve) und 50 °C (dunkel graue Kurve) besteht kein Unterschied. (B) Die Konstante nimmt mit steigender Temperatur zu. Bei 50 °C ist diese, ausgehend von  $-0.013 \text{ s}^{-1}$ , auf den 31-fachen Wert angewachsen. Aus der Datenanpassung der normierten Abfallskonstanten ( $k_n/k(T_0)$ ) wurde ein  $Q_{10}$ -Wert von 1.99 berechnet. Extravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 0.2 mM EDTA, pH 7. Intravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 2 mM  $\beta$ -ME, pH 7. Konzentrationen: Valinomycin (12.9 nM), CCCP (5.8 nM). Die Fluoreszenz von ACMA wurde detektiert bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 410/490 \text{ nm}$ .

Ein Maß für die Änderung einer spezifischen Konstante bei einer Temperaturänderung um 10 K liefert der  $Q_{10}$ -Wert.<sup>[43]</sup> Als Bezugspunkt wurde hier eine Temperatur von 0 °C ( $T_0$ ) gewählt. Somit ist  $Q_{10}$  durch die Gleichung 4-9 definiert und kann aus der Auftragung der normierten Konstanten  $\left(\frac{k_n}{k(T_0)}\right)$  gegen die Temperaturdifferenz  $T_n - T_0$  ermittelt werden.

$$\left(\frac{k_n}{k(T_0)}\right) = Q_{10}^{\left(\frac{T_n - T_0}{10 \text{ K}}\right)} \quad 4-9$$

Aus der Auftragung der Daten aus Tabelle (siehe Abbildung 4-26 B) und der Anpassung an die Daten (siehe graue Kurve) wurde ein  $Q_{10}$ -Wert von 1.99 bestimmt.

## Ergebnisse

Tabelle 4-1: Ergebnisse der exponentiellen Anpassung der in Abbildung 4-26 dargestellten Graphen.

$T / ^\circ\text{C}$	$-k / \text{s}^{-1}$	$k_n / k_0$
0	0.013	1
10	0.019	1.46
20	0.058	4.46
30	0.11	8.46
40	0.21	16.15
50	0.40	30.77

### 4.3 Oregon Green 488 basierte quantitative Bestimmung der pH-Änderung

Da auf Grundlage des ACMA basierten Protonenfluss-Tests zwar ein qualitativer Nachweis der Protonentranslokation erfolgte konnte, jedoch eine quantitative Analyse der Translokationsrate ausgeschlossen ist, wurde der Test weiter entwickelt. Der zu diesem Zweck verwendete lipid-gekoppelte Fluorophor Oregon Green 488-DHPE (OG488-DHPE) ermöglicht durch Kalibrationsmessungen die Bestimmung des  $\text{pK}_s$ -Wertes innerhalb der verwendeten Lipidmembran.<sup>[178]</sup> Dies erlaubt in einem weiteren Schritt die Korrelation der Fluoreszenzintensität und dem umgebenen pH-Wert, welche Basis für die Berechnung der intravesikulären pH-Verschiebung anhand der Fluoreszenzlöschung ist (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Aus der Änderung des pH-Wertes kann dann auf die Protonentranslokationsrate des Kanals geschlossen werden (siehe 4.3.2.2). Dies ermöglicht es den Leitwert des  $\text{H}_v1$ -Kanals auf Basis zu berechnen.

#### 4.3.1 Bestimmung des $\text{pK}_s$ von OG488-DHPE

Die Kalibrierung des Systems erfolgte durch die Bestimmung des  $\text{pK}_s$ -Wertes von OG488-DHPE anhand der Messung der Fluoreszenzintensität bei definierten pH-Werten. Hierbei wurde eine Lipidmembran der Zusammensetzung POPC/POPS/Chol/OG488-DHPE (54.5:25:20:0.5) verwendet. Die verwendeten Vesikel der Kalibrationsmessungen, besaßen einen nominalen Durchmesser von etwa 100 nm. Dies sollte die Vergleichbarkeit mit den



später verwendeten Proteoliposomen gewährleisten. Diese besitzen einen mittleren Durchmesser von 100 nm (siehe Abbildung 4-15).

Die Emissionsspektren des OG488-DHPE Fluorophors, welche in einem Wellenlängenbereich von  $\lambda_{em} = 510\text{--}700$  nm ( $\lambda_{ex} = 508$  nm) aufgenommen wurden, wurden zunächst auf die maximale Fluoreszenzintensität bei einem intra- und extravesikulären pH-Wert von 7 normiert (siehe Abbildung 4-27 A). Hieraus wurden die maximalen, normierten Intensitäten bei pH 4, 5, 6 und 7 bei  $\lambda_{em} = 529$  nm bestimmt. Die Auftragung erfolgte in Abhängigkeit des vorliegenden pH-Wertes (siehe Abbildung 4-27 B). Aus der Anpassung der Gleichung 3-10 an die Daten folgt ein  $pK_s$ -Wert des lipidgebundenen OG488 von  $6.91 \pm 0.04$  bei  $I_{min} = 0.0$  und  $I_{max} = 1.81 \pm 0.08$ .

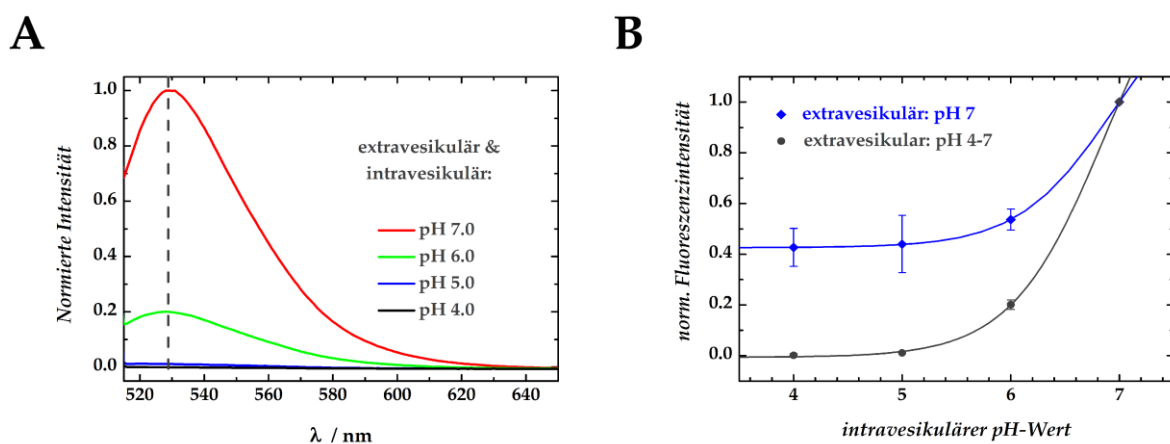


Abbildung 4-27: Bestimmung des  $pK_s$ -Wertes des lipidgekoppelten Fluorophors OG488-DHPE einer POPC/POPS/Chol/OG488-DHPE (54.5:25:20:0.5) Lipidmembran. (A) Die normierten Emissionsspektren des in die Lipidmembran insertierten OG488-DHPE bei einem pH-Wert von 4 (schwarz), 5 (blau), 6 (grün) und 7 (rot) wurden bei 20 °C aufgenommen. Die Maxima der Fluoreszenzintensitäten wurden bei  $\lambda_{em} = 529$  nm (Anregungswellenlänge  $\lambda_{ex} = 508$  nm) detektiert (vertikale graue Linie). (B) Der  $pK_s$ -Wert des Fluorophors wurde durch Anpassung von Gleichung 3-10 bestimmt zu 6.91 mit  $I_{min} = 0.0$  und  $I_{max} = 1.81$  (graue Kurve). Für die Kalibration des Systems, zur Bestimmung der  $H_v1$  induzierten pH-Änderung als Folge der Protonentranslokation, wurden analoge Messungen bei einem konstanten extravesikulären pH von 7 durchgeführt. Die Datenanpassung lieferte  $pK_s = 6.94$  bei  $I_{min} = 0.43$  und  $I_{max} = 1.50$  (blaue Kurve). Extravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 0.2 mM EDTA, pH 7. Intravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 2 mM  $\beta$ -ME, pH 7.

In analoger Weise erfolgte die Kalibration des Systems zur Bestimmung der  $H_v1$  induzierten pH-Änderung als Folge der Protonentranslokation. Da die Bedingungen der Kalibration mit denen des eigentlichen Protonenfluss-Tests übereinstimmen sollten, wurden die Liposomen mit intravesikulären pH-Werten von 4, 5, 6 und 7 in Fluxpuffer (pH 7) vermessen. Die Anpassung der normierten, gemittelten Maxima liefert einen  $pK_s$ -Wert von  $6.94 \pm 0.02$  mit  $F_{min} = 0.43 \pm 0.01$  und  $F_{max} = 1.50 \pm 0.02$ . Bei vollständiger Löschung der Fluoreszenz der

## Ergebnisse

inneren Monoschicht verbleibt somit eine Restintensität von 43 %. Aus den Ergebnissen und der Umformulierung der Gleichung 3-10 kann anhand der relativen Fluoreszenzintensität, welche durch Gleichung 4-10 definiert ist, der intravesikuläre pH berechnet werden (siehe Gleichung 4-12).

### 4.3.2 OG488-DHPE basierter Protonenfluss-Assay

Das Prinzip des OG488-DHPE basierten Tests, die Kanal-Öffnung und die damit verbundene Protonentranslokation durch einen gerichteten Kaliumionenausstrom zu induzieren, unterscheidet sich nicht vom bereits vorgestellten ACMA gestützten Test (siehe ACMA basierter Protonenfluss-Test Abschnitt 3.4.1). Jedoch liegen die Fluorophormoleküle hier nicht in Lösung vor, sondern sind in der Membran verankert. Die Ansäuerung des intravesikulären Kompartiments resultiert daher lediglich in der Löschung der Fluoreszenz der inneren Lipidmonoschicht (siehe Abbildung 4-28 A).

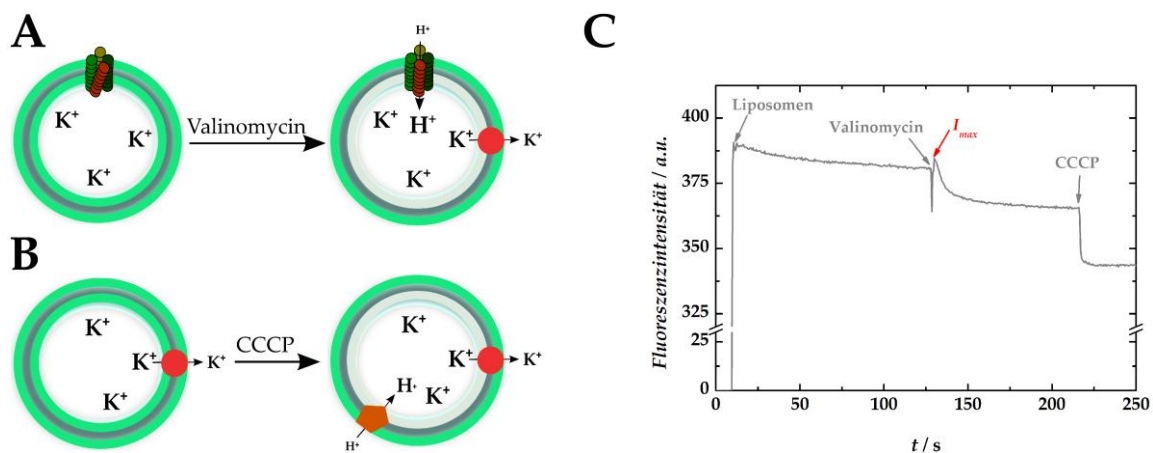


Abbildung 4-28: Schematische Darstellung der Funktionsweise des OG488-DHPE basierten Protonenfluss-Tests. (A) Proteoliposomen der Zusammensetzung POPC/POPG/Chol/OG488-DHPE (54.5:25:20:0.5) wurden in einem Verhältnis von 1:34 (*v/v*) in Fluxpuffer verdünnt. Hieraus resultiert ein 13-facher Kaliumkonzentrationsgradient des intravesikulären Kompartiments gegenüber der äußeren Pufferlösung. Die Injektion des Kaliumionophors Valinomycin (12.9 nM) hat daher den Ausstrom der Ionen entlang des Konzentrationsgefälles zur Folge. Der im Vesikellinneren zurückbleibende Überschuss an negativen Ionen wird, bei Vorliegen eines funktionellen  $H_v1$ -Kanals, durch dessen Protonentranslokation ausgeglichen. Die Ansäuerung des Vesikellumen führt zu einer Fluoreszenzlöschung der OG488-DHPE Fluorophore der innenliegenden Lipidmonoschicht. (B) Vesikel in deren Membran keine oder nicht funktionelle Kanäle inseriert sind, reagieren nicht auf die Valinomycinzugabe. Die Fluoreszenzlöschung erfolgt hierbei durch die Zugabe des Protonophors CCCP (5.8 nM). (C) Die exemplarische Messkurve des OG488 basierten Fluxtests zeigt eine Valinomycin induzierten Abnahme der Fluoreszenzintensität. Ein konstantes Intensitätsniveau wird etwa 30 s nach dem Beginn der Löschung erreicht. Die Fluoreszenz von OG488-DHPE wurde detektiert bei  $\lambda_{ex/em} = 508/534$  nm. Extravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 0.2 mM EDTA, pH 7. Intravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 2 mM  $\beta$ -ME, pH 7.

Durch die Zugabe des Protonophors CCCP wird erreicht, dass die Fluoreszenz der inneren Monoschicht der übrigen Vesikel gequencht wird (siehe Abbildung 4-28 B). Diese enthalten keinen oder nicht funktionelle Kanäle und reagieren daher nicht mit einer Änderung der Fluoreszenzintensität bei Zugabe des Kaliumionophors Valinomycin. Nach der CCCP Zugabe kann, analog zum Vorgehen beim ACMA Test, die normierte Fluoreszenzintensität berechnet und hieraus auf den  $A_{60}$ -Wert geschlossen werden (siehe Gleichung 4-3). Dieser liegt bei einem durchschnittlichen Protein-zu-Lipidverhältnis von 1:12000 ( $n/n$ ) bei  $32 \pm 10$  %. Zudem wurde der Anteil aktiver POPC/POPG/Chol/OG488-DHPE-Proteoliposomen unter Verwendung des ACMA basierten Protonenfluss-Assays auf  $63 \pm 10$  % ( $N = 4$ ) bestimmt. Im Fall des ACMA basierten Systems beträgt der Proteoliposomenanteil etwa  $39 \pm 8$  % bei einem Protein-zu-Lipid Verhältnis von 1:34600 ( $n/n$ ) und  $76 \pm 7$  % bei einem Verhältnis von 1:17300 ( $n/n$ ). Der hier bestimmte Wert liegt also in diesem Bereich, wobei ein höherer Proteinanteil während der Rekonstitution eingesetzt wurde. Dies könnte auf eine Beeinflussung der Fluoreszenzeigenschaften des OG488-DHPE durch das Protein, eine Beeinträchtigung der Rekonstitution, sowie einen unterschiedlichen Protoneneinstrom in Proteoliposomen und Blindvesikel hindeuten.

Die mittlere Konstante, welche aus der exponentiellen Anpassung der Daten der normierten Intensitäten ermittelt wurde, beträgt  $-0.07 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$  ( $N = 17$ ) bei einem durchschnittlichen Protein-zu-Lipidverhältnis von 1:12000 ( $n/n$ ). Dies entspricht einer Halbwertszeit von  $\tau_{1/2} = 12.2 \pm 4.8 \text{ s}$ . Diese liegt im Bereich, der in Kapitel 4.2.3 bestimmten Halbwertszeiten, für eine Rekonstitution von  $H_V1$  in POPC/POPG/Chol-Vesikel bei kleinen P/L-Verhältnissen. Im Gegensatz zum ACMA basierten Fluxtest fällt die Abnahme der Fluoreszenzintensitäten deutlich geringer aus, wie die exemplarische Messkurve in Abbildung 4-28 C zeigt. Die mittlere Abnahme der relativen Fluoreszenz der Proteoliposomen, welche nach Gleichung 4-10 berechnet wurde, beträgt lediglich  $4.1 \pm 0.9$  %. Für den ACMA Fluxtest wurde ein Wert im Bereich von etwa 49 % beobachtet. Hieraus lässt sich eine geringere Sensitivität des OG488-DHPE ableiten.

Für Blindvesikel wurden eine Abnahme der normierten Fluoreszenzintensität von  $8 \pm 3$  % in einem Zeitintervall von 60 s detektiert. Hieraus resultiert eine Halbwertszeit von 375 s. Die unspezifische Protonentranslokation erfolgt somit in einer Größenordnung, wie sie auch für den ACMA basierten Protonenfluss-Test beobachtet werden konnte.

#### 4.3.2.1 Bestimmung der intravesikulären pH-Verschiebung

Die Löschung der OG488-Fluoreszenzintensität erfolgt nicht, wie für ACMA diskutiert, durch die Akkumulation des Fluorophors an der Lipidmembran. Da der Fluorophor OG488 durch das Glycerophospholipid DHPE in der Membran verankert ist, liegt eine definierte Konzentration an Fluorophor im Vesikelinneren vor. Dies ist bei der Verwendung von ACMA nicht der Fall, da ACMA im unprotonierten Zustand membrangängig ist. Die

## Ergebnisse

genannten Eigenschaften des OG488-DHPE sowie dessen  $pK_s$ -Wert von 6.94 erlauben sensitiv pH-Änderungen unter physiologischen Bedingungen zu detektieren. Hierbei wurde die Annahme gemacht, dass wenn ein mittlerer Proteoliposomenanteil von 63 % eine  $4.1 \pm 0.9$  %ige Löschung der relativen Fluoreszenz zur Folge hat. Die relative Fluoreszenz ist durch Gleichung 4-10 definiert.

$$I_{rel} = \frac{I_t}{I_{max}} \quad 4-10$$

Hierbei entspricht  $I_t$  der gemessenen Intensität der Fluorophors zum Zeitpunkt  $t$  und  $I_{max}$  der maximalen Intensität, welche etwa 2 s nach der Valinomycinzugabe detektiert werden kann (siehe Abbildung 4-28 C).

$$I_{korr} = 1 - \left( \frac{1 - I_{rel}}{x_{proteo}} \right) \quad 4-11$$

Eine Korrektur der relativen Intensität ( $I_{korr}$ ) wurde eingeführt, um zu berücksichtigen, dass aktive Proteoliposomen nur anteilig vorliegen, jedoch die Fluoreszenzintensitäten aller Liposomen zum  $I_{max}$ -Wert beitragen (siehe Gleichung 4-11). Der Anteil aktiver Proteoliposomen ( $x_{proteo}$ ) wurde durch einen ACMA basierten Protonenfluss-Test bestimmt.

Aus der Korrektur folgt, dass bei Vorliegen einer reinen Proteoliposomenpopulation liegt der korrigierte Fluoreszenzabfall  $A_{korr}$  bei  $6.5 \pm 1.4$  % (N = 17). Dementsprechend beträgt  $I_{korr} = 0.935$ .

$$pH = pK_s + LOG \left( \frac{I_{korr} - 0.43}{1.50 - I_{korr}} \right) \quad 4-12$$

Anhand dieser mittleren Abnahme der relativen Fluoreszenz von 6.5 % wurde durch Anwendung der Gleichung 4-12 die Abnahme des intravesikulären pH ausgehend von pH 7, innerhalb der ersten 60 s nach Valinomycinzugabe, bestimmt. Das Histogramm ist in Abbildung 4-29 dargestellt. Aus der Gaussverteilung ergibt sich eine durchschnittliche Abnahme von  $0.11 \pm 0.02$  pH-Einheiten, diese entspricht der berechneten mittlere pH-Änderung.

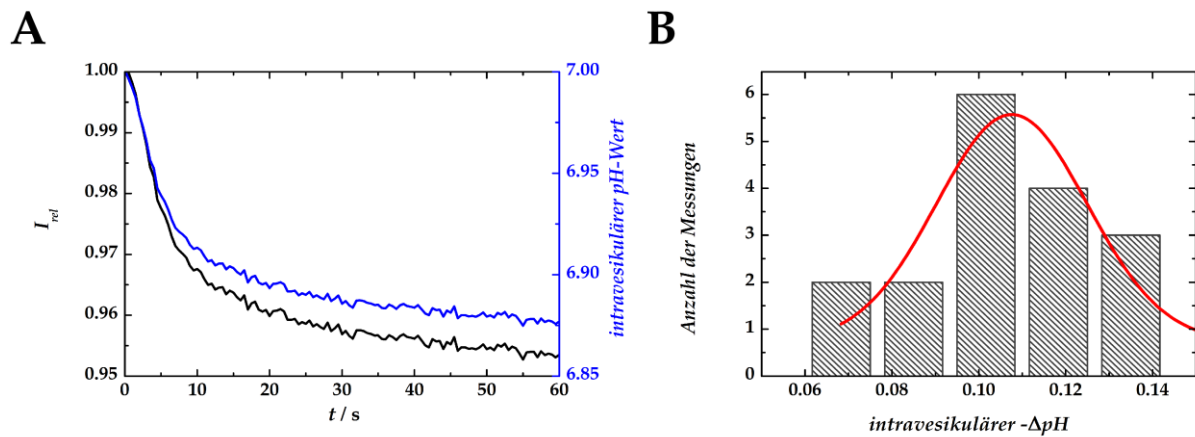


Abbildung 4-29: Abnahme des intravesikulären pH-Wertes innerhalb von  $H_v1$  Proteoliposomen. (A) Die exemplarische Messkurve des OG488 basierten Fluxtests zeigt eine Valinomycin induzierten Abnahme der relativen Fluoreszenz ( $I_{rel}$ , schwarze Kurve) von etwa 5 %. Diese wurde nach Gleichung 4-10 berechnet. Aus  $I_{rel}$  wurde nach Formel 4-12 der intravesikuläre pH-Wert (blaue Kurve) bestimmt. Dieser ändert sich durch den  $H_v1$  induzierten Protoneneinstrom um etwa 0.1 pH-Einheiten. Die Proteoliposomen besaßen eine Zusammensetzung von POPC/POPG/Chol/OG488-DHPE (54.5:25:20:0.5) mit einem mittleren realen Protein-zu-Lipidverhältnis von 1:12000 ( $n/n$ ). Die Anpassung durch eine Gaußverteilung liefert eine mittlere Abnahme von  $0.11 \pm 0.02$  pH-Einheiten. Die insgesamt 17 Messungen wurden aus 5 Präparationen erhalten. Die Fluoreszenz von OG488-DHPE wurde detektiert bei  $\lambda_{ex/em} = 508/534$  nm. Extravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 0.2 mM EDTA, pH 7. Intravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 2 mM  $\beta$ -ME, pH 7.

#### 4.3.2.2 Berechnung der Protonentranslokationsrate

Aus der Kenntnis der intravesikulären pH-Änderung kann eine Abschätzung der Protonenrate pro Kanal erfolgen. Hierzu werden allgemeine Annahmen vorausgesetzt. Der mittlere Durchmesser der Vesikel beträgt 100 nm, wodurch sich ein Vesikelvolumen von  $5.24 \cdot 10^{-19}$  L ergibt. Da die verwendeten Lösungen 20 mM HEPES Puffermoleküle enthalten, muss die Anzahl der Protonen ausgehend von der Henderson-Hasselbalch-Gleichung bestimmt werden.

$$pH = pK_s + \text{LOG} \left( \frac{c(A^-)}{c(HA)} \right) \quad 4-13$$

Der pH-Wert ist somit über den  $pK_s$ -Wert der Puffermoleküle, sowie dem Verhältnis der Konzentration der dissoziierten Säure ( $A^-$ ) und der Säure ( $HA$ ) definiert. Der  $pK_s$ -Wert für HEPES bei 20 °C liegt bei 7.55. Das Verhältnis von  $\left( \frac{c(A^-)}{c(HA)} \right)$  liegt bei einer Abnahme des intravesikulären pH von 0.11 Einheiten bei etwa 0.22. Hier raus ergibt sich eine korrespondierende Steigerung der Protonenkonzentration gegenüber pH 7 von 0.8 mM. Dies

## Ergebnisse

entspricht einem Einstrom von 255 Protonen je Vesikel. Bei einem Protein-zu-Lipidverhältnis von 1:12000 ( $n/n$ ) liegen 7 Protonenkanäle pro Vesikel vor. Hieraus resultiert eine Protonenanzahl von ca. 36 Protonen pro Kanal. Unter der Annahme, dass das entsprechende Fluoreszenzniveau bereits 30 s nach Valinomycinzugabe erreicht wird, folgt eine Protonentranslokationsrate von  $1.1 \text{ H}^+ \text{ s}^{-1}$ . Ausgehend von einem Membranpotential von 65 mV besitzt der rekombinante  $\text{H}_v1$ -Kanal unter den gegebenen Bedingungen einen Leitwert von 3.0 aS.

### 4.3.3 2-Guanidinbenzimidazol Inhibition der $\text{H}_v1$ Protonentranslokation

Nach dem die Eignung des OG488-DHPE Fluorophors zur Detektion und Visualisierung der  $\text{H}_v1$  vermittelten Protonentranslokation bestätigt werden konnte, wurde die Inhibition des Kanal durch 2GBI auf Basis des OG488 basierten Protonenfluss-Test untersucht. Der Einfluss der steigenden 2GBI-Konzentrationen auf die Verläufe der Fluoreszenzintensität ist vergleichbar mit den Beobachtungen im Rahmen des ACMA Fluxtests. Die Geschwindigkeit der exponentiellen Abnahme verläuft zunehmend verlangsamt bei steigender 2GBI-Konzentration (siehe Abbildung 4-30). Im dargestellten Beispiel wird die Fluoreszenzlöschung von 44 % im uninhibierten Fall auf 25 %, bei einer Konzentration des Inhibitors von  $85 \mu\text{M}$ , gesenkt. Dies entspricht einer Inhibition von 43 %. Auffällig ist, dass die Kurven, im Vergleich zu ACMA gestützte Messungen, ein stärkeres Rauschen aufweisen.

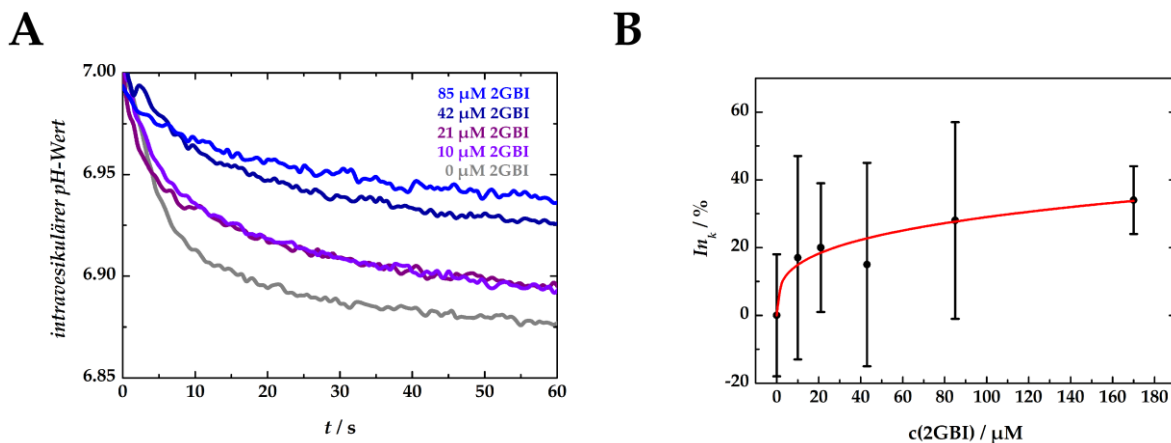


Abbildung 4-30: Inhibition des  $\text{H}_v1$ -Kanals mittels 2GBI in POPC/POPS/Chol/OG488-DHPE (54.5:25:20:0.5) Liposomen ( $P/L = 1:12000$  ( $n/n$ )). (A) Die Abnahme des intravesikulären pH-Wertes, dargestellt sind die 60 s nach Valinomycinzugabe, erfolgt mit zunehmender 2GBI-Konzentration verlangsamt. Hieraus resultiert, dass die innerhalb des Zeitfensters erreichte Abnahme sinkt. (B) Die Inhibition des Kanals wurde anhand der Konstanten  $k$ , analog zum ACMA basierten Fluxtest, bestimmt. Anhand der Anpassung des Hill-Modells an die Daten wurde eine Dissoziationskonstante von  $20 \pm 7 \mu\text{M}$  unter Annahme eines Hill-Koeffizienten von 1.0 bestimmt. Die Fluoreszenz von OG488-DHPE wurde detektiert bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 508/534 \text{ nm}$ . Extravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 0.2 mM EDTA, pH 7. Intravesikuläre Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 0.2 mM EDTA; 2 mM  $\beta$ -ME, pH 7.

Die Auswertung erfolgte analog zu der in Kapitel 4.2.6 beschriebenen Methode. Die mittleren prozentualen Inhibitionen, berechnet anhand der Konstanten, sowie deren Fehler sind Abbildung 4-30 B veranschaulicht. Eine signifikante Inhibition von  $24 \pm 26$  % erfolgt ab einer Konzentration von  $86 \mu\text{M}$ . Bei  $170 \mu\text{M}$  steigt diese auf  $34 \pm 10$  %. Durch Anpassung der Daten an das Hill-Modell wurde eine Dissoziationskonstante von  $20 \pm 7 \mu\text{M}$  bestimmt, hierbei wurde ein Hill-Koeffizient von  $n = 1$  vorausgesetzt.<sup>[2]</sup> Zusätzlich wurde die Inhibition aus der Abnahme der relativen Fluoreszenzintensitäten, bzw. aus dem intravesikulären pH-Wertes, zum Zeitpunkt  $t = 60$  s ermittelt (vgl. Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Parameter und berechnete Dissoziationskonstante der Inhibition des  $H_V1$ -Kanals durch 2GBI. Grundlage zur Berechnung waren die Abnahmen der relativen Fluoreszenzintensitäten innerhalb der ersten 60 s nach Valinomycinzugabe. Das Hill-Modell wurde an die Daten angepasst (siehe Abbildung 4-31).

$c(2GBI) / \mu\text{M}$	Inhibition / %	N
0	$0 \pm 21$	17
10	$12 \pm 14$	4
21	$29 \pm 16$	11
42	$43 \pm 17$	11
85	$51 \pm 10$	8
170	$65 \pm 5$	4
$K_D$	$47 \pm 19 \mu\text{M}$	
$n$	$0.99 \pm 0.23$	

Diese liegt höher und erreicht bei 85 bzw.  $170 \mu\text{M}$  2GBI Werte von  $51 \pm 10$  bzw.  $65 \pm 5$  %. Aus der Auftragung und Anpassung an die korrespondierenden Daten (siehe Tabelle 4-2) wurde  $K_D = 47 \pm 19 \mu\text{M}$  sowie  $n = 0.99 \pm 0.23$  ermittelt (siehe Abbildung 4-31).

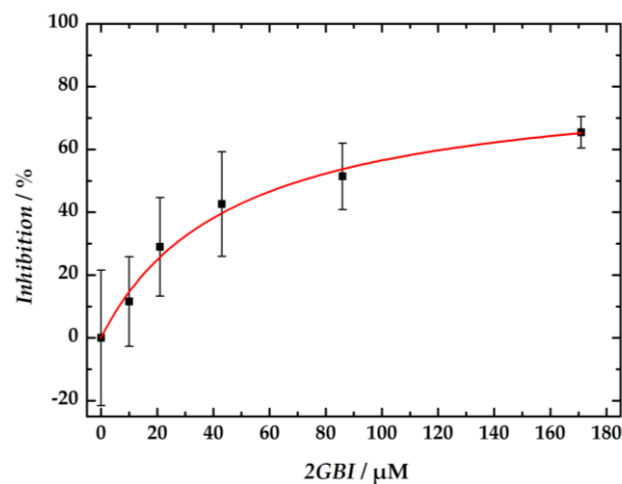


Abbildung 4-31: Grafische Auftragung der prozentualen Inhibition des Kanals gegen die Konzentration an 2GBI. Anhand der Anpassung des Hill-Modells an die Daten wurde eine Dissoziationskonstante von  $47 \pm 19 \mu\text{M}$  bei einem Hill-Koeffizient von  $0.99 \pm 0.23$  bestimmt.

Durch Zugabe von  $170 \mu\text{M}$  2GBI, wurde die Fluoreszenzlöschung innerhalb der Blindvesikel von 8 % auf 4 % reduziert.

### 4.4 Elektrophysiologische Charakterisierung des H<sub>V</sub>1-Protonenkanals mittels Impedanzspektroskopie

Die Impedanzspektroskopie erlaubt es nicht nur Oberflächenprozesse wie den Aufbau einer Lipiddoppelschicht anhand der Änderung der resistiven und kapazitiven Eigenschaften des Systems zu verfolgen, sie ermöglicht zudem die Applikation von Spannungen. Hierdurch können Studien an Membranproteinen wie Gramicidin A sowie dem spannungsabhängigen Anionen Kanal (engl. *voltage-dependent anion channel*, VDAC) durchgeführt werden. Zudem erlaubt der prinzipielle Messaufbau es, strukturelle Veränderungen der Kanäle mittels spezieller Infrarotabsorptions-Spektroskopie zu untersuchen.<sup>[159,179]</sup> Die Impedanzspektroskopie bietet eine mögliche Alternative zu Einzelkanalmessungen, wenn wie im Fall des H<sub>V</sub>1-Kanals, die Protonenströme lediglich im Bereich von fS liegen und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis dieser Einzelkanal-Studien ungünstig ausfällt.<sup>[34,45,46]</sup> Der Aufbau eines System zum Zweck der impedanzspektroskopischen Untersuchung des H<sub>V</sub>1-Potonenkanals soll im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden.

#### 4.4.1 Charakterisierung der WK3SH/6MH-Monoschicht und der darauf ausgebildeten Membran

Die Basis der impedanzspektroskopischen und SEIRA-gestützten Charakterisierung des Protonenkanals bildete eine trägerfixierte Lipiddoppelschichtmembran (engl. *tethered bilayer lipid membrane*, tBLM) (siehe Abbildung 4-32). Hierbei fungieren amphiphile Dihydrocholesteryl-2-(2-(2-ethoxy)ethoxy)ethanethiol (WK3SH) Moleküle als Abstandshalter und Membrananker.<sup>[180]</sup> Sie werden durch Chemisorption ihrer endständigen Thiolgruppen an der Goldoberfläche des Substrates fixiert. Drei Ethoxy-Einheiten bilden den Abstandshalter zwischen der Thiolfunktion und dem Steroidgerüst des Membranankers. 6-Mercaptohexanolmoleküle füllen die Räume zwischen den Abstandshaltern. Auf Grund des wässrigen Kompartiments zwischen dem Glassubstrat und der Membran ist es daher prinzipiell möglich Membranproteine, welche extrazelluläre Domänen besitzen, zu integrieren.<sup>[181-183]</sup> WK3SH und 6MH bilden zusammen die selbstorganisierte Monoschicht (engl. *self assembled monolayer*, SAM).



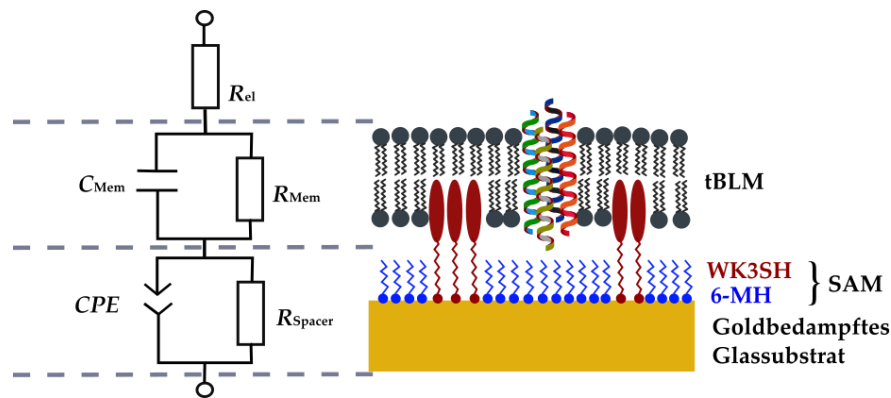


Abbildung 4-32: Schematische Darstellung des Aufbaus einer *tethered bilayer lipid membrane* (tBLM) zur impedanzspektroskopischen Charakterisierung des  $H_{V1}$ -Kanals. Der Aufbau des *self assembled monolayers* (SAM) aus dem amphiphilen WK3SH-Molekül sowie 6-Mercaptohexanol (6MH) beruht auf Chemisorption an dem goldbedampften Glassubstrat. Die Lipiddoppelschicht wird durch das Spreiten von unilamellaren Vesikeln bzw. Proteoliposomen ausgebildet. Die elektrischen Parameter des Systems wurden durch das nebenstehende R(RC)(RCPE) Ersatzschaltbild modelliert.

Der Aufbau der Membran erfolgte in zwei Stufen. Zunächst wurde die selbstorganisierte Monoschicht durch Inkubation eines goldgedampften Glassubstrates mit einer WK3SH/6MH-Isopropanollösung (1 mM, 1:4 ( $n/n$ )) präpariert. Die Ausbildung der Lipiddoppelschicht erfolgte durch Spreiten kleiner unilamellarer Vesikel. Eine proteinbeinhaltende Membran konnte somit durch die Verwendung von  $H_{V1}$ -Proteoliposomen aufgebaut werden. Sowohl der Schritt der SAM-Bildung, als auch der tBLM-Präparation wurden durch Impedanzspektroskopie verfolgt. Die elektrische Modellierung der beiden Systeme erfolgte dabei durch das in Abbildung 4-32 dargestellte R(RC)(RCPE)-Ersatzschaltbild. Der Widerstand  $R_{el}$  beschreibt das Verhalten des Elektrolyten, während der Widerstand  $R_{Mem}$  den Widerstand der SAM bzw. der tBLM wiedergibt. Die Kapazität der Systeme wird durch  $C_{Mem}$  modelliert. Die Spacerschicht, welche als Goldoberfläche mit den 6MH-Molekülen und den Ethoxy-Einheiten des WK3SH definiert ist, wird anhand des Widerstandes  $R_{Spacer}$  sowie einem *constant phase element* (CPE) beschrieben, welches das nicht ideale kapazitive Verhalten berücksichtigt. Die spezifischen Kapazitäten wurden unter Berücksichtigung der Größe der Goldoberfläche bestimmt. Es wurden bei der Präparation proteinhaltiger Membranen Proteoliposomen mit einem realen Protein-zu-Lipidverhältnis von 1:10000 ( $n/n$ ) bis 1:34600 ( $n/n$ ) verwendet.

## Ergebnisse

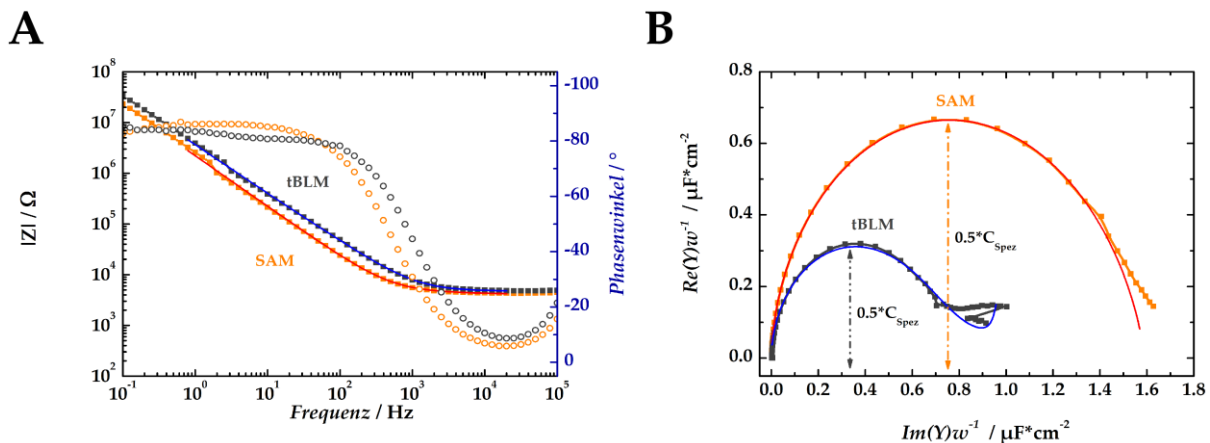


Abbildung 4-33: Bode-Diagramm (A) und Cole-Cole Auftragung (B) einer WK3SH/6MH-Monoschicht (1:4 (n/n), SAM, orange) sowie der darauf gebildeten H<sub>V</sub>1-haltigen Lipiddoppelschicht (tBLM, grau). (A) Sowohl das Spektrum der SAM als auch der tBLM, können in einen Bereich resistiven ( $4 \cdot 10^3$  bis  $10^4$  Hz) und einen Bereich kapazitiven, frequenzabhängigen ( $10^{-1}$  bis  $4 \cdot 10^3$  Hz) Verhaltens unterteilt werden. Ersteres wird vor allem durch den Elektrolytwiderstand bestimmt. Die Impedanz ist nach dem Spreiten der Membran gegenüber der der SAM gestiegen. (B) Aus der Auftragung des Imaginärteils gegen den Realteil (Cole-Cole Plot) können Veränderungen der kapazitiven Eigenschaften anhand des Radius des Halbkreises abgelesen werden. Aufgetragen sind die spezifischen Kapazitäten, diese beträgt nach dem Spreiten etwa 50 % des zuvor bestimmten Wertes. Das korrigierte Protein-zu-Lipid-Verhältnis der Proteoliposomen betrug 1:10000 (n/n). Pufferzusammensetzung: 10 mM HEPES, 5 mM KCl, pH 4.

Das Bode-Diagramm der SAM und der tBLM, sowie die Kurve der Datenanpassung des Bode-Diagramms im Bereich von 0.8 bis  $2 \cdot 10^4$  Hz sind in Abbildung 4-33 A dargestellt. Die Spektren zeichnen sich durch einen Bereich resistiven ( $4 \cdot 10^3$  bis  $10^4$  Hz) sowie kapazitiven, frequenzabhängigen ( $10^{-1}$  bis  $4 \cdot 10^3$  Hz) Verhaltens aus. Ersterer wird vor allem durch den Widerstand des Elektrolyten, des Messpuffers (10 mM HEPES, 5 mM KCl, pH 4) geprägt. Dieser ist auf Grund der geringeren Salzkonzentration relativ groß und liegt im Kiloohm Bereich (siehe Tabelle 4-3). Da bei beiden Messungen der gleiche Puffer verwendet wird, liegen die Spektren in diesem Bereich nahezu übereinander. Im Bereich kapazitiven Verhaltens kann, nach dem Spreiten, eine positive Verschiebung beobachtet werden. Dies spiegelt sich auch in einem Anstieg des durch Anpassung der Daten bestimmten mittleren Widerstandes von  $R_{Mem}(SAM) = 47$  M $\Omega$  auf etwa  $R_{Mem}(tBLM) = 80$  M $\Omega$  wider. Indes nimmt die korrespondierende spezifische Kapazität der tBLM ( $C_{tBLM}$ ), welche sich aus der reziproken Summe der reziproken Kapazität des  $C_{Mem}$  und dem CPE-Element errechnet, von  $C_{tBLM}(SAM) = 1.49$   $\mu F \cdot cm^{-2}$  auf  $C_{tBLM}(tBLM) = 1.0$   $\mu F \cdot cm^{-2}$  ab. Sowohl Membranen welche H<sub>V</sub>1 enthalten, als auch Membranen der ohne Protein erreichen hierbei ähnlichen Werte. Dies gilt auch für  $R_{Mem}$  und  $R_{el}$ . Der Phasenwinkel im Bereich resistiven Verhaltens lag bei 6–9° und stieg auf ein Maximum von 84–86° im Bereich der frequenzabhängigen Impedanz. Der Abfall des Phasenwinkels im Bereich von  $10^5$  Hz bis  $10^4$  Hz ist der Verwendung einer Referenzelektrode geschuldet, deren Kabel in diesem Bereich ein Signal einbringt.

Die aus der zugehörigen Cole-Cole-Auftragung durch ablesen ermittelte, spezifische Kapazität ( $C_{spez}$ ) liegt im Fall der SAM mit  $1.42 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  in einem Bereich, welcher ebenfalls durch die Datenanpassung der Kurven des Bode-Diagramms bestimmt wurde. Für die  $H_V1$ -beinhaltende Membran wurde jedoch ein geringerer Wert von  $0.66 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  und Membranen ohne Protein von  $0.55 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  bestimmt.

Die Werte der Parameter der Abstandshalterschicht  $R_{\text{spacer}}$  und  $CPE$  sind nicht aussagekräftig in Bezug auf Ausbildung einer Lipiddoppelschicht. Daher wird auf diese nicht näher eingegangen.

Tabelle 4-3: Gemittelte Ergebnisse und Fehler der nicht-linearen Anpassung (im Bereich  $0.8\text{-}2\cdot 10^4$  Hz) der Impedanzspektren mittels  $R(RC)(RCPE)$ -Ersatzschaltbild (siehe Abb. 4-29). Des Weiteren ist auch die aus der Cole-Cole Auftragung abgelesene spezifische Kapazität angegeben. Die Lipidanker gestützte Lipiddoppelschicht wurde durch Spreiten von POPC/POPG/Chol (55:25:20) Liposomen auf einer Wk3SH/6MH-Monoschicht (1:4 ( $n/n$ )) ausgebildet.

<i>Parameter</i>	<i>SAM</i>	<i>tBLM</i>	<i>tBLM</i>
	( <i>N</i> = 12)	( <i>H<sub>V</sub>1</i> ; <i>N</i> = 8)	( <i>Blindprobe</i> ; <i>N</i> = 5)
$R_{el} / \text{k}\Omega$	$4.3 \pm 0.7$	$4.9 \pm 0.8$	$4.6 \pm 1.4$
$R_{Mem} / \text{M}\Omega$	$47 \pm 35$	$82 \pm 99$	$79 \pm 98$
$C_{Mem} / 10^{-8} \text{ F}$	$7.8 \pm 2.1$	$5.1 \pm 1.2$	$4.5 \pm 8.7$
$R_{\text{spacer}} / \text{M}\Omega$	$0.8 \pm 2.6$	$0.24 \pm 0.24$	$0.35 \pm 0.26$
$A / \mu\text{F s}^{-1}$	$21 \pm 31$	$99 \pm 61$	$50 \pm 59$
$\alpha$	$0.46 \pm 0.22$	$0.71 \pm 0.1$	$0.8 \pm 0.1$
$C_{iBLM} / \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$	$1.49 \pm 0.61$	$1.0 \pm 0.26$	$1.0 \pm 0.2$
$C_{spez} \text{ (Cole-Cole)} / \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$	$1.42 \pm 0.378$	$0.66 \pm 0.11$	$0.55 \pm 0.05$

## Ergebnisse

### 4.4.2 Charakterisierung des spannungsabhängigen Impedanzverhaltens der tBLM

Die spannungsabhängige elektrophysiologische Charakterisierung des rekombinanten  $H_V1$ -Kanals sollte mittels Impedanzspektroskopie erfolgen, da die Leitfähigkeit des Kanals sehr gering ist und daher die Verwendung von Einzelkanalmessungen erschwert. Zudem sollen, nachdem die Aktivität des Kanals bestätigt wurde, anhand eines analogen Systems spannungsabhängige SEIRA-Studien erfolgen (vgl. Kapitel 4.5). Hieraus soll auf potentialabhängige Konformationsänderung des Kanals geschlossen werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Gleichspannungen an die SAM und die gebildeten tBLMs im Bereich von +150 mV bis -150 mV angelegt.

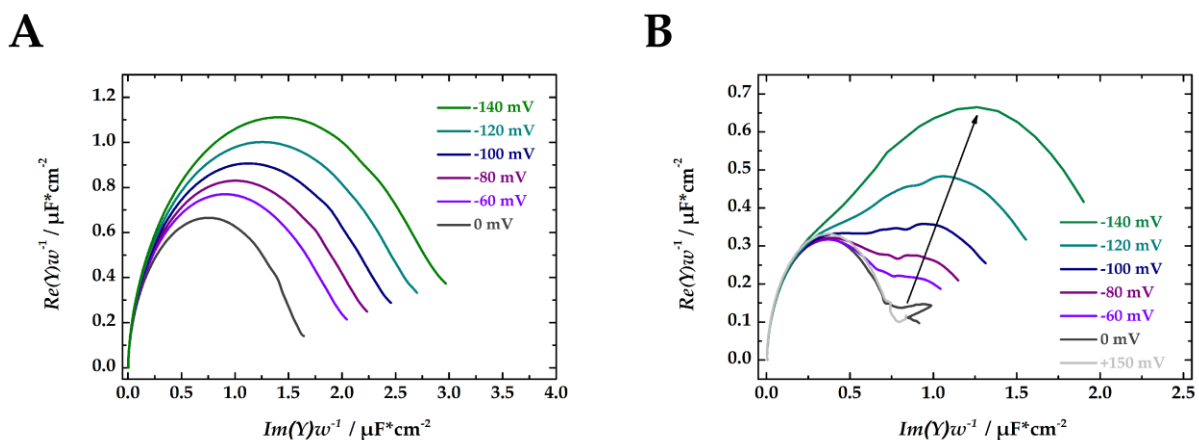


Abbildung 4-34: Cole-Cole-Auftragung der spannungsabhängigen impedanzspektroskopischen Charakterisierung der SAM (A) und des  $H_V1$ -Protonenkanals einer POPC/POPG/Chol (55:25:20) Lipidmembran (B). (A) Die Steigerung der negativen Spannung führt zu einer Verschiebung des Maximums der Kapazität von etwa 1.32  $\mu F \cdot cm^{-2}$  bei 0 mV auf 2.22  $\mu F \cdot cm^{-2}$  bei -140 mV. Dies entspricht einem Faktor von etwa 1.7. (B) Das reale Protein-zu-Lipid-Verhältnis der Proteoliposomen betrug 1:10000 ( $n/n$ ). Die Erhöhung der Spannung auf bis zu +150 mV führte zu keiner Änderung. Ab einer Spannung von -60 mV konnte indes ein Anstieg der Kapazität bzw. die Ausbildung eines zweiten Halbkreises beobachtet werden. Aus der  $R(RC)(RCPE)$ -Anpassung der Daten wurde ein mittlerer Anstieg um den Faktor  $2.0 \pm 0.4$  ermittelt. Dargestellt ist der Frequenzbereich von  $10^6$  bis  $10^1$  Hz. Pufferzusammensetzung: 10 mM HEPES, 5 mM KCl, pH 4.

Die in Abbildung 4-34 dargestellten Spektren sind exemplarisch für die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Untersuchungen. Es zeigt sich, dass bei einer positiven Spannung, hier verdeutlicht anhand einer Gleichspannung von +150 mV (gegen die Ag/AgCl-Referenzelektrode) keine Änderung der spezifischen Kapazität der tBLM auftritt (vgl. Abbildung 4-34 B). Jedoch kann bereits bei geringen negativen Spannungen ein Anstieg der Kapazität sowie das Auftreten eines zweiten Halbkreises beobachtet werden, dessen Kapazität im Bereich von -80 mV bis -100 mV die Kapazität des ersten übersteigt. Jedoch sind diese nicht deutlich voneinander differenzierbar (vgl. Abbildung 4-37 der SEIRA zugehörigen tBLM-Präparation). Für  $H_V1$ -haltige Membranen wurde bei einer Gleichspannung von -150 mV eine mittlere Änderung der relativen, spezifischen Kapazität

um den Faktor  $2.0 \pm 0.4$  ermittelt. Die Blindmessungen an proteinfreien POPC/POPG/Chol-Membranen zeigten eine ähnliche Spannungsabhängigkeit der Kapazitäten. Es konnte hierbei ein entsprechender Faktor von  $1.8 \pm 0.4$  bestimmt werden. Anhand der Anpassung der Daten durch das R(RC)(RCPE)-Ersatzschaltbild konnte jeweils ein ähnlicher Wert bestimmt werden. Die quantitative Analyse der Änderung des Widerstandes war auf Grund einer ungenügenden Genauigkeit der Anpassung jedoch nicht möglich. Lediglich eine qualitative Abnahme des Widerstandes bei negativer Spannung wurde bestätigt. Diese lag für Blindvesikel wie Proteoliposomen in einem vergleichbaren Bereich.

Auf Grund der nicht separierbaren Halbkreise der Cole-Cole-Auftragung sowie dem Umstand, dass die Spektren der darunterliegenden SAM ebenfalls eine spannungsabhängige Verschiebung der Halbkreismaxima aufwiesen (vgl. Abbildung 4-34 A), wurde eine Strategie zur Auswertung beruhend auf Arbeiten von Giaever *et al.* verfolgt.<sup>[162]</sup> Diese wurde im Rahmen der Entwicklung der *Electric Cell-Substrat Impedance Sensing* (ECIS) Methode etabliert. Hierbei wird die Gesamtheit der imaginären Anteile ( $Z''$ ) kapazitivem (vgl. Gleichung 3-28) und die Gesamtheit der realen Anteile ( $Z'$ ) resistivem Verhalten (vgl. Gleichung 3-27) zugeordnet. Zudem werden bei der Auswertung die jeweiligen Spektren der Impedanz bzw. des Widerstandes der zellbedeckten Substrate ins Verhältnis zu den Spektren der zellfreien Substraten gesetzt.<sup>[162,163,184]</sup> Übertragen auf das vorliegende System entspricht die tBLM dem zellbedeckten und die SAM dem zellfreien Substrat. Die Daten wurden somit normiert. Die Auswertung nach diesem Verfahren ermöglicht eine differenziertere und quantitative Auswertung der Widerstandsänderung in Abhängigkeit der Gleichspannung und erlaubt eine getrennte Betrachtung und Analyse von Kapazität und Widerstand. Aus der Normierung der Daten nach Gleichung 3-29 und 3-30, welche Mithilfe eines Matlab Skriptes (siehe Kapitel 8.4) automatisiert wurde, folgt somit auch eine Berücksichtigung der spannungsabhängigen Eigenschaften der SAM. Die normierten Spektren sind in Abbildung 4-35 aufgetragen. Hierbei wurden dieselben Datensätze ausgewertet, welche auch den Cole-Cole Auftragungen in Abbildung 4-34 zugrunde liegen.

## Ergebnisse

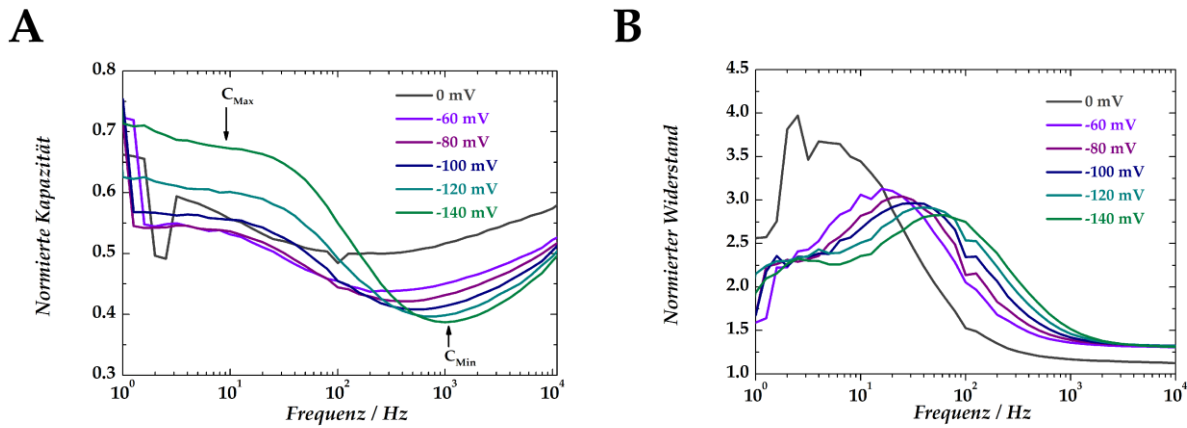


Abbildung 4-35: Getrennte Auftragung der normierten kapazitiven und resistiven Anteile der Impedanzspektren der H<sub>V</sub>1-tBLM aus Abbildung 4-34 gegen die Frequenz. (A) Die normierten, kapazitiven Beiträge weisen in einem Frequenzbereich von 10<sup>3</sup>-10<sup>2</sup> Hz einen Anstieg auf. Die Stärke des Anstiegs nimmt mit negativeren Gleichspannungen zu. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Differenz der minimalen (C<sub>Min</sub>) und maximalen (C<sub>Max</sub>) Beiträge ermittelt. C<sub>Max</sub> wurde jeweils bei 10<sup>1</sup> Hz bestimmt. Die relative Änderung der Differenzen bei einem Potential von -140 mV besitzt einen Faktor von 4.7. (B) Aus der Auftragung der normierten, resistiven Anteile ist ersichtlich, dass der Widerstand ein Maximum zwischen 10<sup>1</sup> und 10<sup>2</sup> Hz erreicht, dessen Wert mit negativeren Potentialen abnimmt. Die relative Abnahme bei -140 V beträgt etwa 25 %.

Aus der Auswertung der normierten Spektren konnte zunächst kein Unterschied zwischen dem resistiven wie kapazitiven Verhalten der Blindproben und der H<sub>V</sub>1-tBLM abgeleitet werden. Daher wurde eine genauere Auswertung der Spektren vorgenommen. Diese wird im Folgenden beschrieben.

Die Spektren der normierten kapazitiven Anteile, hier dargestellt für eine H<sub>V</sub>1-tBLM, weisen ein Maximum (C<sub>Max</sub>) bei etwa 1 Hz auf sowie ein Minimum (C<sub>Min</sub>) im Bereich von 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> Hz (siehe Abb. 4-33 A). Dieses verschiebt sich mit steigendem negativem Potential zu höheren Frequenzen. Ein Anstieg ist gleichbedeutend mit einer Verringerung des Verhältnisses zwischen der Impedanz der tBLM und der der SAM. Für eine genauere Analyse der Spannungsabhängigkeit wurde die Differenz der normierten Kapazitäten ( $\Delta C$ ) zwischen C<sub>Max</sub> und C<sub>Min</sub> berechnet. Das Maximum zur Berechnung der Differenz wurde einheitlich bei 10 Hz bestimmt, da wie aus den Spektren ersichtlich, ein starkes Rauschen im Bereich zwischen 1-10 Hz vorlag. Im gleichen Frequenzbereich in dem ein Anstieg der Kapazität beobachtet werden kann, tritt auch ein Anstieg des Widerstandes auf. Dieser erreicht ein Maximum zwischen 10 und 100 Hz, welches sich bei negativeren Potentialen zu höheren Frequenzen verschiebt. Der Betrag des Widerstandes nimmt jedoch mit steigendem negativem Potential ab.

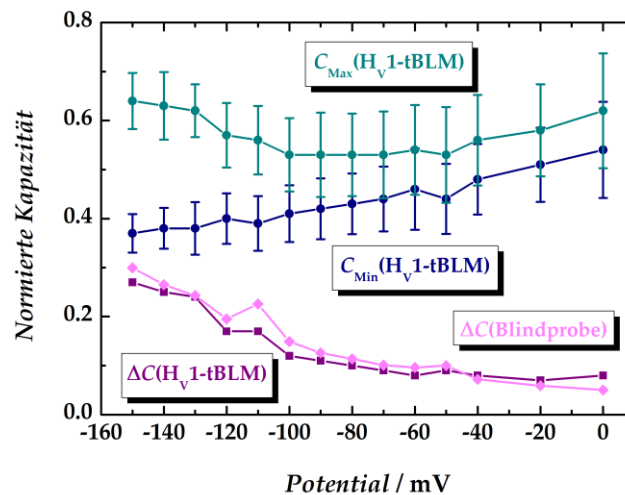


Abbildung 4-36: Auftragung der gemittelten minimalen ( $C_{Min}$ ) und maximalen Kapazitäten ( $C_{Max}$ ) der  $H_V1$ -tBLM in Abhängigkeit des angelegten Membranpotentials. Die Werte für  $C_{Max}$  sinken bei kleinen negativen Potentialen und besitzen ein unverändertes Niveau im Bereich von  $-50$  mV bis  $-100$  mV. Anschließend erfolgt ein konstanter Anstieg.  $C_{Min}$  nimmt über den gesamten Potentialbereich kontinuierlich ab. Aus der Differenz der normierten Kapazitäten ( $\Delta C$ ) resultiert ein stetiger Anstieg von 0.08 auf 0.27 mit zunehmendem negativem Potential. Die Spannungsabhängigkeit  $\Delta C$ -Werte der Blindproben ist nahezu identisch.

Wie aus Abbildung 4-36 ersichtlich fallen die gemittelten Werte der maximalen Kapazitäten  $C_{Max}$  ( $N = 6$ ) mit negativerem Potential ab, erreichen ein gleichbleibendes Niveau bei  $-50$  mV bis  $-100$  mV. Anschließend steigen sie ab einem Potential von  $-110$  mV wieder an. Wohingegen die minimalen Kapazitäten  $C_{Min}$  antiproportional zum zunehmenden negativen Potential kontinuierlich sinken. Die Differenz der gemittelten, normierten Kapazitäten steigt mit wachsendem Membranpotential. Der Anstieg kann hierbei in zwei Stufen unterteilt werden. Erstere, im Spannungsbereich von  $0$  mV bis  $-100$  mV, erfolgt mit geringen Steigung von etwa  $4 \cdot 10^{-4} \text{ mV}^{-1}$ . Die Zunahme der Kapazität im zweiten Bereich ( $-100$  mV bis  $-160$  mV) verläuft hingegen mit der 7-fachen Steigungsrate von  $0.003 \text{ mV}^{-1}$ . Anhand der Messung von tBLM-Blindproben ( $N = 4$ ), wurde ein analoges spannungsabhängiges Verhalten der untersuchten Parameter  $C_{Max}$  und  $C_{Min}$  beobachtet. Die hier dargestellten  $\Delta C$ -Werte der Blindproben sind nahezu identisch zu den Werten der  $H_V1$ -tBLM und weisen einen Anstieg von 0.05 auf 0.3 auf. Die Beträge der normierten Maxima der Widerstände sinken bei einer Spannung von  $-140$  mV im Fall der Präsenz des  $H_V1$ -Kanals auf etwa 82 % und bei den Blindproben auf 89 % des Ausgangswertes bei  $0$  mV ab. Sie weisen somit ebenfalls keinen signifikanten Unterschied auf.

## 4.5 Charakterisierung des $H_V1$ -Protonenkanals mittels SEIRA-Spektroskopie

Wie auch die impedanzspektroskopischen Analysen, wurde die Charakterisierung des  $H_V1$ -Protonenkanals auf Basis einer trägerfixierten Lipiddoppelschichtmembran (engl. *tethered bilayer lipid membrane*) gestützt durch oberflächenverstärkte Infrarotabsorptionsspektroskopie (engl. *surface-enhanced infrared absorption spectroscopy*, SEIRA-Spektroskopie) durchgeführt. Zunächst sollte die erfolgreiche Insertion des Proteins in die Membran bestätigt und in einer anschließenden Untersuchung aus einer Korrelation der applizierten Spannung und der Änderung der Schwingungsmoden im Infrarot-Spektrum des  $H_V1$ -Kanals, Schlüsse auf strukturelle, potentialabhängige Konformationsänderungen während des Öffnens und Schließens ermöglicht werden. Die tBLM wurde analog zu den Impedanzstudien präpariert und der Aufbau des Systems wurde durch Impedanzspektroskopie verfolgt. Die Präparation der SEIRA-Substrate und die Ausführung der Messungen der SEIRA-Spektroskopie erfolgten, im Rahmen einer Kooperation, durch Dr. Jacek Kozuch und Enrico Forbrig im Arbeitskreis Prof. Dr. Peter Hildebrandt an der Technischen Universität Berlin. Exemplarischen Spektren einer selbstorganisierten WK3SH/6MH-Monoschicht (WK3SH/6MH-SAM) und der hierauf gespreiteten Lipiddoppelschichtmembran sind in Abbildung 4-37 dargestellt.

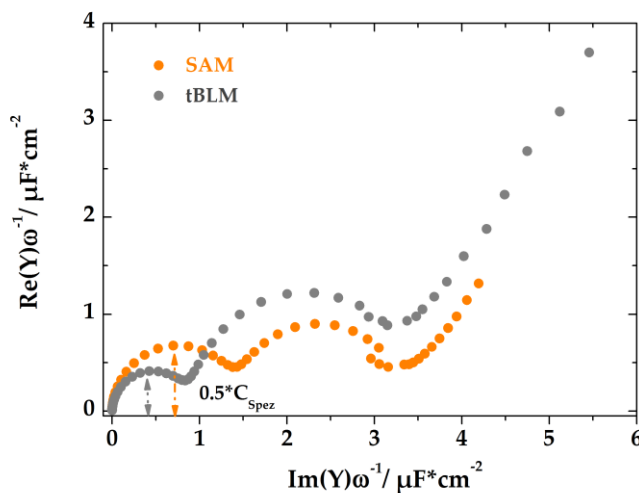


Abbildung 4-37: Cole-Cole Auftragung des WK3SH/6MH-SAM (70:30 ( $n/n$ ), orange) der SEIRA Präparation, sowie das Spektrum nach dem Spreiten der  $H_V1$ -Proteoliposomen (grau). Diese besaßen eine Lipidzusammensetzung von POPC/POPG/Chol (55:25:20) und ein P/L von 1:17300 ( $n/n$ ). Die Auftragungen weisen eine deutliche Änderung der Kapazitäten, vor und nach dem Spreiten, auf. Diese wurden anhand des Radius des ersten Halbkreises ermittelt und betrugen  $1.4 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  für die SAM und  $0.8 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  für die tBLM. Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES; 100 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 4.

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Impedanzmessungen zur Charakterisierung der Spannungsabhängigkeit des  $H_V1$ -Protonenkanals, sind die zwei Halbkreise der Cole-Cole-



Auftragung voneinander differenzierbar. Anhand dieser konnte eine Änderung der spezifischen Kapazität durch Spreiten der Proteoliposomen von  $1.4 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  auf  $0.8 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  bestimmt werden. Die annäherungsweise Halbierung der spezifischen Kapazität ist Indiz für die erfolgreiche Bildung einer Lipiddoppelschicht. Das SEIRA-Spektrum dieser Schicht ist in Abbildung 4-38 dargestellt. Zudem wurde ein weiteres Spektrum der Membran nach dem erneuten Spülen mit Puffer, dargestellt in rot, aufgetragen. Durch das Spülen wurde der Spreitvorgang beendet und überschüssige Lipide in der Lösung wurden entfernt.

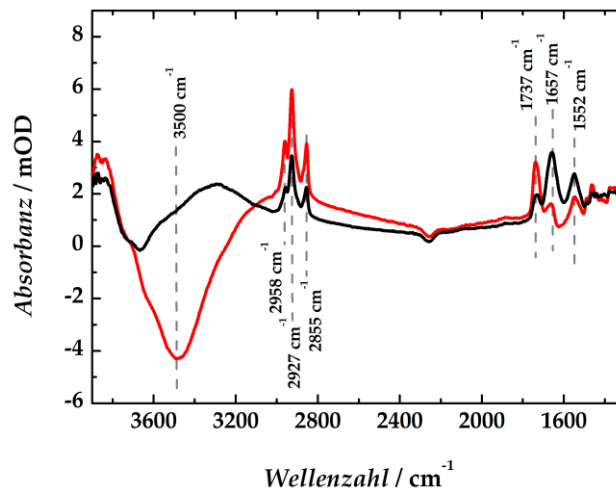


Abbildung 4-38: SEIRA-Differenzspektrern, unter Nutzung des SAM-Spektrums als Referenz, nach Adsorption der Proteoliposomen der Lipidzusammensetzung POPC/POPG/Chol (55:25:20, P/L = 1:17300 ( $n/n$ ), schwarz) auf der SAM-Oberfläche und nach dem erneuten Spülen der Membran mit Puffer (rot). Die Banden im Bereich von 2900–3000  $\text{cm}^{-1}$  sind charakteristisch für C-H-Schwingungen und werden den Lipiden der Doppelschicht zugeordnet. Die Bande bei 1737  $\text{cm}^{-1}$  ist der C=O-Steckschwingung der Lipide zuzuordnen. Der Intensitätsanstieg der Lipidschicht zugehörigen Banden nach dem Spülen deutet auf ein zusätzliches Spreiten von Vesikeln hin. Dieses geht mit einer Verdrängung von Wasser einher und spiegelt sich in einer negativen OH-Bande bei etwa 3500  $\text{cm}^{-1}$  wider. Die positiven Banden bei 1657  $\text{cm}^{-1}$  und 1552  $\text{cm}^{-1}$  sind charakteristisch für die Amid-I und Amid-II Banden  $\alpha$ -helikaler Strukturelementen von Proteinen in  $\text{H}_2\text{O}$ .<sup>[185,186]</sup> Da die breite negative Bande der  $\text{H}_2\text{O}$ -Biegeschwingung in diesem Bereich überlagert, sind die Intensitäten der Amid-I und Amid-II-Banden nach dem Spülen reduziert. Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES; 100 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 4.

Das Spektrum nach der Inkubation der SAM mit Proteoliposomen, dargestellt in schwarz, weist mehrere charakteristische Banden auf, welche reproduziert werden konnten. Die Bandenschar in einem Wellenzahlenbereich von etwa 2800–3000  $\text{cm}^{-1}$  (2958  $\text{cm}^{-1}$ , 2927  $\text{cm}^{-1}$ , 2855  $\text{cm}^{-1}$ ) weist nach dem erneuten Spülen eine erhöhte Intensität auf. IR-Signale in diesem Bereich können im Allgemeinen C-H-Streckschwingungen zugeordnet werden. In diesem Fall sind sie den Lipiden der Membran zuzuweisen. Hierzu zählt ebenso die Bande bei 1737  $\text{cm}^{-1}$  welche charakteristisch für die C=O-Streckschwingung der Lipide ist. Ein Indiz hierfür ist, dass sich die Intensität der Banden nach dem Spülen vergrößert, während sich gleichzeitig die Intensitäten der der Streck- und Biegeschwingung des Wassers bei etwa

## Ergebnisse

3500  $\text{cm}^{-1}$  und 1650  $\text{cm}^{-1}$  verringern. Hieraus lässt sich ableiten, dass weitere Vesikel spreiten und somit Wasser von der Oberfläche verdrängen. Zwei weitere Banden wurden bei 1657  $\text{cm}^{-1}$  und 1552  $\text{cm}^{-1}$  beobachtet. Sie liegen in einem Bereich, indem die Absorption der Amid-I und Amid-II Bande des Peptidrückgrats von wassergelösten Proteinen auftritt.<sup>[185]</sup>

## 5 Diskussion

Die physiologische Bedeutung des spannungsgesteuerten Protonenkanals  $H_V1$  macht diesen zu einem möglichen Ziel für Medikamente. Für therapeutische Zwecke ist sowohl die Kenntnis von Inhibitoren als auch Aktivatoren des Kanals relevant. Zudem eignet sich der, im Vergleich zu anderen spannungsgesteuerten Kationenkanälen, kleine Kanal als Modellsystem für Studien von spannungsgesteuerten,  $\alpha$ -helikalen Membranproteinen mittels SEIRA-Spektroskopie.

Zunächst wurde die Isolation des rekombinanten Proteins aus *E. coli* sowie dessen Rekonstitution in kleine unilamellare Vesikel im Rahmen dieser Arbeit untersucht und ein Protokoll für diese Prozedur etabliert. Zudem wurde die korrekte Rückfaltung des Proteins mittels Circular dichroismus-Spektroskopie kontrolliert und dessen Aminosäuresequenz durch Flüssigkeitschromatographie gekoppelte Massenspektrometrie analysiert. Der Nachweis der Insertion in die Membran erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation. Ein bestehender fluoreszenzbasierter Protonenfluss-Test, unter der Verwendung des pH-sensitiven, membrangängigen 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridins (ACMA), diente zur Kontrolle der Proteinfunktionalität. Hierbei wird seitens einer Änderung des Membranpotentials, welche durch eine Valinomycin induzierte Kaliumtranslokation ausgelöst wurde, die Öffnung des Kanals hervorgerufen. Des Weiteren erlaubte der Fluxtest eine Quantifizierung der inhibierenden Wirkung des 2-Guanidinbenzimidazols (2GBI). Auf Grundlage des lipidgekoppelten und pH-sensitiven Oregon Green 488-DHPE (OG488-DHPE)-Fluorophors wurde zusätzlich ein Fluxtest zur quantitativen Ermittlung des Protonenstroms und der damit einhergehenden pH-Änderung adaptiert. Eine effiziente Rekonstitution bildete die Voraussetzung für den Aufbau eines *tethered bilayer lipid membrane* (tBLM)-Modellsystems zur impedanzspektroskopischen Charakterisierung des spannungsgesteuerten Protonenkanals. Hierzu wurden die Änderungen der kapazitiven und resistiven Eigenschaften des Systems während der spannungsabhängigen Impedanzspektroskopie analysiert. Für den Aufbau der selbstorganisierenden Monoschicht, auf der die Membran gespreitet wurde, wurde Dihydrocholesteryl-2-(2-(2-ethoxy)ethoxy)ethanthiol (WK3SH) als Abstandshalter eingesetzt. Dieser besitzt im Gegensatz zu (Cholesterylpolyethylenoxy)thiol (CPEO3) keine Carbamatfunktion. Hieraus resultiert eine Optimierung der oberflächenverstärkten Infrarotabsorptions-Spektroskopie (engl. *surface-enhanced infrared absorption spectroscopy*, SEIRA-Spektroskopie), da keine Interferenz der IR-Banden dieser speziellen Esterbindung, mit den Amidbanden der Aminosäuren innerhalb der SEIRA-Spektren auftreten kann. Eine Analyse des Spreitverhaltens der Proteoliposomen auf der WK3SH/6MH-Monoschicht, welches anhand von Impedanzspektroskopie analysiert wurde, ging den SEIRA-Studien voraus. Die SEIRA-

## Diskussion

Messungen wurden, im Rahmen einer Kooperation, durch Enrico Forbrig und Dr. Jacek Kozuch im Arbeitskreis von Prof. Dr. Peter Hildebrandt (TU Berlin) durchgeführt.

## 5.1 Heterologe Expression des H<sub>V</sub>1-Protonenkanals

Die heterologe Expression rekombinanter Proteine bietet einen einfachen Zugang zu einer Vielzahl von Proteinen. Dabei stellen Membranproteine, welche etwa 20–30 % des humanen Genoms ausmachen, eine besondere Herausforderung bei der Isolation dar.<sup>[3]</sup> Denn die Solubilisierung des korrekt gefalteten, intakten Proteins aus der Zellmembran des Expressionssystems oder die Bildung von Einschlusskörperchen, sogenannter *Inclusion Bodies*, erschweren diese.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Protokoll zur Überexpression des Fusionproteins des humanen spannungsgesteuerten Protonenkanals aus *E. coli* etabliert.

### 5.1.1 Isolation des Plasmids pH<sub>V</sub>1WT

Anhand von Agarose-Gelelektrophorese konnte die erfolgreiche Ligation der Ursprungssequenz des Protonenkanals mit dem Zielvektor bestätigt werden. Das so gebildete Plasmid wird im Folgenden als pH<sub>V</sub>1WT bezeichnet. Der Nachweis eines deutlichen Einzelkoloniewachstum im Anschluss an die Transformation bestätigt das Vorliegen eines intakten Plasmids, da dieses eine Antibiotikaresistenz gegen Kanamycin kodiert, welches den Agarplatten zur Selektion hinzugesetzt wurde.<sup>[110]</sup> Den klaren Nachweis der Umklonierung lieferte eine Sequenzierung des Plasmids durch die Firma SeqLab (Göttingen). Die vollständige Nukleinsäuresequenz des Proteins, welche im Anhang 8.2 aufgeführt ist, konnte sowohl durch den T7-Promoter Primer als auch den T7-Terminator-Primer abgelesen werden. Die Analyse der Sequenz mit der Sequenz, welche für das humane H<sub>V</sub>1-Protein (Referenz: Uniprot Q96D96) beschrieben wurde, bestätigte, dass das H<sub>V</sub>1-Protein korrekt kodiert wird und dass Mutationen der DNA ausgeschlossen werden können.

### 5.1.2 Zellkultivierung der Stämme BL21 Gen-X und BL21(DE3)

Das Wachstum während der Zellkultivierung bei 37 °C wurde mittels UV/vis-Spektroskopie verfolgt. Sowohl die BL21 Gen-X- als auch die BL21(DE3)-Zellen folgten während ihrer Kultivierung, im Anschluss an die Transformation des pH<sub>V</sub>1WT Plasmids, dem erwarteten Verlauf des Bakterienwachstums (siehe Abbildung 4-3). Während der lag-Phase konnte eine Verdopplungszeit von etwa 43 min ermittelt werden. Diese liegt über den von Sezonov *et al.*

für die Kultivierung des *E. coli*-Stammes K-12 MG1655 in LB-Medium genannten 20 min.<sup>[187]</sup> Bei der Studie wurde jedoch nicht der Einfluss der Expression eines Proteins berücksichtigt. Diese hat nach Bentley *et al.* einen verlangsamenden Einfluss.<sup>[188]</sup> Untersucht wurde dieser anhand der Auswirkung des Gehaltes des exprimierten Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Enzyms des *E. coli* RR1. Diese Studie bietet einen Ansatz zur Erklärung, wieso eine weitere Verdopplung der Zelldichte nach der IPTG-Zugabe ausblieb, während ein anhaltendes Wachstum im IPTG-freien Fall beobachtet werden konnte. Des Weiteren erfolgte die Kultivierung bei pH 8 statt optimalen pH 7. Dies führt zu einem leicht verlangsamten Wachstum wie Wang *et al.* zeigten.<sup>[189]</sup> Der frühe Übergang in eine Absterbephase kann als einen vermehrten Energie/Nahrungsbedarf für die Expression von Proteinen bzw. die Expression zelltoxischer Proteine interpretiert werden. Und dient somit als Indiz für eine Induktion der Überexpression des H<sub>v</sub>1-Proteins, durch das T7-Expressionssystem.

### 5.1.3 Isolation und Aufreinigung des H<sub>v</sub>1-Proteins aus *Inclusion Bodies*

In den SDS-Gelen, anhand derer die Isolation und Aufreinigung des Proteins des spannungsgesteuerten H<sub>v</sub>1-Protonenkanals verfolgt wurde, konnte eine wiederkehrende Bande von etwa 40 kDa ausgemacht werden. Zunächst wurde diese im Pellet der Zentrifugation, im Anschluss der Zellyse, identifiziert (vgl. Abbildung 4-5). Dies war das erste Indiz, dass es sich bei dem zugehörigen Protein um das H<sub>v</sub>1-Membranprotein handelt.<sup>[25,1]</sup> Zudem ist die Bande im Gegensatz zu den Übrigen deutlich überladen, woraus auf eine Überexpression des Proteins geschlossen werden kann.

### Solubilisierung des spannungsgesteuerten Protonenkanals

Im Rahmen eines *Screenings* von Detergenzien zur Solubilisierung des Proteins wurden das zwitterionische CHAPS und SulfoBetain-12 (SB-12) als ungeeignet identifiziert (siehe 4.1.4). Li *et al.* bestätigten bereits die unzureichenden Eigenschaften des CHAPS bei Solubilisierung der spannungsdetektierenden Domäne (engl. *voltage-sensing domain*, VSD), der spannungsabhängigen Phosphatase (engl. *voltage-sensing phosphatase*, VSP) aus *Ciona intestinalis* (C<sub>i</sub>-VSP).<sup>[27]</sup> Die spannungsdetektierende Domäne der VSP aus *Ciona intestinalis* (C<sub>i</sub>-VSD) besitzt eine dem H<sub>v</sub>1-Kanal homologe Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur.<sup>[159,190]</sup> Als geeignete Tenside zur Lösung des Proteins präsentierten Li *et al.* zwitterionische *n*-Alkylphosphocholine einer Kohlenstoffkettenlänge von 10–14 Kohlenstoffatomen (FC-10, FC-12, FC-14) sowie die SulfoBetaine SB-12 und SB-14. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Ein Erklärungsansatz hierfür ist die wahrscheinliche Bildung von *Inclusion Bodies* während der heterologen Expression des

## Diskussion

Proteins, wie sie ebenso bei der rekombinanten Isolation der spannungssensitiven Domäne (AS 100–243) des humanen KCNQ1 Kaliumionenkanals beschrieben wurde.<sup>[191]</sup> Diese entsprechen dichten Aggregaten aus unvollständig gefaltetem Protein und erschweren somit die Solubilisierung. Peng *et al.* beschrieben FC-12, Dihexanoylphosphatidylcholin und eine Mischung aus 8 M Harnstoff mit 0.2 % Natriumdodecylsulfat (SDS) als mögliche Detergenzien zur Lösung des KCNQ1-Proteins aus den *Inclusion Bodies*. Ende des Jahres 2015 publizierten Li *et al.* ebenfalls die Isolation des rekombinanten spannungsgesteuerten Protonenkanals aus *E. coli*. Hierbei wurde dieser durch eine 2 mM FC-14-Lösung in Trispuffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8) solubilisiert. Während der zweiten Aufreinigung über Größenausschlusschromatographie wurde diese durch eine 4 mM FC-12-Lösung in Trispuffer ausgetauscht.<sup>[79]</sup>

Neben dem negativ geladenen SDS wurde die solubilisierende Wirkung des neutralen *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM) sowie des *n*-Decyl- $\beta$ -D-maltosidpyranosid (DM), im Rahmen der vorliegenden Arbeit, nachgewiesen (siehe Abbildung 4-6). Hierbei wurde ein Konzentrationsbereich von 0.25–1 % (*w/v*) untersucht. Eine 1 %ige Lösung ist äquivalent zu einer Konzentration von 35 mM SDS, 20 mM DDM oder 21 mM DM. Die Löslichkeit des H<sub>v</sub>1-Proteins durch DDM sowie SB-12, jeweils in einer Konzentration von 20 mM, wurde im Jahr 2014 in einer Studie von Agharkar *et al.* beschrieben.<sup>[192]</sup> Hierbei wurde ein *enhanced green fluorescent protein-Tag* (EGFP) *N*-terminal fusioniert und dieses in einem Baculovirus exprimiert. Die Stabilität des Proteins im untersuchten Detergens wurde durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die erfolgreiche Isolation des humanen spannungsgesteuerten Protonenkanals aus *Pichia pastoris* mittels DDM (0.15 g je g Zellmasse) wurde bereits zuvor durch Lee *et al.* beschrieben.<sup>[1,192]</sup> Die Studie belegte nach der erfolgreichen Rekonstitution des Proteins in unilamellare Vesikel, dass dieses alleine für die Protonenleitung verantwortlich ist. Bei der zweiten Aufreinigung des H<sub>v</sub>1-Proteins mittels Größenausschlusschromatographie sowie der Rekonstitution wurde DM in einer Konzentration von 4 mM bzw. 20 mM eingesetzt. DM bietet gegenüber DDM bessere Dialyseeigenschaften. Takeshita *et al.* publizierten 2014 die Kristallstruktur eines chimären mH<sub>v</sub>1cc-Kanals.<sup>[88]</sup> Dieser wurde aus Baculovirus infizierten Sf9-Zellen ebenfalls mittels 1 %iger (*w/v*) DDM-Puffer-Lösung isoliert und anschließend in 0.2 % (*w/v*) 5-Cyclohexylpentyl- $\beta$ -D-maltosid (CYMAL-5) kristallisiert. Eine 32 mM-Lösung des Detergens wurde zudem erfolgreich bei der Solubilisierung des spannungsgesteuerten Natriumkanals (NavRh) aus *E. coli* eingesetzt.<sup>[24]</sup> Newstead *et al.* analysierten in den Jahren 2008 und 2012 die Bedingungen, unter denen 121 bzw. 254  $\alpha$ -helikale Membranproteine kristallisiert werden konnten. Etwa die Hälfte aller untersuchten Proteine wurde durch Alkylmaltoside gelöst, wobei innerhalb dieser Klasse DDM und DM am häufigsten zum Einsatz kamen. Phosphocholine oder SB-12 machten hingegen nur einen kleinen Teil von unter 5 % aus.<sup>[193,194]</sup>

Die Isolation des Proteins aus dem eingangs erwähnten Pellet, wurde auf Grund der Ergebnisse des Detergens-Screenings mit einer 1 %igen SDS-Lösung durchgeführt. Die

Isolation von Proteinen aus *Inclusion Bodies* erfolgt durch die Denaturierung der Proteine. Hierzu werden vor allem chaotrope Substanzen wie Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid eingesetzt, wobei relativ hohe Konzentration von 6–8 M benötigt werden.<sup>[191,195,196]</sup> Schlager *et al.* untersuchten die Isolation von 17 His<sub>6</sub>-Tag-Fusionsproteinen, aus in *E. coli* gebildeten Proteinaggregaten, in einem Massenbereich von 13–54 kDa. Sie kamen zu dem Schluss, dass SDS (in 1 %iger Lösung) ein geeignetes, denaturierendes Detergens für die Isolation von Proteinen aus *Inclusion Bodies* ist. Da es im Gegensatz zu Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid in einer deutlich geringeren Konzentration eingesetzt wird, ist es zudem kostengünstiger und auf Grund der besseren Löslichkeit (bei Raumtemperatur) für die Automatisierung geeignet.<sup>[197]</sup> Zudem konnte für SDS der teilweise Erhalt der  $\alpha$ -helikalen Struktur der Diacylglycerolkinase aus *E. coli* während der Denaturierung nachgewiesen werden.<sup>[198]</sup> Dies ist bei der Isolation von Proteinen mit einem hohen  $\alpha$ -helikalen Anteil, wie dem H<sub>v</sub>1-Protein, von Vorteil.

### Aufreinigung des H<sub>v</sub>1-Fusionsproteins mittels Affinitätschromatographie

Nach der Inkubation der Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose mit dem Überstand (S2) der zweiten Zentrifugation, konnte eine Abnahme der Proteinkonzentration im Durchlauf im Vergleich zum Überstand S2 beobachtet werden (vgl. Abbildung 4-7 und Abbildung 4-9). Diese folgt aus der erfolgreichen Anbindung des *N*-terminalen His<sub>6</sub>-Tags an die Ni-NTA-Agarose. Dennoch enthält der Durchlauf eine detektierbare Menge an Protein. Da lediglich eine Gesamtmenge von 6.7 mg Protein eluiert wurde, ist dies nicht auf eine Überladung der Agarose zurückzuführen. Diese besitzt laut Herstellerangaben eine Kapazität von bis zu 50 mg/mL.<sup>[199]</sup> Eine Erklärung bietet eine weitere Spezifikation der verwendeten Agarose. Diese rät, basierend auf empirischen Ergebnissen, kein SDS zu nutzen. Das Handbuch besagt jedoch auch, dass dies in einigen Fällen bis zu einer Konzentration von 0.3 % erfolgreich gelungen ist.<sup>[200]</sup> Schlager *et al.* beobachteten ebenfalls eine verminderte Anbindung an die Ni-NTA-Agarose, während der Aufreinigung SDS-solubilisierter Proteine. Basierend auf Arbeiten von Suzuki und Terada, entfernten Sie überschüssiges SDS durch Kühlung der Lösung, sodass dieses ausfiel und abzentrifugiert werden konnte. Der zurückbleibende Überstand wurde auf die Agarose gegeben. Dieser zusätzliche Aufreinigungsschritt resultierte in einer gesteigerten Proteinanbindung.<sup>[201,197]</sup>

Durch einen Waschschrift der Ni-NTA-Säule konnten erfolgreich ungebunden oder schwach gebundene Proteine entfernt werden. Erst durch das Spülen der Säule mit einem imidazolreichen Puffer wurden erhöhte Proteinmengen eluiert. Dabei folgte die Verteilung der Bandenintensitäten der Elutionsfraktionen einem Gaußprofil. Dies bestätigt die Funktionalität des His<sub>6</sub>-Tags. und die damit verbundene affinitätschromatographische Aufreinigung. Eine proteolytische Zersetzung während der Aufreinigung kann ausgeschlossen werden, da die Bande der Verunreinigungen zwischen 10-15 kDa bereits im

## Diskussion

Überstand vorhanden war. Da das zugehörige Protein ebenfalls selektiv eluiert wurde, muss dieses einen His<sub>6</sub>-Tag tragen. Dies konnte anhand eines proteolytischen Trypsin-Verdau und anschließender Analyse mittels Massenspektrometrie bestätigt werden. Anhand von Dichtegradientenzentrifugation konnte gezeigt werden, dass die Proteoliposomen lediglich das vollständig translatierte Protein in einer nachweisbaren Konzentration enthielten. Dies spricht zum einen dafür, dass es sich beim Proteinfragment um einen N-terminalen Teil handelt, welcher keine transmembrane Domäne besitzt. Zum anderen vermeidet dieser Ausschluss des Fragments eine mögliche Beeinflussung der Protonenstrom-Tests. Es könnte auch möglich sein, dass Verunreinigungen in einer nicht-detektierbaren Konzentration vorlagen.

Ein vergleichbarer Verlauf der Isolation und Aufreinigung wurde im Anschluss an die heterologe Expression aus BL21(DE3) beobachtet (siehe Abbildung 4-10). Die Reproduzierbarkeit der Aufreinigung bestätigt die erfolgreiche Etablierung des Protokolls.

## Identifikation des H<sub>v</sub>1-Proteins

Anhand des Gels der SDS-PAGE nach Schägger wurde dem Protein der eluierten und dialysierten Fraktionen, sowohl im Fall der Isolation aus BL21 Gen-X als auch aus BL21(DE3), ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa zugeordnet. Dies ist somit identisch mit der Masse der überexprimierten Proteinbanden in Pellet 1. Durch einen Western Blot auf Basis eines gegen den N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag gerichtet Antikörpers, konnte die Bande dem Fusionsprotein zugeordnet werden. Durch einen Thrombinverdau konnte die Masse des Proteins um etwa 2 kDa reduziert werden. Dies entspricht etwa der molekularen Masse (MW) des Aminosäureabschnitts des His<sub>6</sub>-Tag (MW = 1.9 kDa), welcher auf diese Weise abgetrennt werden kann.

Die Identifikation des Zielproteins bei einer molekularen Masse von etwa 40 kDa bestätigt die erfolgreiche heterologe Expression des spannungsgesteuerten H<sub>v</sub>1-Protonenkanals aus *E. coli*. Gegenüber der theoretischen Masse von 36.7 kDa, welche sich aus den Massen des H<sub>v</sub>1 Wildtyps (MW = 31.9 kDa) und den 46 Aminosäuren des angefügten His<sub>6</sub>-Tags (MW = 4.8 kDa) addiert, wandert die Bande bei leicht erhöhter Masse. Dieses Phänomen wurde bereits in der Literatur beschrieben. MacKinnon *et al.* beobachteten bei der Isolation des hH<sub>v</sub>1-Wildtyps (MW = 32 kDa) aus HEK293-Zellen eine Verschiebung der Bande zu 35 kDa.<sup>[28]</sup> Dies konnte ebenfalls bei der Isolation des Fusionsproteins Hv-1D4 aus *Pichia pastoris* durch Lee *et al.* beobachtet werden. Das Protein, welches einen C-terminalen 1D4-Tag trug, zeigte im SDS-Gel eine Bande bei über 35 kDa während es lediglich eine theoretische Masse von etwa 33 kDa besaß.<sup>[1]</sup> Das ebenfalls aus *E. coli* isolierte H<sub>v</sub>1 (MW = 34 kDa) wandert in einen ähnlichen Bereich des SDS-Gels.<sup>[79]</sup>



Dass es sich bei dem isolierten Protein um den spannungsgesteuerten Protonenkanal handelt, belegen ebenso die Ergebnisse der CD- und SEIRA-Spektroskopie, welche beide einen hohen  $\alpha$ -helikalen Strukturanteil ausweisen. Aus den CD-Daten, deren Verlauf charakteristisch für eine  $\alpha$ -helikale Struktur ist, wurde ein Anteil von 40 % bestimmt. Auf Grundlage der Strukturdaten des chimären  $H_v1$ -Kanals (*Protein Data Bank* Nr. 3WKV) bestehen die helikalen transmembranen Segmente S1–S4 sowie die C-terminale Domäne, welche durch eine Leucin-Zipper-Einheit ausgetauscht wurde, aus 128 AS. Dies würde auf das vorliegende Protein übertragen einen Anteil von 39 % ausmachen.<sup>[88]</sup> Die natürliche C-terminale Domäne besitzt eine helikale Struktur von 78 % wie CD-Spektren zeigen.<sup>[85]</sup> Li *et al.* bestimmten einen helikalen Anteil von 75 % für das gesamte rekombinante  $hH_v1$ , welches sie ebenfalls aus *E. coli* isolierten.<sup>[79]</sup> Für die VSD der  $C_i$ -VSP wurde eine Helizität von 52 % und für die gekürzte Variante der VSD des KCNQ1 (Q1-VSD) lediglich ein hoher Anteil der helikalen Anteile angegeben.<sup>[27,191]</sup> Aus der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Helizität des rekombinanten Fusionsproteins des  $H_v1$ -Kanals kann auf eine korrekte Faltung geschlossen werden. Gestützt werden die Daten der CD-Spektroskopie zudem durch SEIRA-Studien, die eine Amid-I Bande bei einer Wellenzahl von  $1657\text{ cm}^{-1}$ , welche für eine  $\alpha$ -Helix charakteristisch ist, zeigen. Jedoch würde auch ein *Random Coil*-Strukturelement diese hervorrufen.<sup>[186]</sup> Eine detailliertere Aussage über die Funktionalität soll daher im nachfolgenden Kapitel diskutiert werden.

Abschließend wurde, durch LC-MS Analyse der 40 kDa-Proteinbande, das Protein eindeutig als spannungsgesteuerter  $H_v1$ -Kanal identifiziert.

Das  $H_v1$ -Protein konnte demnach erfolgreich durch die *E. coli*-Stämme BL21(DE3) und BL21 Gen-X exprimiert werden. Hierbei ist der zweite Stamm zu bevorzugen, da er wie der Hersteller angibt, eine höhere Expressionsrate des Zielproteins bei geringerer Verunreinigung durch Hintergrundproteine erzielt. Bereits Li *et al.* zeigten, dass eine Kombination aus BL21(DE3) und pET-28b(+) Vektor erfolgreich zur Isolation der  $C_i$ -VSD eingesetzt werden konnte. Hierbei war jedoch die Position des His<sub>6</sub>-Tags entscheidend. Eine Expression mit C-terminalem Tag konnte nicht beobachtet werden. Eine gesteigerte Expression konnte durch Kombination des Vektors pQE32 und XL10-Gold-Zellen erzielt werden.<sup>[27]</sup> BL21(DE3)-Zellen fanden ebenfalls Einsatz bei der Expression des  $H_v1$ -Proteins durch Li *et al.* Diese nutzten eine für den K12-Stamm optimierte Codonsequenz innerhalb des pET-15b Vektors mit N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag.<sup>[79]</sup> Peng und Mitarbeiter *screenen* ebenfalls eine Auswahl aus *E. coli*-Stämmen für die Expression der Q1-VSD. Hierbei kamen sowohl die Vektoren pET-16b als auch pET-21b und pQE32 zum Einsatz. Die höchste Expressionsrate konnte für die Kombination eines pET-Vektors mit dem Stamm Rosetta/C43(DE3) für das Fusionsprotein mit N-terminalem Tag dokumentiert werden.<sup>[191]</sup> Auch Zhang *et al.* setzten bei der Expression des NavRh-Kanals auf die Kombination von BL21(DE3) und pET-21b.<sup>[24]</sup>

## Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lyse der Zellen in einem Puffer der Zusammensetzung 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 8 durchgeführt. Ähnliche Puffer wurden bei der Isolation spannungsgesteuerter Kanäle bzw. deren VSD durch Li und Mitarbeiter (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8) sowie Peng (70 mM, 300 mM, pH 8) eingesetzt. Eine vergleichbare Zusammensetzung (25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8) des Lysepuffers wurde ebenfalls bei der Isolation des NavRh-Kanals eingesetzt. Die Salzkonzentrationen liegen im physiologischen Bereich und stabilisieren die Membranproteine.<sup>[114]</sup> Der leicht alkalische pH-Wert erleichtert den Zellaufschluss und erhöht die Löslichkeit des Protein, da dies einen pI von 6.77 (berechnet mit dem ExPASy ProtParam Tool) besitzt. Dies konnte durch die Arbeit von Rebecca Rixen im Rahmen des Fachvertiefungspraktikums zur Optimierung der Expression und Isolation des H<sub>v</sub>1-Kanals belegt werden.<sup>[173]</sup> So wurde bei pH 7 deutlich weniger Protein gelöst und eluiert. Zudem konnte sie nachweisen, dass eine Expression bei pH 7 zu einer höheren Translationsabbruchrate beiträgt. Dies wurde verdeutlicht durch eine zusätzliche Bande innerhalb der eluierten Fraktionen bei ca. 35 kDa. Hingegen konnte bei pH 8 eine verminderte Gesamtmenge an Protein beobachtet werden. Wang *et al.* konnten nachweisen, dass eine Kultivierung von *E. coli*-Zellen bei pH 8 ein wenig verlangsamtes Wachstum zur Folge hat, dieses jedoch mit einer verbesserten Expression gegenüber einem pH von 6.5 einhergeht. Dies führten sie auf ein, durch den *pH-shift* induzierten Ausstrom von Acetatanionen zurück, wodurch die Zellen weniger gestresst werden.<sup>[189]</sup> Acetat entsteht bei dem Verdau von Glucose durch die Zellen. Gale *et al.* studierten die Abhängigkeit der Verdopplungszeiten vom pH-Wert und konnten auch hier im Bereich von 5.8–8 nur kleine Abweichungen gegenüber dem pH-Optimum von 7 feststellen.<sup>[202]</sup>

Zusammenfassend kann anhand der vorliegenden Ergebnisse die erfolgreiche Etablierung eines Protokolls zur heterologen Expression und Isolation des rekombinanten H<sub>v</sub>1-Proteins aus *E. coli*-Zellen der Stämme BL21(DE3) und BL21 Gen-X bestätigt werden. Optimale Ausbeuten sowie ein hoher Reinheitsgrad konnten durch eine Anpassung des pH-Wertes des LB-Mediums sowie des Lysepuffers auf pH 8 erzielt werden. Mit 2.6–6.7 mg je Liter Kultur liegen die Ausbeuten über dem Resultat der Expression durch Li *et al.* von 0.7 mg·L<sup>-1</sup>.<sup>[79]</sup> Für die Isolation der C<sub>i</sub>-VSD aus *E. coli* wurde ein ähnliches Ergebnis von 0.5 mg·L<sup>-1</sup> durch Li *et al.* beschrieben.<sup>[27]</sup> Die Expression in BL21 Gen-X lieferte dabei die doppelte Menge Protein im Vergleich zur Expression in BL21(DE3). Nach der gelungenen Rückfaltung des in SDS solubilisierten Proteins durch Dialyse gegen 0.05 % DDM konnte das Protein über Monate hinweg bei 4 °C gelagert werden.

## 5.2 Rekonstitution des H<sub>v</sub>1-Proteins in kleine unilamellare Vesikel

Die Rekonstitution rekombinanter, transmembraner Proteine ist Grundlage für *in vitro* Untersuchungen in einem definierbaren Modellsystem. Sie ermöglicht u. a. die selektive

Einflussnahme auf das Protein durch Änderung der Temperatur, des pH-Wertes oder des Membranpotentials und die Studie der daran gekoppelten Protein-Modifikationen. Membranmodellssysteme wie Proteoliposomen erlauben es auch, den Austausch von Stoffen zwischen dem äußeren und inneren Kompartiment zu studieren. Zudem bietet die Insertion von Membranproteinen in kleine unilamellare Vesikel die Option, komplexere Modellmembranen, wie z. B. *tethered bilayer lipid membranes* (tBLMs), zu entwickeln. Diese bilden wiederum die Basis zur Anwendung moderner Strukturaufklärungsmethoden wie der SEIRA-Spektroskopie.

### 5.2.1 Nachweis der funktionellen Rekonstitution des H<sub>V</sub>1-Protonenkanals

Der Nachweis der Rekonstitution des H<sub>V</sub>1-Protonenkanals in Liposomen, welche unter Erhalt der Proteinaktivität erfolgte, wurde durch einen ACMA basierten Protonenfluss-Test erbracht (Kapitel 4.2). Der Verlauf des Fluxtests bzw. der Fluoreszenzlöschung verlief im Einklang mit den Erwartungen. In der Literatur gibt es keinen Hinweis auf die Wechselwirkung der Liposomen mit dem ACMA-Fluorophor, da die Spektren zum Zeitpunkt der Zugabe in der Literatur nicht dargestellt wurden. Jedoch wurde ein analoges Verhalten auch nach der Zugabe von POPC/Chol (90:10) beobachtet (Daten nicht dargestellt). Diese enthalten keine negativ geladenen Lipide wodurch ein Einfluss dieser ausgeschlossen werden kann. Die Löschung ist eher auf die Insertion des Fluorophors in die Membran zurückzuführen.<sup>[134]</sup> Durch Zugabe des Kaliumionophors wurde ein exponentieller Fluoreszenzintensitätsabfall innerhalb der Proteoliposomen hervorgerufen. Dieser wurde in ähnlicher Form für rekonstituierte H<sub>V</sub>1-Kanäle und ATPasen in der Literatur beschrieben.<sup>[1,79,132,132,133,176]</sup> Der Anstieg der Fluoreszenzintensität kurz nach der Zugabe des Ionophors wurde ebenfalls in einer Veröffentlichung von Okamoto *et al.* gezeigt, jedoch nicht diskutiert.<sup>[176]</sup> Dieser konnte ebenfalls im Rahmen des OG488-DHPE basierten Protonenfluss-Tests beobachtet werden konnte.<sup>[178]</sup> Dies deutet auf einen Anstieg des pH-Wertes in der Nähe der Membran hin und stützt die These der unspezifischen Wechselwirkung zwischen Valinomycin und der Membran (vgl. Abschnitt 4.2). Die Auswertung der Rohdaten der fluoreszenz-spektroskopischen Messungen erfolgte nach der durch Lee *et al.* beschriebenen Formel (4-3).<sup>[1]</sup> Sie wurde durch die genauere Analyse zweier charakteristischer Parameter der exponentiellen Fluoreszenzlöschung ergänzt (Formel 4-4). Auf der Grundlage des A<sub>p</sub>-Wertes, der prozentualen Abnahme nach Induktion der Protonentranslokation, und der Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$  bzw. der Änderungskonstanten  $k$  wurde die Rekonstitution beurteilt.

Einen weiteren Nachweis für die erfolgreiche Expression und Isolation sowie die Rückfaltung in eine funktionelle Konformation des H<sub>V</sub>1-Protonenkanals lieferte die Rekonstitution in vorgefertigte Liposomen (Kapitel 4.2.5, Abbildung 4-23). Einhergehend mit dem Einsatz einer gesteigerten Proteinkonzentration während der Rekonstitution, wurden

## Diskussion

zwei korrelierende Effekte erzielt. Zu einem wurde ein erhöhter Proteoliposomenanteil beobachtet. Zum anderen wurde die Fluoreszenzlöschung beschleunigt. Dies geht auf eine gesteigerte Anzahl an Protonenkanälen je Vesikel zurück. Ausgehend von einem Liposom mit einem Kanal, führt die Zugabe eines weiteren Kanal entweder zu einem weiteren Proteoliposom oder einem Vesikel mit doppelter Kanalanzahl. Der tatsächliche Einfluss des reduzierten Protein-zu-Lipid-Verhältnisses resultiert daher aus dem Produkt der relativen Änderungen dieser Effekte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausgehend von einem Verhältnis von 1:276800 ( $n/n$ ) der Proteingehalt während der Rekonstitution auf ein P/L von 1:34600 ( $n/n$ ) um den Faktor 16 erhöht. Dies ging mit einer relativen Steigerung des Anteils an Proteoliposomen um den Faktor 4.5 und einer 6.5-fachen Beschleunigung der Löschung der Fluoreszenz einher. Hieraus errechnet sich eine gesamte Änderung um den Faktor 29.0, dieser liegt oberhalb der Erwartungen von 16.0. Dies kann mit einer verringerten Rekonstitutionseffizienz im höheren P/L-Bereich erklärt werden, da in diesem Konzentrationsbereich die Absorption von Protein an den Reaktionsgefäß- und Dialyseschlauchoberflächen einen großen Einfluss ausübt.<sup>[203]</sup> Im Bereich kleinerer P/L-Verhältnisse korreliert eine Verdopplung des Proteingehalts nahezu mit einer Änderung des Effektfaktors um 2. Hierdurch wird die proteinspezifische Protonentranslokation bestätigt.

Eine beginnende Sättigung der Rekonstitution wurde im Bereich eines molaren P/L von 1:9700 ( $n/n$ ) (entsprechend 1:90 ( $w/w$ )) und 1:17300 ( $n/n$ ) (entsprechend 1:182 ( $w/w$ )) beobachtet (vgl. Abbildung 4-23 B). Die Arbeiten von Lee *et al.* weisen eine Sättigung des Proteoliposomenanteils von ca. 80–85 % im Bereich von 1:100 bis 1:500 ( $w/w$ ) auf.<sup>[1]</sup> Li *et al.* erzielten bei der Rekonstitution des Kanals in POPC/POPG (3:1)-Liposomen einen Anteil von etwa 90 % bei einem molaren Verhältnis von 1:2000 ( $n/n$ ) entsprechend einem Massenverhältnis von 1:44.<sup>[79]</sup> In beiden Fällen wurde hierbei die Rekonstitution in vorgeformte Vesikel durchgeführt.

Das Verhältnis entspricht einer Anzahl von 10 bzw. 5 Protonenkanälen pro Vesikel. Unter Berücksichtigung, dass der Proteoliposomenanteil 62 % bzw. 76 % beträgt, liegt der theoretische Wert bei 16 bzw. 7 Kanälen pro Vesikel. Im Bereich eines nominalen Protein-zu-Lipid-Verhältnisses von 1:276800 ( $n/n$ ) wurde eine Fluoreszenzlöschung, welche nahezu linear erfolgte, von  $17 \pm 8$  % registriert. Die Halbwertszeit der Fluoreszenz lag mit  $58.7 \pm 4.1$  s eine Größenordnung unterhalb der der Blindvesikel. Rechnerisch liegen in diesem Fall etwa 2 Protonenkanäle pro Proteoliposomen vor. Dies erklärt den geringen Wert und markiert den unteren Bereich, in dem die Detektion eines Protonenstroms mit der vorgestellten Methode noch möglich ist. Der Einfluss der unspezifischen Protonen ist dabei sehr gering und kann vernachlässigt werden. Die unspezifische Translokation ist dabei vor allem auf zurückbleibende Detergenzien zurückzuführen. So zeigen die Versuche von Lee *et al.* und Li *et al.*, nahezu undurchlässige Blindvesikel, welche durch eine verlängerte Dialysezeit von 4 bzw. 5 Tagen erzielt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls eine Abnahme der intravesikulären Fluoreszenz durch eine Verdopplung der Dialysedauer von 1 auf 2 Tage

verifiziert werden (siehe Abbildung 4-20). Vor allem das für die Stabilisierung des Proteins verwendete DDM ist auf Grund der geringen kritischen Mizellbildungskonzentration (engl. *critical micelle concentration*, CMC) nur schwer dialysierbar. Fang *et al.* konnten daher eine reduzierte Stabilität der mit DDM rekonstituierten Proteoliposomen gegenüber einem vorliegenden pH-Gradienten beobachten.<sup>[177]</sup>

Einen weiteren Nachweis für die erfolgreiche Insertion des Proteins in die Lipiddoppelschicht lieferte eine Dichtegradientenzentrifugation (Kapitel 4.2.1, Abbildung 4-13), da das Protein sowohl mittels SDS-PAGE als auch Western Blot lediglich in den oberen Fraktionen lokalisiert werden konnte. Dies entspricht dem Dichtebereich in den puffergefüllte Vesikel wandern. Freies Protein wurde hingegen nicht bestätigt.<sup>[129]</sup> Das eingesetzte Protein wird folglich vollständig in die Vesikel insertiert. Die Diskrepanz zwischen der eingesetzten Menge an Protein und der Proteinmenge, welche in den Vesikeln vorliegt, resultiert zum Großteil aus der Adsorption von Protein an den Oberflächen der Reaktionsgefäße und Dialyseschläuche. Zum anderen enthielt die eingesetzte Proteincharge Verunreinigungen in einem geringen Prozentsatz. Diese werden bei der Bestimmung der Proteinkonzentration auf Grund der Absorption ihrer Aminosäuren mit berücksichtigt. Jedoch wurden, wie das Gel der Dichtegradientenzentrifugation zeigt, diese nicht in die Vesikel insertiert (siehe Kapitel Abbildung 4-13). Sie wurden auch nicht in den Fraktionen detektiert, welche freies Protein enthalten. Auf Grund ihrer geringen Größe von etwa 10-15 kDa wurden diese vermutlich durch die Dialyse, welche durch Schläuche mit einer Größenausschlussgrenze von 14 kDa durchgeführt wurde, entfernt. Durch die Rekonstitution konnte somit der Anteil an Verunreinigungen nochmals reduziert werden. Dieser Umstand erlaubte es, Proteoliposomen mit einem relativ hohen Proteinanteil und Reinheitsgrad zu präparieren. Durch die Insertion des Protonenkanals in ein künstliches Membransystem wurde erfolgreich der Grundstein für dessen elektrophysiologische sowie spektroelektrochemische Charakterisierung im Rahmen dieser Arbeit gelegt.

### 5.2.1.1 Steigerung der Translokationsrate durch negative Phospholipide

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Fluoreszenzlöschung innerhalb der Proteoliposomen allein durch die Präsenz negativ geladener Lipide wie 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) und 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-*L*-serin (POPS) beobachtet werden kann (vgl. Abbildung 4-19 und Abbildung 4-21). Eine mögliche Erklärung wäre, dass kein Protein oder dieses nur in einer inaktiven Konformation rekonstituiert wurde. Jedoch ist, unter Betrachtung des zugrunde liegenden Protonenfluss-Tests, eine andere Theorie für das Ausbleiben einer Fluoreszenzlöschung wahrscheinlicher. Auf Grund der geringen physiologischen wie auch experimentellen Protonenkonzentration von  $10^{-7}$  M befinden sich rechnerisch gerade einmal  $0.03 \text{ H}^+$  in einem kugelförmigen Vesikel mit einer Durchmesser von 100 nm. Die Insertion von negativen Lipiden in die Vesikelmembran hat eine Protonenakkumulation zur Folge. Somit steigt die lokale

## Diskussion

Konzentration an und ein schnellerer Transport der  $H^+$  zum rekonstituierten Protonenkanal wird gewährleistet. Haines *et al.* untersuchten den Protonierungsgrad der Carboxylgruppe in Ölsäureliposomen über einen pH-Bereich von 6–12 mittels  $^{13}C$ -NMR. Sie konnten zeigen, dass die Carboxylgruppe unterhalb von pH 7 protoniert und oberhalb pH 9.6 deprotoniert vorliegt. In beiden Fällen konnten keine intakten Liposomen beobachtet werden. Diese existierten lediglich in dem intermediären Bereich. Hierbei lagen sowohl protonierte als auch deprotonierte Spezies, in einer Art Proton-verbrücktem Dimer vor. Sie schlossen daraus, dass anionische Membranen Protonen binden und sich diese entlang oder innerhalb der Membran bewegen.<sup>[204]</sup> Georgievskii *et al.* bestätigten diese These indirekt. Sie modellierten den Protonentransport entlang einer Oberfläche und kamen zu dem Ergebnis, dass eine Oberfläche, welche protonierbare Gruppen besitzt, die Protonen aus der Lösung entzieht und deren Weiterleitung zum Beispiel zu einem Kanal beschleunigt. Bei einer entsprechend hohen Konzentration an Protonenakzeptoren, wird der Transport der Protonen lediglich durch die Diffusion von der Lösung an die Oberfläche bestimmt.<sup>[205,206]</sup> Hierbei ist der  $pK_s$ -Wert des Akzeptors sowie dessen Anteil entscheidend. Der  $pK_s$ -Wert der Carboxylgruppe von Phosphatidylcholin (PC) liegt mit 1.0 deutlich unter den Werten für das negativ geladene Phosphatidylserin (PS) ( $pK_s = 5.5$ ) und der Hydroxylgruppe von Phosphatidylglycerol (PG) ( $pK_s = 3.5$ ).<sup>[207]</sup> Sanden *et al.* untersuchten den Austausch von Protonen in Lösung mit der Membranoberfläche. Als Marker setzten sie die pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffe Oregon Green 488 und Fluorescein ein, welche an 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DHPE)-Lipide gekoppelt waren. Sie konnten so zeigen, dass der Anteil der Oberflächen gebundenen Protonen bei DOPG-Vesikeln höher ist. Zudem konnten sie beobachten, dass die Protonen durch Steigerung der Konzentration an Natriumionen von 150 mM auf 900 mM verdrängt werden.<sup>[135]</sup> Rostovtseva *et al.* kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. Sie konnten zeigen, dass Cs-Ionen durch hohe Protonenkonzentrationen ( $pH < 3$ ) von der negativ geladenen PS-Lipidmembranoberfläche verdrängt werden und somit die Transportrate des Gramicidin A-Kanals sinkt. Zudem konnten sie einen Nachweis der Korrelation zwischen der zunehmenden PS-Konzentration in einer PC/PS-Membran und der gesteigerten  $Cs^+$  Translokationsrate erbringen.<sup>[208]</sup> Dabei verläuft die Korrelation in einem Bereich von 0–40 mol% PS nahezu linear. Im Rahmen des Fachvertiefungspraktikums und der Bachelorarbeit von Kristina Kramer konnte ebenfalls beobachtet werden, dass sich die Geschwindigkeit der Fluoreszenzlöschung in Vesikeln der Zusammensetzung POPC/POPS/Chol (65:25:10) gegenüber POPC/POPS/Chol (65:15:20)-Liposomen nahezu verdoppelt.<sup>[209]</sup> D'Avanzo *et al.* untersuchten systematisch den Einfluss verschiedener Glycerophospholipide auf die Leitfähigkeit der bakteriellen spannungsgesteuerten Natriumkanäle ( $Na_v$ ) aus *Silicibacter pomeroyi* ( $Na_vSp$ ), *Magneto spirillum* ( $Na_vMs$ ) und *Bacillus halodurans* ( $NaChBac$ ).<sup>[210]</sup> Hierbei wurden die Kanäle mittels DM in Liposomen mit einem POPE-Gehalt von 75 % rekonstituiert. Die übrigen 25 % wurden durch die zu untersuchenden Glycerophospholipide ergänzt. Es zeigte sich hierbei, dass die negativ geladenen Lipide mit Glycerol-, Inositol- oder Serin-Kopfgruppe die

Leitfähigkeit deutlich erhöhen. Einen anderen Ansatz zur Erklärung der verstärkten Protonentranslokation bietet die Arbeit von Betaneli *et al.* Diese zeigten, dass bei Vorhandensein negativer Lipide wie PG und PS die Oligomerisation des positiv geladenen *voltage-dependent anion channel* (VDAC) begünstigt wird.<sup>[211]</sup> Jedoch besitzt das H<sub>V</sub>1-Fusionsprotein eine zweifach negative Nettoladung. Zwar weisen die transmembranen Domänen S2 und S4 positive Nettoladungen auf, jedoch sind diese in Richtung der Proteinpore ausgerichtet und werden somit nicht von einer negativ geladenen Lipidumgebung stabilisiert.

### 5.2.1.2 Cholesterin verstärkte H<sub>V</sub>1-Rekonstitutionsrate

Ein gesteigerter Proteoliposomenanteil sowie eine beschleunigte Abnahmekonstante  $k$  konnten durch den Zusatz von Cholesterin (Chol), in einer Konzentration von 10–20 mol%, zu einer POPC/POPG-Lipidmischung erzielt werden. Bei einem Cholesterinanteil von 20 mol% wurde trotz der Reduzierung des Proteinanteils um einen Faktor von 2.2 auf P/L = 1:17300 ( $n/n$ ) ein 2.8-facher Proteoliposomenanteil und ein 1.6-facher Wert für  $k$  beobachtet. Cholesterin kommt zu einem Anteil von 10–45 mol% in der Plasmamembran von Säugetierzellen vor. Dies unterstreicht seine physiologische Bedeutung.<sup>[212]</sup>

Ferner besitzt Cholesterin einen positiven Einfluss auf die Rekonstitutionseffizienz von Membranproteinen.<sup>[114,124,129]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Na-K-ATPase innerhalb einer Lipidmatrix aus monounsättigtem PC einer Kettenlänge von 18 Kohlenstoffatomen durch die Zugabe von 40 mol% Chol um mehr als eine 10er-Potenz gesteigert wurde.<sup>[124]</sup> Ein ähnlicher Einfluss des Cholesterins wurde auf die Öffnungswahrscheinlichkeit des G-Protein aktivierten Kaliumkanals Kir3.4\* beobachtet. Diese erhöhte sich um etwa eine Größenordnung bei Vorliegen einer 33 %igen Chol-Konzentration in HEK-Zellen.<sup>[213]</sup> Den gegenteiligen Effekt, d. h. eine Inhibition durch Cholesterin, zeigen hingegen die Kir2.1-Kanäle.<sup>[214]</sup> In beiden Fällen wurde jedoch kein Einfluss des Cholesterins auf das Expressionslevel der Kanäle festgestellt. Diese Inkonsistenz wird auch in der Familie der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle (K<sub>V</sub>) beobachtet. Bock *et al.* konnten zeigen, dass K<sub>V</sub>1.3-Kanäle bevorzugt in Cholesterin- und Sphingolipid-haltigen Lipidflößen (engl. *lipid rafts*) der T-Lymphozyten lokalisiert sind.<sup>[215]</sup> Hingegen wiesen Hajdú *et al.* eine Verlangsamung der Kanalaktivierung in Cholesterin angereicherten Lymphozyten nach. Sie führten dies auf eine Änderung der Konformation der spannungssensitiven Transmembrandomänen (S1–S4) des Kanals, auf Grund einer erhöhten Viskosität der Membran, zurück.<sup>[216]</sup> Einen direkten Einfluss eines steigenden Cholesteringehalts auf die Öffnungswahrscheinlichkeit oder Leitfähigkeit von spannungsgesteuerten Natriumkanälen (Na<sub>V</sub>-Kanäle) beobachteten Rehberg *et al.* nicht. Sie detektierten jedoch eine 50 %ige Reduktion der inhibierenden Wirkung von Pentobarbital auf den Na<sub>V</sub>-Kanal bei Vorliegen von 3.7 mol% Chol.<sup>[217]</sup> Wu *et al.* konnten wiederum in Herzmuskelzellen von Kaninchen die

## Diskussion

unter Hypercholesterinämie litten eine Reduktion des  $\text{Na}_V$ -Stroms und führten dies auf eine mögliche Änderung der Membraneigenschaften zurück.<sup>[218]</sup> Der Einfluss des Cholesteringehalts divergiert daher von Proteinfamilie zu Proteinfamilie und von Zelltyp zu Zelltyp.<sup>[219]</sup> Über die Wechselwirkung von Cholesterin und dem spannungsgesteuerten Protonenkanal ist wenig bekannt. Die vorliegenden Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass Cholesterin bei einem Anteil von 20 mol% zu der vermehrten Insertion des Kanals in Liposomen führt. So konnte der Anteil an Proteoliposomen um 280 % gesteigert werden, obwohl nur die Hälfte der Proteinmenge eingesetzt wurde. Bei der Rekonstitution in Vesikel mit einem Cholesteringehalt von 10 mol% und 20 mol % konnte kein signifikanter Unterschied in dem Anteil an Proteoliposomen festgestellt werden. Ein signifikanter Anstieg der unspezifischen Durchlässigkeit der POPC/POPG/Chol-Membranen gegenüber POPC/POPG-Membranen konnte anhand eines Vergleichs mit Blindvesikeln ausgeschlossen werden (Kapitel 4.2.3, Abbildung 4-20). Gensure *et al.* hingegen beschrieben eine Steigerung der Durchlässigkeit von POPC-Liposomen für Wasser sowie eine einhergehende erhöhte Durchlässigkeit für Protonen bedingt durch den Zusatz von Cholesterin. Der Faktor der Steigerung lag bei etwa 2.2 bei einem Anteil von 17.9 mol% Chol.<sup>[220]</sup> Weitere Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit zeigten jedoch, dass die Leckströme durch eine Verlängerung der Dialysezeit um etwa die Hälfte reduziert werden konnten. Dies ist wie bereits beschrieben auf eine Reduktion des Detergensanteils in der Membran zurückzuführen.

### 5.2.2 Orientierung des $\text{H}_V1$ -Kanals innerhalb der Proteoliposomen

Die Rekonstitution in Liposomen erfolgt hierbei meist durch die Detergens vermittelte Co-Mizellierung oder die direkte Insertion (auch als step-by-step-Methode bekannt).<sup>[221]</sup> Bei letzterer insertiert das Protein in vorgefertigte, durch Detergens destabilisierte Vesikel. Die Vesikel Solubilisierung kann durch die Bestimmung der Trübung der Lösung verfolgt werden und wird als 3-stufiger Vorgang beschrieben (siehe Abbildung 5-1).<sup>[129,221]</sup> Zu Beginn liegen reine Vesikel vor. Bei Zugabe von Detergens insertieren die Moleküle in die Liposomen. Somit sinkt das Lipid-zu-Detergens-Verhältnis. Die Sättigung der Vesikel ist am Übergang zu Phase II erreicht. Ab diesem Zeitpunkt nimmt die Trübung ab und die Vesikel werden solubilisiert. Es liegen sowohl detergenshaltige Liposomen als auch Lipid-Detergens-Mizellen vor. Ist die Solubilisierung vollständig abgeschlossen, geht das System in Phase III über. In dieser liegen ausschließlich binäre Mizellen vor. Bei der entgegengesetzten Rekonstitution via Co-Mizellierung wird das System um die Komponente der gelösten Proteine ergänzt. Es liegen in Phase III sowohl binäre als auch ternäre Lipid-Detergens-Protein-Mizellen vor. Diese beginnen bei steigendem Lipid-zu-Detergens-Verhältnis mit Detergens gesättigte Liposomen zu bilden.



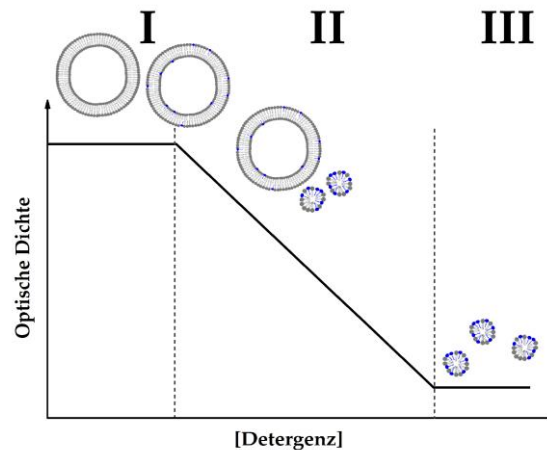


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der Vesikel-Solubilisierung. (I) Zu Beginn liegen reine Vesikel vor. Mit steigender Detergenzkonzentration insertieren zunehmend mehr Detergenzmoleküle (blau). Die Sättigung ist am Übergang zu Phase II erreicht. (II) In dieser Phase liegen gesättigte Liposomen und gemischte Lipid-Detergenz-Mizellen vor. Die Trübung nimmt auf Grund der beginnenden Solubilisierung ab. (III) Die Solubilisierung ist vollständig wenn nur noch gemischte Mizellen vorliegen. Zu diesem Zeitpunkt erreicht die Trübung ihr Minimum. Bei der Bildung von Proteoliposomen wird das System um eine weitere Komponente, dem Protein, ergänzt. Der Ablauf ist jedoch äquivalent.<sup>[221]</sup> Abbildung erstellt nach Rigaud *et al.*<sup>[129]</sup>

Nach welchem Mechanismus die Rekonstitution abläuft, wird dabei durch das vorliegende effektive Detergenz-zu-Lipid-Verhältnis ( $R_{\text{eff}}$ ) bestimmt. Dieses kann aus Gleichung 5-1 bestimmt werden. Hierbei gibt [Lipid] die Lipidkonzentration und  $D_{\text{Total}}$  die Konzentration an Detergenz in Lösung an.  $D_{\text{Wasser}}$  ist im Idealfall eine konstante Größe, welche die CMC des Detergenz in Anwesenheit von Lipiden wiedergibt.<sup>[129]</sup>

$$R_{\text{eff}} = \frac{D_{\text{Total}} - D_{\text{Wasser}}}{[\text{Lipid}]} \quad 5-1$$

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zunächst kleine unilamellare Vesikel hergestellt und durch das Detergenz DM in einer Konzentration von 15.3 mM destabilisiert. Anschließend wurde die Insertion des Proteins bei einer Gesamtkonzentration von 26.7 mM DM durchgeführt. Unter Berücksichtigung von  $D_{\text{Wasser}} = 1.4$  mM und einer Lipidkonzentration von 13.5 bzw. 11.7 mM können für die Schritte der Rekonstitution effektive Detergenz-zu-Lipid-Verhältnisse von 1.0 und 2.2 bestimmt werden. Für die Sättigungs- ( $D^{\text{sat}}$ ) und Solubilisierungskonzentration ( $D^{\text{sol}}$ ) wurden für DM ähnliche Werte durch Fang *et al.* und Stuart *et al.* bestimmt (siehe Tabelle 5-1). Diese verwendeten jedoch deutlich differenzierte Lipidzusammensetzungen und Konzentrationen. Der im Rahmen dieser Arbeit bestimmte  $R_{\text{eff}}$ -Wert während der Proteinrekonstitution liegt zwischen den Werten von Stuart *et al.* Somit lägen zu diesem Zeitpunkt Detergenz gesättigte Vesikel sowie gemischte Mizellen vor. Unter Bezugnahme der Wertepaare von Fang *et al.* würde jedoch eine nahezu vollständige Solubilisierung stattfinden.

## Diskussion

Tabelle 5-1: Parameter zur Beschreibung der Solubilisierungseigenschaften des Detergens DM.

<i>Autor</i>	<i>Lipide</i>	$D_{\text{Wasser}}$	$D^{\text{sat}}$	$D^{\text{sol}}$	$R_{\text{eff}}^{\text{sat}}$	$R_{\text{eff}}^{\text{sol}}$
Koning <sup>[222]</sup>	DOPC/DOPE (1:1)	1.4–2.7 mM				
Fang <i>et al.</i> <sup>[177]</sup>	<i>E. coli</i> - Lipide*/Egg-PC (3:1) (4 mg/mL)		4.1 mM	8 mM	0.5 ( <i>w/w</i> )	1 ( <i>w/w</i> )
Stuart <i>et al.</i> <sup>[223]</sup>	DOPC (2.5 mM)	1.4 mM	4 mM		1.6 ( <i>n/n</i> )	3.2 ( <i>n/n</i> )

\* *E. coli*-Lipide wurden in einer Aceton/Ether-Mischung extrahiert und enthielten 70 % PE, 25 % PG und 5 % Cardiolipid.

Eine genaue Aussage über den tatsächlich stattfindenden Mechanismus der H<sub>V</sub>1-Insertion kann somit abschließend nicht getroffen werden. Aus den vorliegenden Studien lassen sich jedoch zwei Annahmen ableiten. Zum einem diskutierten Stuart *et al.* als auch Kragh-Hansen *et al.*, dass die Geschwindigkeit der Solubilisierung der Liposomen von der Geschwindigkeit der transmembranen Bewegung der Detergenzmoleküle abhängt. Erfolgt der FlipFlop schnell, so erfolgt auch die Solubilisierung der Membran beschleunigt. Hierbei beschreiben Stuart *et al.* einen Zusammenhang zwischen der Geometrie, d. h. der Packungsparameter der Moleküle, und dem Insertionsvermögen in die innere Monoschicht. DDM und DM gehören dabei zu der Gruppe von langsam solubilisierenden Detergenzien, im Gegensatz zu Triton X-100.<sup>[223–225]</sup> Aus den verschiedenen Geometrien folgern Stuart *et al.*, dass die Solubilisierung der Lipiddoppelschicht in differenzierten Mechanismen abläuft, wobei die Detergenzien wie DM und DDM zunächst nicht in die innere Monoschicht insertieren und die Mizellenbildung alleine aus der äußeren Monoschicht stattfindet. Zudem werden keine sphärischen sondern wurmartige, filamentöse Mizellen gebildet, wie sie durch Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM) DM-solubilisierter DOPC-Liposomen zeigten. Die Bildung dieser Mizellen wurde oberhalb der Sättigungskonzentration von DM beschrieben. Es wurde daraus gefolgert, dass eine Rekonstitution bei hohen DDM-Konzentrationen nicht möglich ist, da eine Insertion des Proteins nur in eine Lipiddoppelschicht, nicht aber in Mizellen erfolgen kann.<sup>[223]</sup> Sie bestätigten somit Ergebnisse von Knol *et al.*, wobei DDM verwendet wurde.<sup>[226]</sup> Des Weiteren wurde durch Kryo-EM-Aufnahmen die Bildung multilamellarer Vesikel am Ende des, der Solubilisierung entgegengesetzten, Prozesses beobachtet. Eine Vorstufe der filamentösen Mizellen bilden laut dem Model von Knol *et al.* offene Lipiddoppelschichtstrukturen. Diese ermöglichen eine Insertion des Proteins ausgehend von der inneren Monoschicht. Hierdurch wird eine gerichtete unidirektionale Insertion des Membranproteins vermieden. Tatsächlich wird in der Literatur bei Verwendung von DM und DDM häufig eine zufällige Verteilung, d.h. *outside-outside* oder *outside-inside*, der Proteinorientierung bestätigt.<sup>[177,226,227]</sup> Abschließend kann die erfolgreiche Etablierung und Durchführung der Rekonstitution des H<sub>V</sub>1-Kanals in vorgefertigte Vesikel zu einem relativ hohen Anteil bestätigt werden.

## 5.3 Proteinaktivität und Protonentranslokationsrate des H<sub>V</sub>1-Kanals

### 5.3.1 ACMA basierter Protonenfluss-Test

Neben der Effizienz der H<sub>V</sub>1-Rekonstitution und dem Anteil an Proteoliposomen ist die Aktivität des insertierten Proteins von zentraler Bedeutung. Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit anhand eines Protonenfluss-Tests auf Basis eines pH-sensitiven Fluorophors, ermittelt (siehe Abschnitt 4.2 und 4.3). Zunächst wurde der Fluorophor 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin (ACMA) verwendet (vgl. Kapitel 4.2). Dieser ist ein gebräuchlicher Indikator für intravesikuläre pH-Änderungen, dessen Einsatz zur Detektion H<sub>V</sub>1, ATPase oder NADH-Q-Oxidoreduktase vermittelter Protonenströme bereits beschrieben wurde.<sup>[1,79,178,228]</sup> Li *et al.* rekonstituierten sowohl das vollständige (273 AS), als auch eine verkürzte Variante des H<sub>V</sub>1-Proteins, in POPC/POPG (3:1)-Liposomen mit einem molaren Protein-zu-Lipid-Verhältnis von 1:2000 (*n/n*). Der Protonenfluss-Test diente hierbei dem qualitativen Vergleich und verifizierte eine beschleunigte Protonentranslokation durch die verkürzte Variante. Diese umfasst allein die spannungssensitiven, transmembranen Domänen (engl. *voltage sensing domain*, VSD; AS 75–223) des Wildtyp-Proteins und bestätigte die Leitfähigkeit der VSD. Eine quantitative Analyse blieb jedoch aus. Aus den in der Veröffentlichung von Li *et al.* dargestellten Graphen konnte eine schnelle exponentielle Abnahme der Fluoreszenz mit einer Halbwertszeit von ca. 28 s abgeschätzt werden.<sup>[79]</sup> Diese liegt trotz des höheren Proteingehalts der während der Rekonstitution eingesetzt wurde, oberhalb der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Zeit von  $13.6 \pm 3.1$  s (P/L von 1:7600 (*n/n*) entspricht 1:80 (*w/w*) in POPC/POPG (3:1)-Liposomen) (vgl. Abbildung 4-21). Die Rekonstitution von H<sub>V</sub>1 in Vesikel der Lipidzusammensetzung POPC/POPE/POPS/SM/PI (6:6:3:3:1) durch Lee *et al.* zeigte ein ähnliches Ergebnis.<sup>[1]</sup> Der Fluoreszenzabfall nach Valinomycinzugabe erfolgt sehr schnell und erreicht eine Sättigung bei 15 % der Restintensität bei einem Protein-zu-Lipid-Verhältnis von 1:100 (*w/w*). Hierbei kann ebenfalls eine Halbwertszeit von etwa 28 s aus dem Graphen ausgelesen werden. Unter Beachtung, dass die Bestimmung der Halbwertszeiten aus den publizierten Graphen durch Abschätzung ungenau und fehlerbehaftet ist, kann keine gravierende Differenz in den Aktivitäten festgestellt werden. Abschließend wird hierdurch die funktionelle Rekonstitution des H<sub>V</sub>1-Kanals unter Bewahrung einer für rekombinante Proteine charakteristischen Aktivität bestätigt.

### 5.3.2 Oregon Green 488 basierter Protonenfluss Nachweis

Die quantitative Analyse der H<sub>V</sub>1 induzierten Protonentranslokation durch den ACMA basierten Protonenfluss-Test ist auf Grund der nicht bekannten Beziehung zwischen dem intravesikulären pH und der Fluoreszenzlöschung nicht möglich.<sup>[1]</sup> Zwar beschrieben Schuldinger *et al.* diese für den ACMA ähnlichen Fluorophor 9-Aminoacridin (9-AA) unter

## Diskussion

der Voraussetzung der Gültigkeit verschiedener Annahmen, jedoch wurden diese später in Frage gestellt.<sup>[131,132,134,229,230]</sup> Eine Annahme war, dass der Fluorophor sich frei bewegt und die Membran passieren kann. Die zweite, dass dieser in Vesikeln komplett gequenchet wird.<sup>[229]</sup> Grzesiek *et al.* untersuchten das Quenching des 9-AA innerhalb negativ geladener PS-Vesikel, wobei ein transmembraner pH-Gradient von zwei Einheiten vorlag. Sie konnten nachweisen, dass die Fluoreszenzintensität durch CCCP Zugabe nur unvollständig wiederhergestellt werden konnte und führten dies auf eine Interaktion des 9-AA mit den negativen Lipiden zurück. Sie diskutierten einen Mechanismus bei dem die negativen Lipide die Bildung von Dimeren bzw. angeregten Dimeren (engl. *excited dimer, excimer*) induzierten sobald hohe attraktive Kräfte zwischen Fluorophor und Membran vorliegen. Hieraus resultiert bereits ein Quenching in Abwesenheit eines pH-Gradienten.<sup>[230]</sup> Dieses Phänomen stellt jedoch eine deutliche Abweichung vom idealen Verhalten dar, welches Schuldiner *et al.* voraussetzten. Arbeiten von Casadio zur Untersuchung der Eigenschaften des Fluorophor ACMA zeigten, dass dieser bereits in der neutralen Form zu einem Anteil von fast 75 % an der Membran adsorbiert, wobei bei maximaler Belegung eine Dichte von einem ACMA-Molekül je 4 Lipide erreicht wird. Das Quenching der membrangebunden Fluorophore wurde auf Wechselwirkungen mit der hydrophoben Matrix der Membran und hydrochromische Effekte zurückgeführt. Eine Bildung von Dimeren wurde hingegen ausgeschlossen.<sup>[134]</sup> Auf Grundlage ihrer Daten passten sie das Modell nach Schuldiner an. Der Einfluss negativ geladener Lipidkopfgruppen auf ACMA wurde jedoch nicht diskutiert und bleibt damit offen. Rottenberg und Moreno-Sanchez verglichen die Eigenschaften von 9-AA und ACMA. Durch Kombination der beiden Fluorophore bauten sie ein System auf, das die geringe Sensitivität des 9-AA im Bereich kleiner pH-Änderungen und der begrenzten Nutzbarkeit des ACMA bei der Detektion großer pH-Änderungen ( $\Delta\text{pH} > 3$ ) ausglich. Somit konnte eine lineare Beziehung zwischen Quenching und pH-Änderung beobachtet werden, welche im Einzelfall nicht vorliegt. Sie führten dabei die erhöhte Sensitivität des ACMA auf dessen, im Vergleich zu 9-AA, hydrophoberen Eigenschaften zurück. Diese verstärken die Membranabsorption und erhöhen somit das Quenching.<sup>[133]</sup> Das System ermöglichte eine weniger fehlerhafte Korrelation zwischen Quenching der Fluoreszenzintensität und pH-Änderung. Dennoch konnten sie die Fehlerquellen nicht beseitigen. Zudem ist nicht klar, in wie weit die zunehmende Protonentranslokation an der Vesikeloberfläche auf Grund negativer Lipide, welche bereits in Abschnitt 5.2.1.1 diskutiert wurde, die Sensitivität des ACMA beeinflusst.

### 5.3.2.1 Bestimmung des pK<sub>s</sub>-Wertes von OG488-DHPE in negativ geladenen Membranen

Ein bekannter Fluorophor, welcher zur quantitativen Detektion von intravesikulären pH-Änderungen eingesetzt wird ist Pyranin.<sup>[231]</sup> Dieser muss zu diesem Zweck jedoch während der Präparation in den Vesikeln eingeschlossen werden, da er im Gegensatz zu ACMA nicht membrangängig ist. Anschließend muss das überschüssige Pyranin z. B. durch

chromatographische Methoden entfernt werden. Dies erschwert die Präparation und erfordert zusätzliche Arbeitsschritte, welche die Aktivität des Proteins beeinflussen könnten. Neben freien Farbstoffen wie ACMA und Pyranin existieren lipidgebundene, pH-sensitive Fluorophore, welche durch die Insertion des Lipids fest in der Membran verankert sind. Thelen *et al.* synthetisierten einen 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DPPE) gebundenen Fluorescein-Farbstoff (Fluorescein-PE) zur Untersuchung der Membranprotein induzierten pH-Änderung innerhalb von Vesikeln.<sup>[232]</sup> Schwamborn *et al.* entwickelten einen ähnlichen Assay zur quantitativen Charakterisierung der TF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase Protonentranslokation in künstlichen Vesikeln.<sup>[178]</sup> Sie nutzen hierbei den lipidgebundenen Fluorophor Oregon Green 488 (OG488), welcher im Gegensatz zu Pyranin bereits bei der Präparation der Lipidfilme eingebracht werden konnte. Der freie OG488 Farbstoff besitzt, anders als ACMA, eine sehr geringe Interaktion mit der Membran, wie Studien von Hughes *et al.* verifizierten.<sup>[233]</sup> Sie untersuchten hierbei systematisch die Wechselwirkung von wasserlöslichen Fluorophoren mit Modellmembranen und bestimmten den *Membrane Interaction Factor* (MIF). Dieser wurde aus dem Verhältnis des membrangebundenen und wassergelösten Fluorophoranteils bestimmt und lag für OG488 bei 0.04, wobei bei einem Wert < 0.1 von einer nahezu nicht vorhandenen Membraninteraktion ausgegangen wurde.<sup>[233]</sup> Jedoch kann dieser Farbstoff durch die Kopplung an ein Lipid wie DHPE selektiv an der Oberfläche der Vesikelmembran eingebracht werden.<sup>[135,178,234]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls die DHPE gebundene Variante OG488-DHPE zur Bestimmung der quantitativen Protonentranslokation eingesetzt. Zunächst wurde der systemspezifische pK<sub>s</sub>-Wert des in POPC/POPG/Chol-Membranen insertierten Farbstoffs bestimmt. Zu diesem Zweck wurden POPC/POPG/Chol/OG488-DHPE (54.5:25:20:0.5)-Vesikel mit intravesikulären pH-Werten von 4, 5, 6 und 7 mit einem äquivalenten pH-Wert verdünnt und deren Emissionsspektren gemessen (siehe Abschnitt 4.3.1). Der aus den Messungen ermittelte pK<sub>s</sub>-Wert von 6.91 für OG488-DHPE steht im Kontrast zu dem des freien in Wasser gelösten Farbstoffs von 4.7, welchen Sanden *et al.* ermittelten.<sup>[135]</sup> Es bestätigt jedoch dessen Nutzbarkeit für Detektionen von pH-Änderungen im physiologischen Bereich. Eine ähnliche pK<sub>s</sub>-Verschiebung wurde ebenfalls durch Sanden *et al.* detektiert. Sie untersuchten den Protonentransfer an und über künstliche Vesikelmembranen und bestimmten einen pK<sub>s</sub>-Wert von 6.7 für OG488-DHPE in einer 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DOPG) Membran in einer 150 mM NaCl-Lösung. Für den gleichen Fluorophor in einer DOPC-Membran wurde ein geringerer pK<sub>s</sub>-Wert von 6.3 bestimmt. Hieraus schlossen sie auf eine erhöhte Protonenakkumulation an negativ geladenen Membranen (siehe dazu auch Abschnitt 5.2.1.1). Schwamborn *et al.* ermittelten einen pK<sub>s</sub>-Wert von 6.1 für OG488-DHPE, welches insertiert wurde in eine DOPC/POPE/POPS/Chol/OG488-DHPE (49:20:10:20:1)-Membran (Puffer: 0.5 mM MOPS, 100 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>).<sup>[178]</sup> Die Ergebnisse legen nahe, dass die starke Verschiebung, des im Rahmen dieser Arbeit ermittelten pK<sub>s</sub>-Wertes von OG488-DHPE, auf den 25 %igen Anteil negativ geladener Lipide zurückzuführen ist. Sanden *et al.* zeigten zudem, dass ein ähnliches Verhalten der Verschiebung des pK<sub>s</sub>-Wertes als Resultat der Membraninsertion auch für lipidgebundene Fluorescein beobachtet werden

## Diskussion

kann. Hierbei wurde ein Anstieg des Wertes von 6.4 für freies Fluorescein (gelöst in H<sub>2</sub>O) auf 8.2 für Fluorescein-DHPE in einer DOPC-Membran (in 150 mM NaCl) bestimmt.<sup>[135]</sup> Bereits zwei Jahrzehnte zuvor veröffentlichten Thelen *et al.* eine Studie zur Untersuchung der Charakteristika des an 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-phosphatidylethanolamin (DPPE) gekoppelten Fluorescein und wiesen hierbei eine positive Verschiebung des pK<sub>s</sub>-Wertes als Folge der Insertion in Triton X-100 Mizellen nach.<sup>[232]</sup> Sie diskutierten hierbei dessen Eignung zur Untersuchung Membranprotein induzierter intravesikulärer pH-Änderungen und legten die Grundlage für den hier vorgestellten Protonenfluss-Test. Des Weiteren konnten sie die Senkung des pK<sub>s</sub>-Wertes um eine Einheit als Folge des Anstiegs der Ionenstärke von 0 auf 200 mM KCl nachweisen. Im Rahmen der Studie von Sanden *et al.* wurde eine ähnliche Korrelation verifiziert. Die Erhöhung der Natriumchloridkonzentration von 150 mM auf 600 mM resultierte in einer Erniedrigung um 0.3 Einheiten bei Fluorescein-DHPE und 0.4 Einheiten bei OG488-DHPE in einer DOPG-Membran.<sup>[135]</sup>

Die Bestimmung der Protonentranslokation durch den H<sub>v</sub>1-Protonenkanal erforderte eine Kalibrierung des Systems unter den Bedingungen des Protonenfluss-Testes. Zu diesem Zweck wurden die Vesikel (100 nm Durchmesser) mit einem intravesikulären pH-Wert von 4, 5, 6 oder 7 in Fluxpuffer verdünnt und deren Emissionsspektren bestimmt (siehe Abbildung 4-27 B). Der pH-Wert des äußeren Fluxpuffers blieb hierbei konstant bei pH = 7. Aus diesen wurde in analoger Weise ein pK<sub>s</sub>-Wert von 6.94 aus der Datenanpassung nach Formel 3-10 (siehe Kapitel 3.4.3) bestimmt. Des Weiteren wurde anhand der Anpassung eine Untergrenze der Restfluoreszenz (F<sub>min</sub>) von 43 % ermittelt. Dies entspricht einer maximalen Fluoreszenzlöschung von 57 % und liegt somit oberhalb des für die innere Monoschicht berechneten löschbaren Anteils der Gesamtfluoreszenz. (siehe Abbildung 5-2). Für einen Vesikeldurchmesser von 100 nm sollte der Anteil der äußeren Monoschicht, analog zu der Oberflächenberechnung in Abschnitt 8.3, etwa 54 % betragen. Hieraus folgt bei einer vollständigen Fluoreszenzlöschung der inneren Monoschicht ein Quenching von 46%.

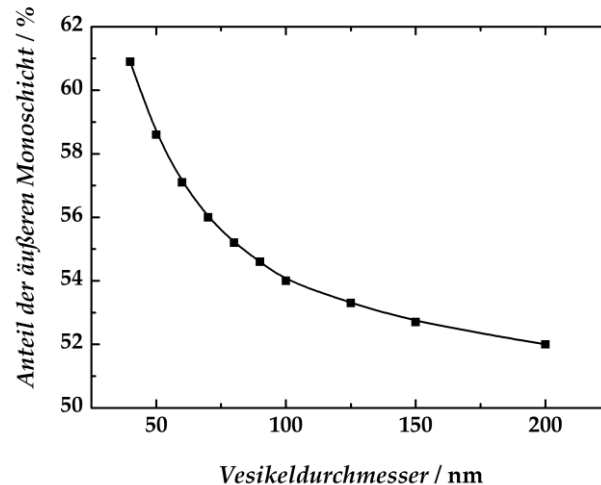


Abbildung 5-2: Flächenanteil der äußeren Monoschicht an der Gesamtoberfläche der Lipidoberfläche eines kugelförmigen Vesikels in Abhängigkeit des Durchmessers.

Die auf der Grundlage der Datenanpassung ermittelte minimale Fluoreszenz wurde daher unterbestimmt. Dies ist zum einen auf den Fehler der normierten Intensität bei pH 4 (vgl. Abbildung 4-27) zurückzuführen, da dieser Wert maßgeblich die ermittelte Untergrenze bestimmt. Unter Berücksichtigung des Fehlers von  $\pm 7.5\%$  liegt diese bei 50 % und somit im Bereich der Theorie, ausgehend von einer symmetrischen Verteilung des OG488-DHPE Fluorophors in der Lipidmembran. Shimokawa *et al.* untersuchten die Bildung von Mikrodomänen von verschiedenen POPC/Chol-Membranen. In einem Bereich des Mischungsverhältnisses von POPC/Chol (90:10 bis 40:60) konnten hierbei keine Domänen beobachtet werden.<sup>[235]</sup> Da POPS wie POPC eine Phasenumwandlungstemperatur von  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$  besitzt ist auch in der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lipidzusammensetzung nicht von einer Phasenseparation auszugehen. Die von Bordokovsky *et al.* diskutierte Vorzugsorientierung des OG488-DHPE in der geordneten Phase tritt somit nicht in Erscheinung und sollte daher allgemein keinen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften des Fluorophors ausüben. Eine Unterstimmung von  $F_{\min}$  wäre des Weiteren durch einen erhöhten Fluorophoranteil im Vesikelinneren zu erklären. Dieser Fall könnte eintreten, wenn die Bildung unilamellarer Vesikel durch Extrusion unvollständig abläuft und ein Anteil multilamellare Vesikel zurückbliebe. Dies ist jedoch für Vesikel im 100 nm Bereich auszuschließen und konnte in der Vergangenheit nicht beobachtet werden.<sup>[236]</sup> Zudem hätte ein ähnlicher Effekt auch bei den Messungen von Schwamborn *et al.* beobachtet werden können, da die Präparation der Vesikel analog erfolgte.<sup>[178]</sup> Aus den Ergebnissen kann die erfolgreiche Bestimmung des  $pK_s$ -Werte des in die Membran insertierten OG488-DHPE und somit die Kalibrierung des Systems geschlussfolgert werden. Diese legt den Grundstein für die Quantifizierung der Protonentranslokation durch den  $H_V1$ -Protonenkanal.

## Diskussion

### 5.3.2.2 Vergleich der ACMA und OG488 basierten Protonenfluss-Tests

In Analogie zum ACMA basierten Protonenfluss-Test wurde die zeitabhängige  $H_v1$  induzierte Fluoreszenzlöschung des OG488-DHPE ausgewertet. Hierbei wurde eine mittlere Halbwertszeit von  $12.2 \pm 4.3$  s ( $P/L = 1:12000$  ( $n/n$ )) bestimmt (siehe Abschnitt 4.3.2). Diese deckt sich unter Berücksichtigung des Fehlers mit den Werten, welche im Zuge der ACMA-Experimente für Protein-zu-Lipid-Verhältnisse von  $1:17300$  ( $n/n$ ) ( $\tau_{1/2} = 8.9 \pm 2.4$  s) und  $1:34600$  ( $n/n$ ) ( $\tau_{1/2} = 11.6 \pm 1.8$  s) ermittelt wurden (vgl. Abbildung 4-21). Eine Ursache der geringfügigen Verlängerung der Halbwertszeit könnte eine langsamere Protonentranslokation oder eine Verlangsamung der Protonierung des Fluorophors darstellen. Erstere kann nicht ausgeschlossen werden, da die Rekonstitution zwar äquivalent zu der Rekonstitution für den ACMA basierten Fluxtest durchgeführt, hierbei aber in einem kleineren Maßstab gearbeitet wurde. Während der Präparation der OG488-Proteoliposomen wurde nur die Hälfte der Lipidmenge und somit eine deutlich geringere Menge des Protonenkanals während der Rekonstitution eingesetzt. Ausgehend von einer gleichbleibenden Adsorption des Proteins an der Oberfläche von Reaktionsgefäßen- und Dialyseschläuchen wie sie in Abschnitt 5.2.1 diskutiert wurde hat diese bei der Verwendung geringerer Proteinmengen einen größeren relativen Einfluss. Das reale Protein-zu-Lipid-Verhältnis kann daher stärker von dem nominalen Verhältnis abweichen. Eine Verlangsamung der Protonierung des Fluorophors als Ursache der unterschiedlichen Lokalisation von ACMA und OG488-DHPE innerhalb der Vesikel bietet eine weitere mögliche Erklärung. Sanden *et al.* beschrieben ein Modell bei dem die Protonierung des Fluorophors bei einem  $pH > 8$  über die Membran und bei  $pH < 7$  direkt aus der Lösung erfolgte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei einem  $pH$  von 7 gearbeitet, daher in einem dazwischenliegenden Grenzbereich. Eine Protonierung des OG488-DHPE über Membran könnte somit gegenüber dem gelösten ACMA verlangsamt erfolgen.

Der Anteil der gelöschten normierten Fluoreszenz betrug  $32 \pm 10$  % und somit etwa die Hälfte, des in den ACMA basierten Protonenfluss-Tests bestimmten Prozentsatzes. Eine hierfür ursächliche geringere Rekonstitutionsrate wurde bereits diskutiert (siehe Abschnitt 5.3.2.1). Ein zweiter Erklärungsansatz erfolgte auf Grund der unterschiedlichen Abhängigkeiten der Protonentranslokationsmechanismen des Protonophors CCCP und des Protonenkanals  $H_v1$  von der vorliegenden Membranspannung. Aus dem Valinomycin induzierten Kaliumaustrom, welcher entlang des Konzentrationsgradienten erfolgt, resultiert ein Protoneneinstrom in die Liposomen. Dieser führt zu einem Ladungsausgleich im intravesikulären Raum. Der CCCP vermittelte Membrandurchtritt der Protonen wird hierbei allein durch den bestehenden Kaliumaustrom bzw. Konzentrationsgradienten kontrolliert und erlöscht erst bei Eintreten des Gleichgewichtes. Im Fall des Kanals ist die Protonentranslokation abhängig von dem Membranpotential, welches durch den Kaliumgradienten aufgebaut wird. Gleichzeitig wird durch die Protonentranslokation ein



entgegen gerichtetes Potential aufgebaut (vgl. Abbildung 5-3). Die Potentialdifferenzen  $\Delta V_{Potential}$  wurden aus der Nernst-Gleichung berechnet:

$$\Delta V_{Potential} = -\frac{R \cdot T}{F \cdot z} \ln \left( \frac{X_1}{X_2} \right) = -58.3 \text{ mV} \cdot \log \left( \frac{X_1}{X_2} \right) \quad [237] \quad 5-2$$

Hierbei steht  $R$  für die allgemeine Gaskonstante,  $T$  für die Temperatur (hier 293 K),  $F$  für die Faradaykonstante und  $z$  für die Ladung des Moleküls ( $z=1$ ).  $X_1$  und  $X_2$  geben die Konzentrationen der Ionen im intra- bzw. extravesikulären Raum an. Aus der Auftragung des Betrags der Potentialdifferenz gegen die Anzahl der verschobenen Ionen  $X$  wird deutlich, dass auf Grund der vorliegenden Ionenstärke und des Volumens pro Vesikel das Potential, welches durch die Kaliumionen hervorgerufen wird, bis zu einer Anzahl von  $10^4$  transportierten Ionen stabil ist. Das Potential, welches auf dem sich einstellenden Protonengradienten beruht, steigt bereits ab  $10^2$  transportierten Protonen deutlich an.

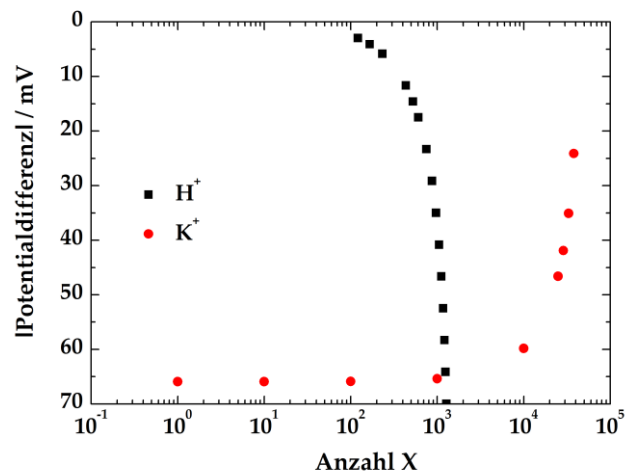


Abbildung 5-3: Auftragung des Betrags der Potentialdifferenzen über die Vesikelmembran gegen die Anzahl der transportierten Ionen  $X$ . Während eine deutliche Änderung des Kaliumionen-induzierten Potentials erst ab etwa  $10^4$  transportierten Ionen auftritt, wird eine Verschiebung des Protonenpotentials schon ab einer Anzahl von über 100 eingeströmten Protonen deutlich.

Zu Beginn der Valinomycinzugabe liegt somit eine Potentialdifferenz von etwa 65 mV an der Vesikelmembran vor. Diese induziert die Öffnung des Kanals. Bei dem vorliegenden Messaufbau liegt sowohl im inner- als auch extravesikulären Raum ein pH von 7 vor. Das notwendige Potential, welches die Öffnung des Kanals hervorruft, ist abhängig von der pH-Differenz zwischen den Kompartimenten, sowie von der Tatsache ob der Kanal nativ oder in anderen Zellen wie HEK-293- oder COS-7-Zellen exprimiert wurde.<sup>[25,26,50]</sup> Für *E. coli* Zellen bzw. künstliche Membransysteme liegen leider keine genauen Daten vor. Lee *et al.* nahmen bei ihrer Berechnung zur Protonenrate in einem künstlichen Membransystem eine Spannung von 40 mV zur Aktivierung von 50 % der Protonenleitfähigkeit ( $V_{1/2}$ ) an.<sup>[1]</sup> Li *et al.* setzten bei ihrer Simulation zur Abhängigkeit des Leitwertes von der Spannung einen  $V_{1/2}$ -Wert von

## Diskussion

58 mV voraus.<sup>[79]</sup> Durch die Protonentranslokation wird eine Änderung des Verhältnisses von innerem und äußeren pH-Wert der Vesikel hervorgerufen. Diese geht mit einer in der Verschiebung der Schwellenspannung einher, welche für den H<sub>V</sub>1-Kanal charakteristisch ist. Aus der Auftragung der Schwellenspannung gegen die Nernst-Spannung, welche aus der Differenz der Protonenkonzentration auf beiden Seiten der Membran errechnet werden kann, wurde eine Verschiebung von 40 mV pro pH-Einheit für den nativen Kanal in Alveolarepithelzellen von Ratten bestimmt.<sup>[51]</sup> Ramsey *et al.* konnten während ihrer Entdeckung des Kanals im Jahre 2006, in HM1-Zellen ebenfalls eine Verschiebung der Schwellenspannung bei einer Änderung der pH-Differenz von einer Einheit beobachten.<sup>[25]</sup> Diese lag bei -40 mV für eine Steigerung des extrazellulären pH-Wertes (pH<sub>o</sub>) um eine Einheit, welche den Protonenausstrom begünstigt. Für den entgegengesetzten Fall, eine pH-Erniedrigung im Zelläußeren, wurde hingegen einer Verschiebung der Schwellenspannung von 11 zu 70 mV beobachtet. Sasaki *et al.* beobachteten ebenfalls eine Verschiebung größer als 40 mV und bestimmten einen V<sub>1/2</sub>-Wert von 63.7 mV (pH<sub>i</sub> = pH<sub>o</sub> = 7). Übertragen auf das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte System bedeutet dies, dass der Protoneneinstrom und die damit verbundenen Senkung des inneren pH-Wertes (pH<sub>i</sub>) zu einer Verschiebung der Schwellenspannung zu positiveren Werten führt. Hieraus resultiert eine weitere Reduktion der Leitfähigkeit bis hin zum Abbruch der Protonentranslokation bevor der Kaliumgradient erloschen ist. Hingegen erfolgt die Protonenleitung durch CCCP bis zu dem Punkt an dem sich die Potentiale schneiden, das heißt das Verhältnis der Konzentration der Kaliumionen dem umgekehrten Verhältnis der Protonenkonzentrationen entspricht. Basierend auf den unterschiedlichen Abhängigkeiten der Protonenleitung erfolgt möglicherweise durch CCCP Induktion eine verstärkte Fluoreszenzlöschung des OG488-Fluorophors gegenüber des H<sub>V</sub>1 vermittelten Quenchings. In Erwartung eines Proteoliposomenanteils von etwa 70 % würde dies bedeuten, dass der Effekt einen etwa 7-fachen Protoneneinstrom zur Folge hat. Dies ist jedoch rein rechnerisch nicht möglich, da der Gradient bereits erloschen wäre.

Bei dem nominalen Protein-zu-Lipid-Verhältnis von 1:12000 (*n/n*) wurde ein Proteoliposomenanteil von etwa 70 % sowie eine Halbwertszeit der OG488-DHPE Fluoreszenz von ca. 10–11 s erwartet. Es wurde jedoch eine längere Halbwertszeit ( $12.2 \pm 4.3$  s) sowie ein leicht reduzierter Proteoliposomenanteil ( $63 \pm 10$  %) bestimmt. Diese liegen in Bereichen eines Verhältnisses von 1:69200 (*n/n*) bis 1:34600 (*n/n*), welche im Zuge des ACMA basierten Tests beobachtet wurden. Hieraus lässt sich folgern, dass primär der Verlust von Protein während der Rekonstitution zu einer Beeinträchtigung der Rekonstitutionsrate und somit der verringerten Fluoreszenzlöschung beiträgt.

Die Löschung der relativen Fluoreszenz erfolgte ebenfalls zu einem deutlich geringeren Anteil von 4.1 %. Im Kontrast hierzu liegt der Wert für die ACMA basierten Messungen eine Größenordnung darüber bei 49 %. Dies ist auf die erhöhte pH-Sensitivität des ACMA auf Grund des höheren pK<sub>s</sub>-Wertes von 8.5 zurückzuführen.<sup>[126,238]</sup> Ein vergleichbarer

Unterschied in der Fluoreszenzlöschung von ACMA und OG488-DHPE konnte ebenfalls durch Schwamborn *et al.* verifiziert werden.<sup>[178]</sup>

Auf der Basis der vorliegenden Daten kann bestätigt werden, dass der OG488-DHPE basierte Protonenfluss-Test erfolgreich zur Bestimmung der H<sub>V</sub>1-Kanal vermittelten Protonentranslokation etabliert werden konnte.

### 5.3.2.3 Quantifizierung der H<sub>V</sub>1 induzierten intravesikulären pH-Verschiebung

Die Bestimmung des Stroms bzw. des Leitwertes des H<sub>V</sub>1-Protonenkanals ist schwierig, da unter physiologischen Bedingungen eine geringe Protonenkonzentration vorliegt. Dieses verursachte auch ein ungünstiges Signal-Rausch-Verhältnis von ca. 0.5 während der elektrophysiologischen Patch-Clamp Experimente an humanen neutrophilen Granulozyten. DeCoursey und Cherny bestimmten hieraus einen Leitwert von etwa 10 fS.<sup>[45]</sup> Zehn Jahre später führten Cherny, DeCoursey und Mitarbeiter erneut Patch-Clamp Messungen der Protonenströme an humanen eosinophilen Granulozyten durch und analysierten bei ihrer Auswertung das Rauschen. Sie bestimmten einen Leitwert von etwa 140 fS.<sup>[46]</sup> Im Vergleich zu anderen spannungsgesteuerten Kationenkanälen ist dieser Wert sehr gering. So zeigen Kalium- wie auch Natriumkanäle Leitwerte im pS-Bereich auf.<sup>[48,239,240]</sup>

Lee *et al.* modellierten den Protonenfluss und den Leitwert nach einer Vorlage von Moffat *et al.*, welche den Leitwert des M2-Protonenkanals des Influenza A Virus durch Rücktitration bestimmten.<sup>[1,241]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit soll der Protonenfluss bzw. Leitwert aus der pH-Änderung quantifiziert werden, welche über die Fluoreszenzlöschung von OG488-DHPE bestimmt wurde (siehe Abschnitt 4.3.2.1 und 4.3.2.2). Unter Annahme eines Protein-zu-Lipid-Verhältnisses von 1:12000 (*n/n*) (7 Kanäle pro Vesikel) und unter Berücksichtigung der relativen Fluoreszenzänderung in Relation zum Proteoliposomenanteil wurde eine mittlere pH-Änderung von 0.11 Einheiten bestimmt (vgl. Abschnitt 4.3.2.1). Dies entspricht einem Einstrom von 255 Protonen pro Vesikel. Unter der Voraussetzung, dass dieser Prozess nach 30 s abgeschlossen ist und eine dem Nernstpotential, welches auf dem Kaliumgradienten basiert, entsprechende Membranspannung von etwa 65 mV vorliegt, wurde ein Leitwert von 3.0 aS errechnet. Dieser liegt mehr als drei Größenordnungen unter dem für native Kanäle bestimmten Leitwert. Ausgehend von einem Fehler der pH-Änderung von 0.02 Einheiten liegt der Fehler des Leitwertes bei etwa 0.06 aS.

Mögliche Ursachen für eine Unterbestimmung des Wertes sollen im Folgenden diskutiert werden. Zum einen wurde bei der Berechnung der Anzahl der Protonenkanäle die Orientierung der Kanäle vernachlässigt. Lee *et al.* konnten durch Simulationen der Fluoreszenzabfälle des ACMA basierten Protonenfluss-Tests zeigen, dass keine Vorzugsorientierung vorliegt und gingen von einer 1:1 Orientierung aus.<sup>[1]</sup> Bereits im Vorfeld wurde diskutiert, dass die Rekonstitution mittels DM eine solche zufällige

## Diskussion

Orientierung begünstigt (siehe Abschnitt 5.2.2).<sup>[177,226,227]</sup> Aus einer korrigierten mittleren Anzahl von 3.5 Kanälen pro Vesikel resultiert ein Leitwert von 0.06 fS.

Bei der Berechnung des Leitwertes im Rahmen dieser Arbeit wurde angenommen, dass die maximale mögliche Löschung der Fluoreszenz nach etwa 30 s erreicht ist. Ein Großteil der Löschung erfolgt jedoch in weniger als der Hälfte der Zeit, da eine Halbwertszeit von 12.2 s bestimmt wurde (siehe Abbildung 4-30 A). Der Leitwert kurz nach der Valinomycinzugabe fällt somit größer aus.

Aus der Abbildung 4-25 wird deutlich, dass eine deutliche Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Aktivierung und der Protonentranslokation von der Temperatur besteht. Eine solche Abhängigkeit ist für den Protonenkanal charakteristisch und wurde bereits in der Literatur beschrieben.<sup>[52,53,54]</sup> Da die Experimente zur Bestimmung des Protonenstroms von DeCoursey *et al.* und Cherny *et al.* bei 19-25 °C durchgeführt wurde, kann ein Einfluss der Temperatur ausgeschlossen werden. Diese würde auch die starke Diskrepanz nicht erklären können, da der  $Q_{10}$ -Wert bei lediglich 2-3 liegt (siehe dazu Abschnitt 5.3.4).

Eine weitere Beeinflussung der Protonentranslokation des  $H_V1$ -Kanals erfolgt durch dessen *N*-Terminus. Hondares *et al.* entdeckten eine verkürzte Version des Kanals in B-Lymphozyten. Diesem fehlten gegenüber dem Wildtyp die ersten 20 Aminosäuren. Die kürzere Isoform öffnete langsamer aber wies eine erhöhte Leitfähigkeit auf.<sup>[60]</sup> Berger *et al.* entdeckten, dass eine posttranslationale Entfernung der ersten 68 Aminosäuren des  $H_V1$ -Kanals in Spermien zu einer verstärkten Beeinflussung durch den äußeren pH-Wert führt.<sup>[62]</sup> Hierdurch wurde die Schwellenspannung im Vergleich zum Wildtyp zu geringeren positiven Spannungen verschoben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *N*-Terminus durch den angefügten His<sub>6</sub>-Tag verlängert. Dies könnte somit einen negativen Einfluss haben. Rebecca Rixen untersuchte im Rahmen ihrer Bachelorarbeit diesen Einfluss. Sie konnte durch den proteolytischen Thrombinverdau jedoch lediglich 17 der zusätzlichen 46 Aminosäuren entfernen. Die so erhaltene Variante des Kanals zeigte bereits eine um 5 % gesteigerte Fluoreszenzlöschung innerhalb des ACMA basierten Protonenfluss-Tests.<sup>[172]</sup>

Der im Rahmen dieser Arbeit ermittelte  $pK_s$ -Wert des OG488-DHPE ist im Vergleich zu den Literatur bekannten Werten erhöht. Selbst für das in einer komplett negativ geladenen Membran vorliegende OG488-DOPG wurde nur ein  $pK_s$ -Wert von 6.7 in 150 mM NaCl-Lösung bestimmt.<sup>[242]</sup> Eine Überbestimmung des  $pK_s$ -Wertes hätte wiederum eine Unterbestimmung der intravesikulären pH-Änderung und der damit verbundenen Protonentranslokation zur Folge, ebenso wie die diskutierte Unterbestimmung der minimalen Fluoreszenzintensität  $F_{\min}$  bei pH 4 (vgl. Abschnitt 5.3.2.1). Exemplarisch soll für einen  $pK_s$ -Wert von 6.7 sowie einen  $F_{\min}$ -Wert von 0.55 die mittlere pH-Änderung berechnet werden. Diese läge bei etwa 0.6 Einheiten und resultiert in einen Leitwert von 0.032 fS.

Auch Lee *et al.* errechneten einen Leitwert des heterolog exprimierten und rekonstituierten H<sub>v</sub>1-Kanal von lediglich 0.1 fS.<sup>[1]</sup> Auch dieser Wert liegt bis zu drei Größenordnungen unter dem Leitwert der nativen Kanäle. Allgemein wird in der Literatur ein Unterschied zwischen nativen und exprimierten Kanälen diskutiert.<sup>[43,50,243]</sup> So besitzen die heterolog exprimierten Kanäle eine negativere Schwellenspannung von -10 bis 7 mV statt der üblichen 20 mV.<sup>[50,43,58]</sup> Die Abhängigkeit dieser von dem Nernst-Potential blieb jedoch nahezu unverändert. Sollte der Kanal auf Grund der SDS Solubilisierung als Monomer statt als Dimer vorliegen, hätte dies laut Musset *et al.* den gegenteiligen Effekt zur Folge.<sup>[244]</sup> Musset *et al.* testeten systematisch native und HEK- sowie COS-Zellen exprimierte Kanäle und konnten keine Erklärung für die Verschiebung der Schwellenspannung finden. Posttranslationale Modifikationen wie auch Glycosylierungen schlossen sie aus.<sup>[50]</sup> Der im Rahmen dieser Arbeit errechnete Leitwert unterscheidet sich somit deutlich von denen der nativen Kanäle, dennoch liegt er in einem Bereich der bereits durch eine andere Forschergruppen modelliert wurde.

### 5.3.3 Inhibition und Aktivierung der H<sub>v</sub>1 Protonentranslokation

Dem H<sub>v</sub>1-Kanal kommt auf Grund der physiologischen Relevanz eine größer werdende Bedeutung bei der medikamentösen Behandlung der mit dem Kanal in Verbindung stehenden Erkrankungen zu (siehe Kapitel 1.2.4).<sup>[37,101]</sup> Ein einfaches System zum *Screening* möglicher Inhibitoren oder Aktivatoren erleichtert die Suche nach therapeutisch einsetzbaren Medikamenten. Der im Rahmen dieser Arbeit auf den H<sub>v</sub>1-Protonenkanal übertragene ACMA wie auch der OG488-DHPE gestützte Protonenfluss-Test soll nachfolgend diesen Zweck zur Untersuchung der Inhibition und der Aktivierung des rekombinanten Proteins erfüllen. Anschließend sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

- a) Ist der Test kompatibel mit den eingesetzten Inhibitoren / Aktivatoren?
- b) Kann ein geeigneter Inhibitor für Impedanz- / SEIRA-Studien gefunden werden?
- c) In wie weit entspricht der rekombinante Kanal in seinem Verhalten dem Wildtyp?

#### 5.3.3.1 Charakterisierung der 2GBI induzierten Inhibition des H<sub>v</sub>1

Anhand des ACMA basierten Test zum Nachweis der Protonentranslokation konnte eine deutliche Inhibition der Geschwindigkeit der Fluoreszenzlöschung welche mit der Reduktion der Protonentranslokation des Kanals korreliert von  $34 \pm 21$  % bei einer 2GBI-Konzentration von 170  $\mu$ M bestimmt werden (vgl. Kapitel 4.2.6). Dies kann zum einen auf einer Verringerung der mittleren Protonentranslokationsrate aller Kanäle beruhen. Zum anderen wäre es denkbar, dass einzelne Kanäle innerhalb der Vesikel inhiert werden und

## Diskussion

somit im Mittel ein verlangsamter Protonenstrom beobachtet werden kann. Der Abfall der Fluoreszenzintensität innerhalb der ersten 60 s nach der Valinomycin Zugabe wurde wie auch die Geschwindigkeitskonstanten des exponentiellen Intensitätsabfalls um  $43 \pm 16 \%$  reduziert. Die prozentuale Fluoreszenzlöschung ist in diesem Fall kein Maß für die Rekonstitutionseffizienz bzw. die Anzahl der, in den Liposomen enthaltenen Protonenkanälen, wie sie in Abschnitt 5.2.1 beschrieben wurde. Sie kann vielmehr auf die verringerte Geschwindigkeit der Fluoreszenzlöschung bzw. einer Steigerung des Anteils inhibierter Kanäle zurückgeführt werden. So würde in einem einfachen Modell die vollständige Inhibition aller in einem Vesikel befindlichen Protonenkanäle eine Valinomycin induzierte Fluoreszenzlöschung ausschließen. Unter Beachtung der ermittelten Fehler ist zwischen den beiden Parametern kein Unterschied in bestimmter Stärke der Inhibition festzustellen. Eine Anpassung der Daten an das Hill-Modell lieferte eine Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von  $88 \pm 64 \mu\text{M}$  sowie ein Hill-Koeffizient von  $1.7 \pm 0.8$ . Die Anpassung der Werte der prozentualen Inhibition welche auf Basis des  $A_{60}$ -Wertes ermittelt wurden, ergab einen  $K_D$ -Wert von  $27 \pm 8 \mu\text{M}$  unter Annahme eines Hill-Koeffizienten von 1.0 auf Basis der Studien von Hong *et al.*<sup>[2]</sup>

Analoge Messungen zur Charakterisierung der 2GBI induzierten Hemmung des Protonenkanals wurden mit Hilfe der OG488-DHPE basierten Fluxtests durchgeführt. Hierbei wurde für die Konstante des exponentiellen Abfalls der Fluoreszenzintensität im direkten Vergleich zum ACMA basierten Assay eine nahezu identische Inhibition ermittelt. Aus diesen wurde nach dem Hill-Modell eine Dissoziationskonstante von  $20 \pm 7 \mu\text{M}$  unter der Annahme, dass ein Hill-Koeffizient von 1.0 vorliegt, bestimmt (vgl. Abbildung 4-30). Aus den Daten des prozentualen Intensitätsabfalls konnte eine erhöhte Inhibition bestimmt werden, welche in einer Dissoziationskonstante von  $47 \pm 19 \mu\text{M}$  und einem Hill-Koeffizienten von  $0.99 \pm 0.23$  resultiert.

Aus der Inhibition des  $H_v1$ -Kanals welche auf Grundlage der 2GBI-konzentrations-abhängigen Änderung der Konstante des exponentiellen Intensitätsabfalls  $k$  berechnet wurde konnte eine nahezu identische Dissoziationskonstante sowohl aus den Daten des ACMA als auch aus den OG488-DHPE basierten Protonenfluss-Tests bestimmt werden. Hieraus kann die erfolgreiche Reproduzierbarkeit der Ergebnisse abgeleitet werden. Diese liegen etwa um einen Faktor zwei oberhalb der in der Literatur diskutierten Konzentration von 2GBI.<sup>[2,30,66]</sup> Jedoch besitzen diese relativ große Fehler von etwa 50 %, dies relativiert die Abweichung von dem Literaturwert. Die Fehler könnten u. a. auf Mischungsprobleme innerhalb der Küvetten während der Versuchsdurchführung zurückzuführen sein. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die Literaturwerte aus der direkten Messung der Protonenströme in *Xenopus* Eizellen durchgeführt wurden. Hierbei wiesen die Kanäle deutlich höhere Protonenströme im Vergleich zudem hier vorliegenden Membransystem auf (vgl. Abschnitt 5.3.2.3). Auf Grund der relativ schwachen Protonenströme und damit einhergehenden relativ geringen pH-Änderungen kommt es leichter zu Schwankungen in der Protonentranslokation

die einen großen Fehler hervorrufen können. Besonders im Fall des OG488-DHPE, welches in der Membran lokalisiert ist und somit direkt die Änderung der Protonenströme entlang und durch die Membran registriert, tritt ein verstärktes Rauschen des Signals auf (vgl. Abbildung 4-30). Dieses konnte im Fall der ACMA basierten Messungen nicht beobachtet werden, vermutlich da das Gesamtsignal durch die Menge an freien Fluorophor in der Lösung stabilisiert wurde. Zudem sinkt der exponentielle Charakter des Fluoreszenzabfalls mit steigender 2GBI-Konzentration. Die Anpassung der Daten wird damit zunehmend ungenauer, wodurch der systematische Fehler größer wird.

### **Ausschluss der Dimer Bildung des H<sub>v</sub>1-Kanals und der kooperativen Inhibition**

Durch zahlreiche Forschungsergebnisse konnte in der Literatur belegt werden, dass der native H<sub>v</sub>1-Kanals als Dimer vorliegt, wobei jede Untereinheit in der Lage ist Protonen zu leiten.<sup>[28,30,245]</sup> Verschiedene Forschergruppen konnten durch Mutations-Experimente und Einzelmolekül-Fluoreszenzlöschung zeigen, dass der C-Terminus maßgeblich zur Dimer Bildung beiträgt und dass dieses kooperative *gating*-Effekte zeigt.<sup>[84,86]</sup> Hieraus könnte abgeleitet werden, dass der zu ermittelte Hill-Koeffizient größer eins sein sollte und somit durch die Bindung eines Guanidins beide Poren geblockt werden und daher eine kooperative Hemmung vorliegt. Die Studien zur Inhibition des Kanals durch Guanidin und dessen Derivate von Tombola und Hong geben jedoch einen Koeffizient von etwa eins an. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Hill-Koeffizienten stimmen mit diesem Wert überein. Zudem konnten weder in den SDS-Gelen der Isolation, noch der Dichtegradientenzentrifugation Dimere nachgewiesen werden. Dies ist auf Grund der solubilisierenden Eigenschaften des SDS auch eher unwahrscheinlich. Kooperative Effekte sind daher nicht zu erwarten.

Trotz der oben genannten Einschränkungen konnte auf Basis des OG488-DHPE Fluxtests unter Auswertung der A<sub>60</sub>-Werte eine Dissoziationskonstante und ein Hill-Koeffizient, welche im Einklang mit den Literaturwerten stehen, ermittelt werden. So wurde die Inhibition des H<sub>v</sub>1 durch Guanidin erstmals 2008 durch Tombola *et al.* beschrieben.<sup>[30]</sup> Sie konnten eine nahezu vollständige Inhibition von 92 % bei einer Guanidin Konzentration im millimolaren Bereich zeigen. Hong *et al.* testeten verschiedene Guanidinderivate und konnten nachweisen, dass 2GBI neben 1-(1,3-Benzothiazol-2-yl)guanidin einer der effektivsten Kanalblocker ist.<sup>[66]</sup> Dieser besitzt eine mittlere effektive Konzentration (EC<sub>50</sub>) von 38 μM für den humanen Kanal und ist somit deutlich effektiver als Guanidinium. In weiteren Studien untersuchten Hong *et al.* systematisch die Inhibition des Kanals durch Guanidinderivate. 2GBI diente hierbei als Bezugspunkt. Aus der Anpassung der Daten an das Hill-Modells bestimmt konnte für 2GBI ein K<sub>a</sub> von 34.3 ± 2.5 μM sowie ein Hill-Koeffizient 0.95 ± 0.05 ermittelt werden.<sup>[2]</sup> Diese Werte stimmen mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte, welche aus dem prozentualen Abfall des OG488-DHPE Fluxtests bestimmt wurden überein und bestätigen den Nutzen des Assays zur Untersuchung von

## Diskussion

geeigneten Inhibitoren. Die inhibierende Wirkung von 2GBI ist dabei nicht neu, sie wurde bereits 1976 bei Natriumkanälen beobachtet.<sup>[246]</sup>

Auf Grundlage der  $A_{60}$ -Werte des ACMA basierten Assay konnte ebenfalls ein Hill-Koeffizient nachgewiesen werden, welcher auf eine nicht kooperative Inhibition hindeutet. Jedoch wurde der Wert der Dissoziationskonstante deutlich überbestimmt. Dies könnte auf die erhöhte pH-Sensitivität des ACMA zurückzuführen sein, so dass geringe Änderungen des intravesikulären pH-Wertes auf Grund der Kanal Inhibition nicht detektiert werden können. Zwar reagiert das System offensichtlich auf die Änderung der Geschwindigkeit des Protoneinstroms auf Grund der Inhibition, jedoch wird die Summe der gequenchten ACMA-Moleküle geringer beeinflusst. Dies ist auch eine Folge der membrangängigen Eigenschaften des ACMA. So entsteht durch die Protonierung eines Moleküls im Vesikelinneren eine Triebkraft die den Einstrom eines unprotonierten Moleküls zur Folge hat (vgl. Abschnitt 5.3.2.2).

Die geringe Änderung des Fluoreszenzabfalls der Blindvesikel von maximal 4 % bei 2GBI Zugabe ist vermutlich durch die Insertion des 2GBI in die Membran zu erklären. Hierdurch wird die Membran stabilisiert und der unspezifische Protonenstrom gesenkt. Ein solches Phänomen konnte bereits bei Insertion von Tryptophan-Seitenketten des Gramicidins in Lipidmembranen beobachtet werden.<sup>[247,248]</sup> Dieses besitzt eine dem 2GBI ähnliche aromatische Struktur. Eine reine Verdrängung der Protonen auf Grund der Ladung des 2GBI kann ausgeschlossen werden. So besitzt 2GBI einen  $pK_s$ -Wert von etwa 7 während Guanidin einen  $pK_s$ -Wert von etwa 13.6 besitzt.<sup>[246]</sup> Bei einem vorliegenden pH-Wert von 7 sollte Guanidin daher protoniert vorliegen. Versuche zur Inhibition des Protonenkanals durch Guanidinhydrochlorid von Kristina Kramer in Rahmen ihrer Bachelorarbeit zeigten jedoch, dass keine Änderung beobachtet werden konnte.<sup>[209]</sup> Auf Grund der geringen Größenordnung ist die unspezifische Reduktion des Intensitätsabfalls durch 2GBI zu vernachlässigen.

Die Ergebnisse erlauben zum einen den Schluss, dass sich der rekombinante Protonenkanal in Bezug auf die Inhibition durch 2GBI analog zu den nativen Kanälen verhält. Er besitzt somit gleiche Eigenschaften, wenn auch der vermittelte Protonenstrom geringer ausfällt. Zudem zeigen die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse, dass der OG488-DHPE basierte Protonenfluss-Test eine wertvolle Methode zum *Screening* potenter  $H_{V1}$ -Inhibitoren ist. Dass Guanidinderivate zu diesen zählen konnte bereits durch erste Versuche von Asuaje *et al.* gezeigt werden.<sup>[104]</sup> Sie inhibierten den Protonenkanal in leukämischen Jurkat-T-Zellen durch CIGBI und konnten daraufhin das Absterben der Krebszellen beobachten.



### 5.3.3.2 Inhibition des Kanals durch Zinkionen

Eine Inhibition spannungsgesteuerter Protonenströme des  $H_V1$ -Proteins durch divalente Cadmium- (Cd), Cobalt- (Co) und Zink- (Zn) Ionen wurde bereits im Jahr 1982 während ihrer Entdeckung in Schneckenneuronen durch Thomas und Meech beobachtet.<sup>[31]</sup> Die systematische Untersuchung der Hemmung des Kanals durch divalente Kationen ist seitdem die Regel bei Charakterisierung des Kanals in neu entdeckten Zelltypen.<sup>[33,36,91,25,26]</sup> DeCoursey und Cherny studierten die Inhibition des nativen Kanals in den Alveolarepithelzellen von Ratten detailliert.<sup>[34,42,89]</sup> Sie konnten zeigen, dass  $Zn^{2+}$ -Ionen gegenüber anderen Ionen sehr effektive Blocker sind. Der Effekt der Zinkionen auf den rekombinanten Kanal sollte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden (siehe Abbildung 4-25 A). Die Ergebnisse sollten zu einer präzisen Beschreibung der Proteineigenschaften beitragen. Wie die ACMA-Fluxtest Messungen die im Rahmen der Bachelorarbeit von Kristina Kramer durchgeführt wurden zeigen, kann eine 14 %ige Inhibition des Kanals bei der extravasikuläre Zugabe von  $300 \mu M$   $ZnCl_2$  detektiert werden. Da EDTA in einer Konzentration von  $200 \mu M$  im Puffer vorlag, entspricht dies einer Nettokonzentration an  $Zn^{2+}$ -Ionen von  $100 \mu M$ . Literaturergebnisse zeigen, dass bereits extrazelluläre Konzentrationen von  $100 \mu M$  zu einer nahezu vollständige Unterdrückung der Protonenströme beitragen.<sup>[54,89,249]</sup> Diese konnte hier nicht beobachtet werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass durch den Protonenfluss-Test lediglich Protonenströme detektiert werden welche in die Vesikel erfolgen. Die C- und N-terminalen Domänen der korrespondierenden Kanäle liegen somit extravasikulär vor. Dies bedeutet, dass natürliche intrazelluläre Domänen in dem hier untersuchten Assay extravasikulär vorliegen. Eine extravasikuläre Zugabe der Zinkionen entspricht somit einer intrazellulären Zugabe bei nativen Zellen. Diese wurde durch Cherny *et al.* untersucht und sie konnten zeigen, dass eine deutlich geringere Inhibition des Kanals vorliegt. Sie schlossen daraus, dass neben den von Ramsey und Musset diskutieren extravasikulären Histidinen (His 140 und 193 in  $hH_V1$ ) an den extrazellulär Positionen weitere Zinkbindungsstellen innerhalb des Kanals vorliegen.<sup>[25,54,89]</sup> Dass der durch Kristina Kramer beschriebene inhibierende Effekt der Ionen rein auf einer Verdrängung der Protonen von der Vesikeloberfläche beruht wurde durch analoge Messungen mit  $CaCl_2$  ausgeschlossen. Es konnte kein Unterschied der  $H_V1$  induzierten Protonentranslokation bei Vorliegen von 0 bzw.  $209 \mu M$   $CaCl_2$  beobachtet werden.<sup>[209]</sup>

Von weiteren Untersuchungen der Inhibition des Kanals durch intravesikuläre Zinkionen, in den hier verwendeten  $H_V1$ -Proteoliposomen wurde jedoch abgesehen. Dies war dem, durch die Zinkionen erhöhten, unspezifische Protoneneinstrom in die Blindvesikel geschuldet (siehe Abbildung 4-25). Dieser schloss eine quantitative Analyse der Inhibition aus. Zurückzuführen ist dieser Effekt möglicherweise auf eine erhöhte Undichtigkeit der Membran. So konnte gezeigt werden, dass Calcium und Magnesiumionen mit PS-haltigen Membranen wechselwirken und in diese insertieren.<sup>[250]</sup> Die  $Zn^{2+}$ -Ionen könnten auch mit den

## Diskussion

negativen Lipidkopfguppen interagieren und zu einer Clusterbildung beitragen, welche einen erhöhten Protoneneinstrom begünstigt.

Abschließend kann anhand der Ergebnisse nur ein rein qualitativer, inhibierender Effekt der Zinkionen auf den Kanal verifiziert werden. Dieser bestätigt die nativen Eigenschaften des rekombinanten Protonenkanals. Jedoch ist eine systematische Analyse auf Grund der Inkompatibilität des Protonenfluss-Tests mit den Zinkionen nicht möglich. Dabei wäre dies von Interesse, da eine Aktivierung des Protonenkanals durch Reduktion der Zinkionenkonzentration während des Eintritts der Spermien in den weiblichen Fortpflanzungstrakt diskutiert wird.<sup>[91, 38]</sup> Zu dem zeigen Studien, dass Zinkionen und die daraus folgende Hemmung der H<sub>v</sub>1 Aktivität in Tumorzellen, zu deren Absterben führt.<sup>[251]</sup>

### 5.3.3.3 Aktivierung des Kanals durch Arachidonylethanolamid

Bereits 1993 konnten DeCoursey *et al.* einen Zusammenhang zwischen der Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure (engl. *arachidonic acid*, AA) und der Verdopplung der Protonenströme in humanen Neutrophilen nachweisen.<sup>[45]</sup> Cherny *et al.* beobachteten in humanen eosinophilen Granulozyten ebenfalls eine Steigerung der Aktivität, der für den respiratorischen Burst essenziellen NADPH-Oxidase durch Arachidonsäure. Sie konnten zeigen, dass dies hauptsächlich auf der Steigerung der Protonströme zurückzuführen ist.<sup>[90]</sup> Kawanabe und Okamura konnten später einen direkten, aktivierenden Einfluss der AA auf den heterolog exprimierten, spannungsgesteuerten Protonenkanal in HEK-Zellen verifizieren. Sie detektierten eine Steigerung der Protonenströme um das 5 bis 50-fache in einem Konzentrationsbereich von 20–100  $\mu\text{M}$  AA.<sup>[93]</sup> Zudem beobachteten sie eine Verschiebung der H<sub>v</sub>1 aktivierenden Schwellenspannung hin zu kleineren Potentialen und konnten nachweisen, dass der Einfluss des AA unabhängig davon ist, ob AA intra- oder extrazellulär vorliegt. Sie testeten ebenso Derivate der Säure wie Arachidonylethanolamid (AEA) und konnten zeigen, dass die Doppelbindungen sowie die hydrophilen Gruppen zwingend notwendig für den aktivierenden Effekt sind. Der genaue Mechanismus der Interaktion mit dem Kanal ist jedoch noch nicht beschrieben wurden. Elinder *et al.* analysierten die in der Literatur beschriebenen Einflüsse vielfachungesättigter Fettsäuren auf spannungsgesteuerte Kanäle.<sup>[21]</sup> Aus diesen leiteten sie fünf mögliche Angriffspunkte ab. Einige dieser sind laut Elinder *et al.* in Bereichen der transmembranen Domäne S5 und S6 lokalisiert, welche u. a. in spannungsabhängigen der Kalium-, Natrium-, Calcium- und CatSper-Kanälen vorliegen, jedoch nicht im H<sub>v</sub>1-Kanal. Der vierte von ihnen beschriebene Angriffspunkt liegt er jedoch zwischen der S3 und der S4 Domäne. Hierbei diskutieren sie eine Wechselwirkung der negativ geladenen Phospholipide mit der dreifach positiv geladenen S4 Helix und eine direkte Auswirkung auf den *gating*-Mechanismus.<sup>[21]</sup>

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Rebecca Rixen wurden 2.8  $\mu\text{M}$  AEA den H<sub>v</sub>1-Proteoliposomen extravasikulär zugesetzt. Es konnte hierbei die erwartete Steigerung

der Fluoreszenzlöschung als Folge der aktivierten Protonentranslokation beobachtet werden. Jedoch wurde ebenso ein erhöhter unspezifischer Protonenstrom in die Blindvesikel detektiert (siehe Abbildung 4-25 B). Die Zunahme lag hierbei deutlich über dem Effekt, der für die Proteoliposomen beobachtet werden konnte. Ursächlich könnte eine Auflockerung der Membranstruktur sein. Auf Grund ihres amphiphilen Charakters bilden Fettsäuren ebenso wie Detergensmoleküle Mizellen aus sobald die kritische Mizellenkonzentration überschritten wird. In der Literatur finden sich hierzu verschiedene Hinweise. So wurde von Kapus *et al.* beobachtet, dass Konzentrationen  $> 10 \mu\text{M}$  AA die Zellpatches der *Patch-clamp* Messungen destabilisieren.<sup>[252]</sup> Kawanabe *et al.* hingegen beschrieben eine Destabilisierung oberhalb einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  AA.<sup>[93]</sup> Im vorliegenden Fall reichten jedoch schon deutlich geringere Mengen aus. Ein Grund könnte sein, dass hierbei kleine unilamellare Vesikel statt nativer Zellen verwendet wurden. Diese weisen einen geringen Durchmesser von  $100 \text{ nm}$  und somit eine starke Krümmung auf, welche eine gespannte Oberfläche zur Folge hat. Eine Destabilisierung kann daher zu einem erleichterten Reißen bzw. Platzen der Vesikel führen.

Auf Grund der unspezifischen Effekte des AEA auf die Blindvesikel kann nur unter Vorbehalt eine qualitative Aktivierung des  $H_V1$ -Kanals bestätigt werden. Dabei wäre das schnelle *Screening* der Aktivierung des Protonenkanals durch AEA oder dessen Derivate lohnenswert, vor allem in Bezug auf die pharmakologische Behandlung von Unfruchtbarkeit. Es konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass der in den Flagellen von Spermien lokalisierte Protonenkanal durch AEA effektiver aktiviert werden kann als durch AA.<sup>[91,99]</sup> Eine Aktivierung des Kanals geht mit einer Hyperaktivierung der Spermienbeweglichkeit einher, welche eine Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Befruchtung der weiblichen Eizelle ist.

Anhand der vorgestellten Ergebnisse können Antworten auf die zu Beginn des Abschnitts 5.3.3 gestellten Fragen abgeleitet werden. Die Inhibition des spannungsgesteuerten Protonenkanals  $H_V1$  durch Zink-Ionen ist vielfältig dokumentiert worden, jedoch sind die Kationen nicht mit dem vorgestellten Assay zur Charakterisierung des rekombinanten  $H_V1$ -Proteins kompatibel. Hingegen zeigt der bereits in pharmakologischen Studien vorgestellte Inhibitor 2GBI eine hervorzuhebende Kompatibilität mit diesem Assay. Zudem konnte eine Hemmung verifiziert werden, die der der nativen Kanäle entspricht. 2GBI erfüllt daher die Ansprüche, welche an einen Inhibitor zur weiteren Verwendung bei SEIRA-Studien gestellt werden. Die Aktivierung der Protonenströme des  $H_V1$ -Kanals durch AEA konnte nur unter Einschränkungen bestätigt werden, da unspezifische Wechselwirkungen auftreten. Dabei wäre AEA ein geeigneter Aktivator, da er auch eine physiologische Relevanz besitzt, natürlich vorkommt und keine Vorzugsorientierung des Kanals bedingt. Seine Eignung zum Einsatz bei SEIRA-Studien kann nicht ausgeschlossen werden, da hierbei keine gekrümmten sondern planare Membransysteme vorliegen, welche möglicherweise weniger unspezifische Interaktion zeigen.

### 5.3.4 Temperatur abhängige Steigerung des Protonenflussrate

Neben der Spannungs- und pH-abhängigkeit des Protonenkanals  $H_V1$  wird in der Literatur eine deutliche Temperaturabhängigkeit beschrieben.<sup>[43,52–54]</sup> Die Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die Protonenleitfähigkeit des rekombinanten  $H_V1$ -Proteins soll zu einer Beurteilung der nativen Eigenschaften des Kanals beitragen (siehe Abschnitt 4.2.9). Die Änderung der Protonenleitfähigkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit indirekt aus der Änderung der Konstanten des exponentiellen Intensitätsabfalls abgeleitet. Hierbei wurde der pH-sensitive ACMA-Fluorophor eingesetzt. Aus der temperaturabhängigen Änderung von  $k$  wurde ein  $Q_{10}$ -Wert welcher den Faktor der Änderung des Protonenstroms bei einer Temperaturänderung um 10 K wiedergibt von 1.99 im Bereich von 0–50 °C ermittelt. DeCoursey und Cherny untersuchten detailliert die Einflüsse der Temperatur verschiedene Parameter; zum einen auf die Zeitkonstante des Anstiegs ( $\tau_{An}$ ) und Abfalls ( $\tau_{Ab}$ ) der Protonenströme zum anderen auf die Amplitude der Ströme ( $I_H$ ).<sup>[53]</sup> Je nach untersuchtem Parameter unterschieden sich die Faktoren. Sie bestimmten in humanen Neutrophilen einen  $Q_{10}$ -Wert von 4.46 für  $\tau_{An}$ , einen Wert von 6.82 für  $\tau_{Ab}$  und einen Faktor von 2.33 für  $I_H$ . In Zellpatches von Alveolarepithelzellen lag dieser Wert hingegen bei 3.29.<sup>[53]</sup> Kuno *et al.* fanden zudem heraus, dass sich der  $Q_{10}$ -Faktor in verschiedenen Temperaturbereichen unterscheidet. Sie untersuchten die Mikrogliazellen von Ratten und zeigten, dass der  $Q_{10}$ -Wert zwischen 2.8 bei 5 °C und 2.2 bei 45 °C liegt. Der Kanal liegt in den untersuchten Zelltypen in seiner nativen Form vor.<sup>[52]</sup> Musset *et al.* konnten während ihrer Analyse des inhibierenden Einfluss von Zinkionen auf  $H_V1$  Monomere und Dimer feststellen, dass die Temperaturabhängigkeit des Protonenstroms der Monomere geringer ausfällt. Sie ermittelten einen  $Q_{10}$ -Faktor von etwa 3.3 für das Dimer und 2.2 für das Monomer.<sup>[54]</sup>

Aus dem im Rahmen der hier durchgeführten Messungen ermittelten  $Q_{10}$ -Wert von etwa 2 lassen sich zwei Schlüsse ableiten: Zum einen bestätigt es die Annahme, dass der Kanal in den Proteoliposomen als Monomer vorliegt. Zum anderen konnte für das aus *E. coli* heterolog exprimierte  $H_V1$ -Protein ein für native Kanäle charakteristischer  $Q_{10}$ -Wert bestimmt werden. Ergänzend zu der Inhibition des Kanals durch 2GBI, welche ebenfalls in Analogie zu den nativen Kanälen beobachtet werden konnte, bestätigt dies die erfolgreiche Etablierung eines Protokolls zur rekombinanten Isolation des spannungsgesteuerten Protonenkanals  $H_V1$ . Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass das rekombinante Protein geeignet ist um an diesem die strukturellen spannungsabhängigen Konformationsänderung des  $H_V1$ -Protonenkanal mittels SEIRA-Spektroskopie zu studieren und hieraus Rückschlüsse auf *in vivo* Vorgänge zu ziehen.

## 5.4 Elektrophysiologische Charakterisierung des H<sub>V</sub>1-Kanals

Die Präparation einer trägerfixierten Lipiddoppelschicht (engl. *tethered bilayer lipid membrane*, tBLM) auf nanostrukturierten Goldschichten ermöglicht es, sowohl die resistiven und kapazitiven Eigenschaften der Membran, als auch der enthaltenen Proteine, zu bestimmen. Durch Kombination elektrochemischer Impedanz- und oberflächenverstärkter Infrarotabsorptions-Spektroskopie (engl. *surface-enhanced infrared absorption spectroscopy*, SEIRA-Spektroskopie) an trägerfixierten Lipiddoppelschichten lassen sich u. a. Sekundärstrukturelemente der Proteine studieren.<sup>[154,159,179,180,253,254]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein von Wiebalck *et al.* neu synthetisierter Lipidanker zum Aufbau einer solchen Lipiddoppelschicht verwendet. Dieser besitzt im Gegensatz zum (Cholesterylpolyethylenoxy)thiol (CPEO3) weder eine C-C-Doppelbindung noch eine Carbamatfunktion.<sup>[180]</sup> Letztere weist in SEIRA-Spektren zwei Banden im Bereich von 1700 cm<sup>-1</sup> bis 1500 cm<sup>-1</sup> auf und interferiert daher mit der Absorption von Proteinen in diesem Bereich.<sup>[180]</sup> Eine Analyse von SEIRA-Spektren sollte daher durch Verwendung des Dihydrocholesteryl-2-(2-(2-ethoxy)ethoxy)ethanthiol (WK3SH) vereinfacht werden (siehe Abschnitt 5.5). Zunächst wurde die Ausbildung einer WK3SH/6-Mercaptoethanol selbstorganisierenden Monoschicht (engl. *self-assembled monolayer*) auf einfachen goldbedampften Glassubstraten, sowie die Präparation einer trägerfixierten Lipiddoppelschicht durch das Spreiten von H<sub>V</sub>1-Proteoliposomen mittels Impedanz-Spektroskopie untersucht.

### 5.4.1 Ausbildung der WK3SH/6MH-Monoschicht

Die erfolgreiche Ausbildung der Membran auf der WK3SH/6-Mercaptohexanol-Monoschicht (20:80 (*n/n*) in Lösung) wurde durch die Bestimmung der spezifischen Kapazität verifiziert. Anhand des Phasenwinkels, welcher einen Wert von nahezu 90 ° erreichte, konnte ein kapazitives frequenzabhängiges Verhalten im Bereich von 4·10<sup>3</sup> bis 10<sup>-1</sup> Hz bestätigt werden (vgl. Abbildung 4-33). Zudem wurde eine mittlere spezifische Kapazität von 1.49 ± 0.61 μF·cm<sup>-2</sup> durch die Anpassung des *R(RC)(RCPE)*-Ersatzschalbildes an die Daten des Bode-Diagramms bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus dem zugehörigen Cole-Cole-Plot eine spezifische Kapazität von 1.42 ± 0.38 μF·cm<sup>-2</sup> ermittelt (vgl. Tabelle 4-3). Die ähnlichen Beträge der Kapazitäten deuten auf eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hin.

Eva Schmitt analysierte ebenfalls das Impedanzverhalten von goldbedampften Glassubstraten und konnte zeigen, dass diese nach 1 h Inkubation mit einer 0.1 mM *n*-propanolischen CPEO3-Lösung eine spezifische Kapazität von 1.5 ± 0.3 μF·cm<sup>-2</sup> (N = 7) aufweisen.<sup>[154]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Inkubation des Substrates mit einer reinen isopropanolischen WK3SH-Lösung eine spezifische Kapazität anhand der zugehörigen Cole-Cole-Auftragungen von 1.59 ± 0.35 μF·cm<sup>-2</sup> (N = 7) bestimmt werden.

## Diskussion

Diese liegt im Bereich des von Schmitt bestimmten Betrages. Dass sowohl bei der Verwendung einer 20 mol%igen wie auch einer reinen 1 mM-Lösung ähnliche Werte ermittelt werden, kann damit erklärt werden, dass eine Sättigung der Oberflächenbelegung der Impedanzsubstrate mit WK3SH bereits ab einem molaren Anteil von 20 % in einer 1 mM isopropanolischen Lösung erreicht wird. Kuhlmann *et al.* wiesen dies bereits für das WK3SH ähnliche CPEO3 nach.<sup>[255]</sup> Anhand von IR-Spektren und Kontaktwinkelmessungen konnten sie zeigen, dass eine Sättigung der Oberfläche goldbedampfter Glassubstrate bereits bei einem molaren Anteil von 15–20 mol% CPEO3 in einer 1 mM propanolischen Lösung erzielt wird. Unter der Voraussetzung, dass eine [111] Goldoberfläche und eine  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  hexagonal Packung der CPEO3 Moleküle vorliegt, wurde eine maximale Oberflächenbelegung von 60 % von Kuhlmann *et al.* diskutiert. Die Zwischenräume werden in diesem Fall durch 6MH-Moleküle besetzt. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit Studien von Jeuken *et al.*<sup>[256]</sup> Sie zeigten anhand der Bestimmung der Kapazitäten mittels Impedanz-Spektroskopie, dass eine Sättigung der Oberfläche eines goldbedampften Silizium Wafers ab einem molaren Anteil von 20 % CPEO3 in einer CPEO3/6MH-Lösung erreicht wird.<sup>[256]</sup>

Analog zu den goldbedampften Glassubstraten wurde auf den SEIRA-Substraten (vgl. Abbildung 3-30), welche im Vergleich zu den einfachen Impedanzsubstraten (vgl. Abbildung 4-32) eine raue Oberfläche besitzen, ebenfalls eine Monoschicht ausgebildet. Diese wurde aus einer Lösung der Zusammensetzung WK3SH/6MH (70:30 (*n/n*)) gebildet und besaß laut Cole-Cole-Plot eine Kapazität von  $1.4 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  (vgl. Abbildung 4-37). Beide Systeme besitzen somit eine ähnliche Kapazität, trotz der unterschiedlichen Zusammensetzungen. Das für die SEIRA-Messungen verwendete Substrat besitzt im Vergleich zu den Glassubstraten eine nanostrukturierte Oberflächenstruktur, welche die Eigenschaften der SAM Bildung beeinflusst. Wiebalck *et al.* zeigten, dass eine Sättigung der SEIRA-Substratoberfläche mit WK3SH, welche durch Bestimmung der spezifischen Kapazität analysiert wurde, erst bei einem WK3SH-Anteil von etwa 90 mol% in Lösung beobachtet werden kann.<sup>[180]</sup> Analog hierzu wurde für eine SAM auf einem SEIRA-Substrat, welcher aus einer Lösung von CPEO3/6MH (80:20 (*n/n*)) in Isopropanol gebildet wurde, eine Kapazität von  $1.4 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  bestimmt.<sup>[159]</sup> Dies bestätigt zudem die vergleichbaren elektrochemischen Eigenschaften von CPEO3 und WK3SH.

Der Widerstand  $R_{\text{Mem}}(\text{SAM})$  der selbstorganisierenden Monoschicht lag im Mittel bei  $47 \pm 35 \text{ M}\Omega$  und damit in einem Bereich den ebenfalls Jeuken *et al.* bei der Untersuchung einer CPEO3/6-MH-Monoschicht (80:20 (*n/n*)) beobachten konnten.<sup>[253]</sup> Eva Schmitt konnte den Widerstand  $R_{\text{Mem}}$  der CPEO3-SAM, welcher auf einer Goldoberfläche präpariert wurde, nicht auflösen. Ein direkter Vergleich entfällt daher. Das in ihrer Dissertation dargestellte Spektrum des Betrages der Impedanz weist jedoch eine hohe Übereinstimmung mit den hier gezeigten Spektren auf.<sup>[154]</sup> Zusammenfassend kann die erfolgreiche Präparation einer WK3SH/6MH-Monoschicht bestätigt werden.

### 5.4.2 Präparation einer H<sub>v</sub>1-Lipiddoppeschicht durch Vesikelspreiten

Durch das Spreiten der Blindvesikel (POPC/POPG/Chol 55:25:20) bzw. der Proteoliposomen wurden die spezifischen Kapazitäten des Systems, den Erwartungen entsprechend, um etwa die Hälfte reduziert (vgl. Tabelle 4-3). Anhand der Anpassung eines nicht-linearen Fits (engl. *non-linear-least-square-fit*) auf Basis des Levenberg-Marquardt-Algorithmus an die Daten der Bode-Auftragungen wurde hierbei eine spezifische Kapazität von  $1.0 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  sowohl für die proteinfreie, als auch H<sub>v</sub>1-haltige Membran bestimmt.<sup>[161]</sup> Der ermittelte Betrag der Kapazität liegt dabei deutlich über den Werten, welche aus den Cole-Cole-Auftragungen ausgelesen wurden. Dieses deutet auf eine ungenaue Anpassung der Daten hin. Ursächlich hierfür könnte sein, dass die Cole-Cole-Spektren der Impedanzmessungen an den goldbedampften Glassubstraten im Vergleich zu denen der nanostrukturierten SEIRA-Substrate eine geringere Auflösung aufweisen (vgl. Abbildung 4-33 und Abbildung 4-37). Dieser Umstand hat zur Folge, dass das Modell das System nicht ideal beschreibt, da das verwendete Ersatzschaltbild einen idealen und einen nicht-idealen Kondensator berücksichtigt (siehe Abbildung 4-32). Jeder Kondensator sollte im Cole-Cole-Plot durch einen Halbkreis repräsentiert werden. Dies ist jedoch im Fall der Spektren der Messungen an goldbedampften Glassubstraten nicht zu beobachten. Ein Grund der ungenügenden Auflösung eines zweiten Halbkreises resultiert vermutlich aus der geringen Leitfähigkeit bzw. Ionenstärke des Elektrolyten, welcher bei den Impedanzmessungen verwendet wurde.

Dennoch kann aus der deutlichen Reduktion der Kapazitäten  $C_{\text{BLM}}$  und  $C_{\text{spez}}$  als Folge der Inkubation der SAM mit einer Vesikelpopulation von einer erfolgreichen Ausbildung der Lipiddoppelschicht ausgegangen werden. Vergleichbare Änderungen, d. h. in etwa eine Halbierung der Kapazitäten nach dem Spreitprozess, konnten durch Wiebalck *et al.*, Kozuch *et al.* als auch Schmitt beobachtet werden.<sup>[180,179,154]</sup> Von Schmitt und Jeucken *et al.* wurde als Folge der Spreitens eine parallele Verschiebung des Betrages der Impedanz ( $|Z|$ ) zu höheren Werten anhand des Bode-Diagramms beschrieben.<sup>[154,253]</sup> Ein analoges Verhalten konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenso beobachtet werden (vgl. Abbildung 4-33). Als Konsequenz der Verschiebung wurde ein erhöhter Widerstand im Bereich von etwa  $80 \text{ M}\Omega$  ermittelt. Ein Widerstand dieser Größenordnung ist charakteristisch für eine isolierende Lipiddoppelschicht.<sup>[182,253,256]</sup> Abschließend kann die erfolgreiche Präparation der lipidgestützten Lipiddoppelschicht durch das Spreiten der Blindvesikel als auch der Proteoliposomen auf einer Lipidankermonoschicht bestätigt werden. Die Unterschiede in der aus dem Cole-Cole-Diagramm ermittelten Kapazitäten zwischen proteinfreier und H<sub>v</sub>1-haltiger Membran könnten auf eine erhöhte Durchlässigkeit auf Grund der Kanal Aktivität hindeuten. Ähnliche Unterschiede im Bereich von  $0.1 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  wurden bei der Ausbildung Gramacidin A-haltiger Membranen beobachtet.<sup>[179]</sup> Eine Analyse der spannungsabhängigen Impedanzeigenschaften der Membranen, mit und ohne H<sub>v</sub>1-Protein, soll zu der Klärung dieser These beitragen.

## Diskussion

### 5.4.3 Charakterisierung des spannungsabhängigen Impedanzverhaltens H<sub>V</sub>1-tBLM

Durch das Anlegen einer negativen Spannung von bis zu  $-150$  mV konnte eine Steigerung der Kapazität der H<sub>V</sub>1-haltigen Membranen um den Faktor zwei induziert werden (vgl. Abbildung 4-34 B). Eine Änderung der Kapazität in diese Richtung wäre u. a. zu erwarten, wenn durch die Öffnung des Kanals „Lücken“ in der Membran erzeugt würden, durch die Protonen fließen könnten. Jeuken *et al.* beschrieben einen solchen Einfluss auf die kapazitiven Eigenschaften einer lipidgestützten Lipiddoppelschicht durch die Gramacidin vermittelte Natriumtranslokation. Sie beobachteten damit einhergehend die Steigerung der Kapazität, sowie die Reduktion des Membranwiderstandes.<sup>[253]</sup> Kozuch *et al.* konnten im Zuge von SEIRA-Studien des spannungsgesteuerten Anionenkanals (engl. *voltage-dependent anion channel*, VDAC) ein analoges Verhalten beobachten. Die VDAC-tBLM wies im Vergleich zu einer einfachen tBLM eine erhöhte Kapazität sowie einen 20-fach niedrigeren Widerstand auf.<sup>[159]</sup> Zu berücksichtigen ist jedoch, dass im Rahmen dieser Arbeit, bereits die Monoschicht eine deutliche Änderung der spezifischen Kapazitäten in Abhängigkeit des Spannungspotentials aufwies (vgl. Abbildung 4-34 A). Dies führte in der weiteren Konsequenz dazu, dass die einfache tBLM ebenfalls eine Steigerung der Kapazität in Abhängigkeit des Membranpotentials zeigte. Diese lag in einer ähnlichen Größenordnung wie bei der H<sub>V</sub>1-tBLM. Die Änderung der spezifischen Kapazität der Membran erlaubte daher keine definitive Aussage über die spannungsabhängige Öffnung des Kanals. Eine Differenzierung zwischen den resistiven Eigenschaften der tBLM und H<sub>V</sub>1-tBLM war auf Grund der nicht idealen Beschreibung des Systems durch das Modell nicht möglich. Daher wurde eine Normierung der Daten nach dem Modell von Giaever *et al.* vorgenommen.<sup>[162]</sup> Dies berücksichtigt den Beitrag der SAM und erlaubt eine Auftrennung von kapazitiven und resistiven Eigenschaften (vgl. Abbildung 4-35). Auch anhand dieser ergänzenden Auswertung konnte weder ein Unterschied in der potentialabhängigen Änderung der Kapazitäten noch der Widerstände zwischen der tBLM und der H<sub>V</sub>1-tBLM ermittelt werden. Ursächlich hierfür könnte die bereits diskutierte geringe Protonentranslokation durch den rekombinanten H<sub>V</sub>1-Protonenkanal sein (siehe Abschnitt 5.3.2.3). Diese ist unter den Bedingungen der Messungen unter Umständen so gering, dass kleinere Membrandefekte innerhalb der tBLM ein ähnliches Verhalten hervorrufen. Dies wird durch den niedrigen pH-Wert von 4 begünstigt, da mit zunehmend saurem pH-Wert die Stabilität der Membran sinkt.

Da im Vorfeld der Impedanzmessungen die Aktivität des Proteins in den Proteoliposomen anhand des fluoreszenzgestützten Protonenfluss-Tests bestätigt wurde, kann von einer Spannungsabhängigkeit des rekombinanten Kanals ausgegangen werden. Des Weiteren wurde auf Basis der nachfolgenden SEIRA-Studien die Insertion H<sub>V</sub>1-Proteins in die Membran bestätigt (siehe Abschnitt 5.5).



## 5.5 Spannungsabhängige Charakterisierung des H<sub>V</sub>1-Kanals mittels SEIRA-Spektroskopie

Bis heute existiert lediglich die 3D-Kristallstruktur eines chimären H<sub>V</sub>1-Kanals im geschlossenen Zustand.<sup>[88]</sup> Die Strukturänderung des Kanals während des *gating*-Prozesses konnte daher auf molekularer Ebene noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Einen detaillierteren Einblick in die strukturellen Konformationsänderungen des H<sub>V</sub>1-Kanals während der Öffnung und des Schließens ermöglicht die oberflächenverstärkte Infrarotabsorptions-Spektroskopie. Sie erlaubt, auf Grund des Messaufbaus, die Anlegung eines elektrischen Potentials an die Membran und somit die Steuerung des Kanals. Die Anwendung dieser spektroelektrochemischen Methode zur Untersuchung des Protonenkanals wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit Dr. Jacek Kozuch und Enrico Forbrig des Arbeitskreises von Prof. Dr. Peter Hildebrandt der Technischen Universität Berlin etabliert. Die Basis der spannungsabhängigen Charakterisierung des H<sub>V</sub>1-Kanals mittels SEIRA-Spektroskopie bildeten, in Analogie zu den impedanzspektroskopischen Untersuchungen, trägerfixierte Lipiddoppelschichten. Diese wurden ebenso durch das Spreiten von Proteoliposomen auf einer WK3SH/6MH-Monoschicht präpariert. Die erfolgreiche Ausbildung der tBLM konnte, wie zuvor diskutiert, aus der Reduktion der spezifischen Kapazität von 1.4  $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  (SAM) auf 0.8  $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  (tBLM) bestätigt werden (siehe Abschnitt 5.4.2). Die Kapazitäten wurden hierbei aus der Cole-Cole Auftragung des Impedanzspektrums der SAMs und der tBLM bestimmt (vgl. Abbildung 4-37). Die Ergebnisse stimmen mit der vorangegangenen Studie von Wiebalck *et al.* überein.<sup>[180]</sup> Hierbei wurde eine Monoschicht aus WK3SH/6MH (75:25 (*n/n*)) eingesetzt und hierfür spezifische Kapazitäten von 1.5  $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  für die Monoschicht bzw. 0.75  $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$  für die Lipiddoppelschicht ermittelt.

Die Ausbildung einer Lipidmembran wurde zudem anhand der Schwingungsmoden der SEIRA-Differenzspektren bestätigt. Diese wiesen im Bereich von 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  drei charakteristische IR-Signale (2958  $\text{cm}^{-1}$ , 2927  $\text{cm}^{-1}$ , 2855  $\text{cm}^{-1}$ ) auf, welche den C-H-Streckschwingungen der Lipide zugeordnet werden können. Zusätzlich konnte eine Bande bei 1737  $\text{cm}^{-1}$  beobachtet werden. Diese wurde auf die C=O-Streckschwingung der Membranlipide zurückgeführt. Wiebalck *et al.* beobachteten bei der Analyse des Referenzspektrums des neu synthetisierten WK3SH-Abstandhalters und einer darauf präparierten POPC-Membran ebenfalls vier Banden in einem ähnlichen Bereich. Diese lagen bei 2956  $\text{cm}^{-1}$ , 2926  $\text{cm}^{-1}$ , 2854  $\text{cm}^{-1}$  und 1735  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>[180]</sup> Eine Erhöhung der Bandenintensität nach dem Spülen wurde als Indiz für ein zusätzliches Spreiten der Vesikel gesehen. Kozuch *et al.* konnten ein analoges Verhalten bei der Analyse des Spreitvorganges von POPC-Vesikeln auf einer CPEO3/6MH-Monoschicht detektieren.<sup>[179]</sup> Hierbei wurde ein SEIRA-Spektrum der tBLM 3 min und 3 h nach der Inkubation der SAM mit den Vesikeln aufgenommen. Im direkten Vergleich konnte eine Erhöhung der Bandenintensitäten bei

## Diskussion

2926  $\text{cm}^{-1}$ , 2854  $\text{cm}^{-1}$  und 1733  $\text{cm}^{-1}$  nach längerer Inkubation detektiert werden. Dies wurde auf die Ausbildung der Lipiddoppelschicht zurückgeführt. Die Membranbildung ging mit einer Verdrängung von Wasser an der Substratoberfläche einher, welche anhand einer negativen Bande bei 1645  $\text{cm}^{-1}$  deutlich wurde.<sup>[179]</sup> Eine negative Bande der Biegeschwingung des Wassers konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht in dieser Deutlichkeit beobachtet werden, da sie mit der Amid-I- und Amid-II-Bande des Proteins überlagert. Jedoch wurde eine negative Bande bei etwa 3500  $\text{cm}^{-1}$  detektiert, welche der O-H-Streckschwingung des Wassers zuzuordnen ist.

Des Weiteren wurden in dem SEIRA-Differenzspektrum der  $\text{H}_V1$ -tBLM zwei positive Banden bei 1657  $\text{cm}^{-1}$  und 1552  $\text{cm}^{-1}$  identifiziert. (vgl. Abbildung 4-38). Diese liegen in einem Bereich, der für die Amid-I- und Amid-II-Bande von Peptiden charakteristisch ist.<sup>[185,257]</sup> Dong *et al.* untersuchten die Sekundärstrukturen in Wasser gelöster Proteine mittels Fourier-Transform-IR-Spektroskopie und ermittelten, dass die Amid-I-Bande eines  $\alpha$ -helikalen Proteins bei  $1656 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$  liegt.<sup>[258]</sup> Diese setzt sich größtenteils aus einem Beitrag der C=O-Streckschwingung der Peptidbindung und einem kleineren Beitrag der N-H-Biegeschwingung zusammen.<sup>[164]</sup> Marsh *et al.* konnten zeigen, dass sich aus der Position der Amid-I-Bande auf deren Orientierung zur Oberfläche schließen lässt. Verläuft das Übergangsdipolmoment der Amid-I-Bande entlang der Helixachse in einem  $90^\circ$  Winkel zur Substratoberfläche, so wurde die Bande bei 1657  $\text{cm}^{-1}$  detektiert.<sup>[207]</sup> Eine parallel zur Oberfläche verlaufende Achse resultiert in einer Bandenverschiebung hin zu 1651.8  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>[207]</sup> Die Präsenz eines  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturelements in der  $\text{H}_V1$ -tBLM bestätigt zum einen die erfolgreiche Membraninsertion des Proteins und somit dessen Rekonstitution in die Vesikel. Zum anderen ist dies ein Nachweis der korrekten Faltung des  $\text{H}_V1$ -Proteins, der die Ergebnisse der CD-Spektroskopie ergänzt (vgl. den Abschnitt Identifikation des  $\text{H}_V1$ -Proteins Kapitel 5.1.3).

Die erfolgreiche Etablierung der Präparation einer  $\text{H}_V1$ -tBLM bildete die Grundlage für die Untersuchung der potentialabhängigen Konformationsänderungen des Proteins mittels SEIRA-Spektroskopie. Durch gezielte Mutationen könnten anschließend neue Erkenntnisse über den Einfluss einzelner Aminosäuren auf den Mechanismus der Spannungsdetektion und der Kanalöffnung gewonnen werden. Diese könnten langfristig zu einer Klärung der spannungsabhängigen Konformationsänderung des  $\text{H}_V1$ -Kanals während des Übergangs vom geschlossenen in den offenen Zustand beitragen.<sup>[82,259,260]</sup>

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *in vitro*-Modellsystem verwendet, um einzelne biophysikalische Eigenschaften des spannungsgesteuerten Protonenkanals H<sub>v</sub>1 zu charakterisieren. Auf Basis der Rekonstitution des rekombinanten Proteins in kleine unilamellare Vesikel wurde die Aktivität des Kanals untersucht und die Grundlage für elektrospektroskopische Studien gelegt.

In einem ersten Schritt wurde durch die Umklonierung der DNA-Sequenz des humanen H<sub>v</sub>1-Kanals ein Fusionsprotein mit N-terminalem, Hexahistidin-Tag erzeugt. Anschließend konnte erfolgreich ein Protokoll der heterologen Expression in *Escherichia coli* sowie der SDS-basierten Isolation des Proteins aus *Inclusion Bodies* vorgestellt werden. Die erfolgreiche Aufreinigung des Proteins mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie wurde anhand von Polyacrylamid-Elektrophorese bestätigt. Durch Zirkulardichroismus-Spektroskopie konnte zudem die korrekte Rückfaltung des Proteins verifiziert werden. Abschließend erfolgte die eindeutige Identifikation des Proteins als H<sub>v</sub>1-Protonenkanal sowohl durch Massenspektrometrie als auch Western-Blotting.

In einem zweiten Schritt wurde mit Hilfe eines Protoneneinstrom-Tests auf Basis des pH-sensitiven Farbstoffs 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin (ACMA) die Rekonstitutionseffizienz des H<sub>v</sub>1-Fusionsproteins untersucht. Anhand des durch den Assay bestimmten Anteils aktiver Proteoliposomen und der Fluoreszenz-Halbwertszeit konnte gezeigt werden, dass die Verwendung Cholesterin-haltiger Lipidmembranen die Insertion des Proteins begünstigt. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass negativ geladene Phospholipide die Protonentranslokationsrate des Kanals steigern. Dies wurde auf die Akkumulation der Protonen an der Vesikeloberfläche zurückgeführt. Durch die Optimierung der Rekonstitutionsbedingungen konnte ein Anteil aktiver Proteoliposomen von  $76 \pm 7\%$  erreicht werden, welcher der Literatur entspricht. Anschließend konnte anhand der Quantifizierung der Temperaturabhängigkeit des Protoneneinstroms ( $Q_{10} = 1.99$ ) sowie der Inhibition durch 2-Guanidinbenzimidazol (2GBI,  $K_D = 88 \pm 64 \mu\text{M}$ ) nachgewiesen werden, dass der rekombinante H<sub>v</sub>1-Protonenkanal biophysikalische Eigenschaften besitzt, die auch native Protonenkanäle charakterisieren. Dies unterstreicht den Erfolg der heterologen Expression des H<sub>v</sub>1-Fusionsproteins.

Die Protonentranslokationsrate des H<sub>v</sub>1-Kanals wurde basierend auf einem modifizierten Protoneneinstrom-Assay quantifiziert. Hierbei wurde der lipidgekoppelte Fluorophor Oregon Green 488 (OG488) statt ACMA verwendet. Innerhalb des Membransystems (POPC/POPS/Chol/OG488-DHPE; 54:25:20:1) konnte für OG488-DHPE erfolgreich pK<sub>s</sub>-Wert von 6.94 bestimmt und hieraus eine Korrelation der Fluoreszenzintensität mit dem

## Zusammenfassung

intravesikulärem pH-Wert ( $pH_i$ ) abgeleitet werden. Die  $H_V1$  vermittelte Protonentranslokation resultierte in einer mittleren Verschiebung des  $pH_i$ -Wertes um 0.11 Einheiten, dies entspricht einem Leitwert von 6.0 aS. Die Größenordnung dieser Ergebnisse steht, unter Berücksichtigung der Fehler, mit der indirekter *in vitro* Bestimmungen des Leitwertes durch Lee *et al.* in Einklang. Des Weiteren wurden die Größenordnung der in der Literatur beschriebenen 2GBI-Inhibition ( $K_D = 47 \pm 19 \mu M$ ) sowie der korrespondierende Hill-Koeffizient ( $n = 0.99 \pm 0.23$ ) bestätigt. Hieraus kann geschlossen werden, dass der OG488 basierte Protonenfluss-Tests ein geeignetes Instrument zum *Screening* von  $H_V1$ -Inhibitoren bzw.  $H_V1$  regulierender Medikamente ist.

In einem dritten Schritt wurde zunächst die Präparation einer trägerfixierten Lipiddoppelschicht (engl. *tethered bilayer lipid membrane*, tBLM) durch das Spreiten von  $H_V1$ -Proteoliposomen auf einer Dihydrocholesteryl-2-(2-(2-ethoxy)ethoxy)ethanthiol (WK3SH)/6-Mercaptohexanol-Monoschicht etabliert. Die erfolgreiche Membranausbildung konnte sowohl durch Impedanz- als auch durch oberflächenverstärkte Infrarotabsorptions-Spektroskopie (SEIRA-Spektroskopie) nachgewiesen werden. Während eine potentialabhängige Charakterisierung des  $H_V1$ -Proteins mittels Impedanz-Spektroskopie auf Grund einer fehlenden Unterscheidbarkeit der Ergebnisse im Vergleich zu den Blindvesikeln ausblieb, konnte die  $\alpha$ -helikale Struktur des Proteins in die tBLM mittels SEIRA-Spektroskopie bestätigt werden. Dies bildet die Grundlage für die weitere Charakterisierung der potentialabhängigen Konformationsänderung des  $H_V1$ -Kanals und erlaubt es aus der Bewegung der Helices während des *gatings* und der daraus resultierenden Änderung der Amid-I-Bande Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden Mechanismus zu ziehen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Lee, S.-Y., Letts, J. A. & MacKinnon, R., *Functional reconstitution of purified human H<sub>v</sub>1 H<sup>+</sup> channels*, *Journal of molecular biology* **2009**, 387, 1055–1060.
2. Hong, L., Kim, I. H. & Tombola, F., *Molecular determinants of H<sub>v</sub>1 proton channel inhibition by guanidine derivatives*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, 111, 9971–9976.
3. Krogh, A., Larsson, B., Heijne, G. von & Sonnhammer, E. L., *Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes*, *Journal of molecular biology* **2001**, 305, 567–580.
4. Overington, J. P., Al-Lazikani, B. & Hopkins, A. L., *How many drug targets are there?*, *Nature reviews. Drug discovery* **2006**, 5, 993–996.
5. Carpenter, E. P., Beis, K., Cameron, A. D. & Iwata, S., *Overcoming the challenges of membrane protein crystallography*, *Current opinion in structural biology* **2008**, 18, 581–586.
6. Nelson, D. L., Cox, M. M. & Lehninger, A. L., *Lehninger Biochemie, Mit 131 Tabellen*, 4th ed. Springer, Berlin, Heidelberg, **2009**.
7. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F., *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*, *The Journal of Physiology* **1952**, 117, 500–544.
8. Neher, E. & Sakmann, B., *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*, *Nature* **1976**, 260, 799–802.
9. MacKinnon, R., *Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel*, *Nature* **1991**, 350, 232–235.
10. Doyle, D. A., *The Structure of the Potassium Channel, Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity*, *Science (New York, N.Y.)* **1998**, 280, 69–77.
11. Vandenberg, J. I. *et al.*, *hERG K<sup>+</sup> Channels, Structure, Function, and Clinical Significance*, *Physiological reviews* **2012**, 92, 1393–1478.
12. Qi, H. *et al.*, *All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, 104, 1219–1223.

## Literaturverzeichnis

13. Sampson, M. J., Lovell, R. S., Davison, D. B. & Craigen, W. J., *A novel mouse mitochondrial voltage-dependent anion channel gene localizes to chromosome 8*, *Genomics* **1996**, 36, 192–196.
14. Zeth, K., *Structure and evolution of mitochondrial outer membrane proteins of beta-barrel topology*, *Biochimica et biophysica acta* **2010**, 1797, 1292–1299.
15. Lishko, P. V. & Kirichok, Y., *The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation*, *The Journal of Physiology* **2010**, 588, 4667–4672.
16. Decoursey, T. E., *Voltage-gated proton channels find their dream job managing the respiratory burst in phagocytes*, *Physiology (Bethesda, Md.)* **2010**, 25, 27–40.
17. Fischer, H., *Function of Proton Channels in Lung Epithelia*, *Wiley interdisciplinary reviews. Membrane transport and signaling* **2012**, 1, 247–258.
18. Demaurex, N., *Functions of proton channels in phagocytes*, *WIREs Membr Transp Signal* **2012**, 1, 3–15.
19. Moreau, A., Gosselin-Badaroudine, P. & Chahine, M., *Molecular biology and biophysical properties of ion channel gating pores*, *Quarterly reviews of biophysics* **2014**, 47, 364–388.
20. Bezanilla, F., *Voltage-Gated Ion Channels*, *IEEE Trans.on Nanobioscience* **2005**, 4, 34–48.
21. Elinder, F. & Liin, S. I., *Actions and Mechanisms of Polyunsaturated Fatty Acids on Voltage-Gated Ion Channels*, *Frontiers in physiology* **2017**, 8, 43.
22. Catterall, W. A., *Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology*, *Neuron* **2010**, 67, 915–928.
23. Jiang, Y. *et al.*, *X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel*, *Nature* **2003**, 423, 33–41.
24. Zhang, X. *et al.*, *Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel*, *Nature* **2012**, 486, 130–134.
25. Ramsey, I. S., Moran, M. M., Chong, J. A. & Clapham, D. E., *A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain*, *Nature* **2006**, 440, 1213–1216.
26. Sasaki, M., Takagi, M. & Okamura, Y., *A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel*, *Science (New York, N.Y.)* **2006**, 312, 589–592.
27. Li, Q., Jogini, V., Wanderling, S., Cortes, D. M. & Perozo, E., *Expression, purification, and reconstitution of the voltage-sensing domain from Ci-VSP*, *Biochemistry* **2012**, 51, 8132–8142.

28. Lee, S.-Y., Letts, J. A. & MacKinnon, R., *Dimeric subunit stoichiometry of the human voltage-dependent proton channel H<sub>v</sub>1*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, 105, 7692–7695.
29. Petheo, G. L. *et al.*, *Molecular and functional characterization of H<sub>v</sub>1 proton channel in human granulocytes*, *PloS one* **2010**, 5, e14081.
30. Tombola, F., Ulbrich, M. H. & Isacoff, E. Y., *The voltage-gated proton channel H<sub>v</sub>1 has two pores, each controlled by one voltage sensor*, *Neuron* **2008**, 58, 546–556.
31. Thomas, R. C. & Meech, R. W., *Hydrogen ion currents and intracellular pH in depolarized voltage-clamped snail neurones*, *Nature* **1982**, 299, 826–828.
32. Smith, S. M. E. *et al.*, *Voltage-gated proton channel in a dinoflagellate*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, 108, 18162–18167.
33. Chaves, G. *et al.*, *Identification of an HV 1 voltage-gated proton channel in insects*, *The FEBS journal* **2016**, 283, 1453–1464.
34. DeCoursey, T. E., *Hydrogen ion currents in rat alveolar epithelial cells*, *Biophysical Journal* **1991**, 60, 1243–1253.
35. Fogel, M. & Hastings, J. W., *Bioluminescence: mechanism and mode of control of scintillon activity*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1972**, 69, 690–693.
36. Rodriguez, J. D. *et al.*, *Identification of a vacuolar proton channel that triggers the bioluminescent flash in dinoflagellates*, *PloS one* **2017**, 12, e0171594.
37. Seredenina, T., Demaurex, N. & Krause, K.-H., *Voltage-Gated Proton Channels as Novel Drug Targets: From NADPH Oxidase Regulation to Sperm Biology*, *Antioxidants & redox signaling* **2015**, 23, 490–513.
38. Kirichok, Y. & Lishko, P. V., *Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique*, *Molecular human reproduction* **2011**, 17, 478–499.
39. Decoursey, T. E. & Cherny, V. V., *Deuterium Isotope Effects on Permeation and Gating of Proton Channels in Rat Alveolar Epithelium*, *The Journal of general physiology* **1997**, 109, 415–434.
40. Kawai, T. *et al.*, *Unconventional role of voltage-gated proton channels (VSOP/H<sub>v</sub>1) in regulation of microglial ROS production*, *Journal of neurochemistry* **2017**.
41. Capasso, M., *Proton channels in non-phagocytic cells of the immune system*, *Wiley interdisciplinary reviews. Membrane transport and signaling* **2013**, 2, 65–73.

## Literaturverzeichnis

42. Cherny, V. V., Markin, V. S. & DeCoursey, T. E., *The voltage-activated hydrogen ion conductance in rat alveolar epithelial cells is determined by the pH gradient*, *The Journal of general physiology* **1995**, 105, 861–896.
43. Musset, B. & DeCoursey, T., *Biophysical properties of the voltage-gated proton channel H V 1*, *WIREs Membr Transp Signal* **2012**, 1, 605–620.
44. Decoursey, T. E., *Voltage-gated proton channels: molecular biology, physiology, and pathophysiology of the H(V) family*, *Physiological reviews* **2013**, 93, 599–652.
45. DeCoursey, T. E. & Cherny, V. V., *Potential, pH, and arachidonate gate hydrogen ion currents in human neutrophils*, *Biophysical Journal* **1993**, 65, 1590–1598.
46. Cherny, V. V., Murphy, R., Sokolov, V., Levis, R. A. & Decoursey, T. E., *Properties of single voltage-gated proton channels in human eosinophils estimated by noise analysis and by direct measurement*, *The Journal of general physiology* **2003**, 121, 615–628.
47. Starace, D. M. & Bezanilla, F., *A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field*, *Nature* **2004**, 427, 548–553.
48. Conti, F., Hille, B., Neumcke, B., Nonner, W. & Stämpfli, R., *Measurement of the conductance of the sodium channel from current fluctuations at the node of Ranvier*, *The Journal of Physiology* **1976**, 262, 699–727.
49. Duff, K. C. & Ashley, R. H., *The transmembrane domain of influenza A M2 protein forms amantadine-sensitive proton channels in planar lipid bilayers*, *Virology* **1992**, 190, 485–489.
50. Musset, B. et al., *Detailed comparison of expressed and native voltage-gated proton channel currents*, *The Journal of Physiology* **2008**, 586, 2477–2486.
51. DeCoursey, T. E. & Cherny, V. V., *Voltage-activated proton currents in membrane patches of rat alveolar epithelial cells*, *The Journal of Physiology* **1995**, 489, 299–307.
52. Kuno, M. et al., *Temperature dependence of proton permeation through a voltage-gated proton channel*, *The Journal of general physiology* **2009**, 134, 191–205.
53. Decoursey, T. E. & Cherny, V. V., *Temperature Dependence of Voltage-gated H<sup>+</sup> Currents in Human Neutrophils, Rat Alveolar Epithelial Cells, and Mammalian Phagocytes*, *The Journal of general physiology* **1998**, 112, 503–522.
54. Musset, B. et al., *Zinc inhibition of monomeric and dimeric proton channels suggests cooperative gating*, *The Journal of Physiology* **2010**, 588, 1435–1449.



55. Decoursey, T. E., Morgan, D., Musset, B. & Cherny, V. V., *Insights into the structure and function of Hv1 from a meta-analysis of mutation studies*, *The Journal of general physiology* **2016**, 148, 97–118.
56. Okamura, Y., Fujiwara, Y. & Sakata, S., *Gating mechanisms of voltage-gated proton channels*, *Annual review of biochemistry* **2015**, 84, 685–709.
57. Koch, H. P. *et al.*, *Multimeric nature of voltage-gated proton channels*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, 105, 9111–9116.
58. Ramsey, I. S. *et al.*, *An aqueous H<sup>+</sup> permeation pathway in the voltage-gated proton channel Hv1*, *Nature structural & molecular biology* **2010**, 17, 869–875.
59. Gonzalez, C., Koch, H. P., Drum, B. M. & Larsson, H. P., *Strong cooperativity between subunits in voltage-gated proton channels*, *Nature structural & molecular biology* **2010**, 17, 51–56.
60. Hondares, E. *et al.*, *Enhanced activation of an amino-terminally truncated isoform of the voltage-gated proton channel HVCN1 enriched in malignant B cells*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, 111, 18078–18083.
61. Musset, B. *et al.*, *Identification of Thr29 as a critical phosphorylation site that activates the human proton channel Hvcn1 in leukocytes*, *The Journal of biological chemistry* **2010**, 285, 5117–5121.
62. Berger, T. K. *et al.*, *Posttranslational cleavage of Hv1 in human sperm tunes pH- and voltage-dependent gating*, *The Journal of Physiology* **2016**.
63. Iovannisci, D., Illek, B. & Fischer, H., *Function of the HVCN1 proton channel in airway epithelia and a naturally occurring mutation, M91T*, *The Journal of general physiology* **2010**, 136, 35–46.
64. Letts, J. A., Dissertation, The Rockefeller University, **2014**.
65. Musset, B. *et al.*, *Aspartate 112 is the selectivity filter of the human voltage-gated proton channel*, *Nature* **2011**, 480, 273–277.
66. Hong, L., Pathak, M. M., Kim, I. H., Ta, D. & Tombola, F., *Voltage-sensing domain of voltage-gated proton channel Hv1 shares mechanism of block with pore domains*, *Neuron* **2013**, 77, 274–287.
67. Chamberlin, A. *et al.*, *Hydrophobic plug functions as a gate in voltage-gated proton channels*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, 111, E273-82.

## Literaturverzeichnis

68. Kulleperuma, K. *et al.*, *Construction and validation of a homology model of the human voltage-gated proton channel hHV1*, *The Journal of general physiology* **2013**, 141, 445–465.
69. Dudev, T. *et al.*, *Selectivity Mechanism of the Voltage-gated Proton Channel, HV1*, *Scientific reports* **2015**, 5, 10320.
70. van Keulen, S. C. *et al.*, *Does Proton Conduction in the Voltage-Gated H<sup>+</sup> Channel hHv1 Involve Grothuss-Like Hopping via Acidic Residues?*, *The journal of physical chemistry. B* **2016**.
71. Rebolledo, S., Qiu, F. & Peter Larsson, H., *Molecular structure and function of Hv1 channels*, *WIREs Membr Transp Signal* **2012**, 1, 763–777.
72. Sakata, S. *et al.*, *Functionality of the voltage-gated proton channel truncated in S4*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, 107, 2313–2318.
73. Berger, T. K. & Isacoff, E. Y., *The pore of the voltage-gated proton channel*, *Neuron* **2011**, 72, 991–1000.
74. Mony, L., Berger, T. K. & Isacoff, E. Y., *A specialized molecular motion opens the Hv1 voltage-gated proton channel*, *Nature structural & molecular biology* **2015**, 22, 283–290.
75. Morgan, D. *et al.*, *Peregrination of the selectivity filter delineates the pore of the human voltage-gated proton channel hHV1*, *The Journal of general physiology* **2013**, 142, 625–640.
76. Decoursey, T. E., *The Voltage-Gated Proton Channel: A Riddle, Wrapped in a Mystery, inside an Enigma*, *Biochemistry* **2015**, 54, 3250–3268.
77. Chamberlin, A., Qiu, F., Wang, Y., Noskov, S. Y. & Larsson, H. P., *Mapping the gating and permeation pathways in the voltage-gated proton channel Hv1*, *Journal of molecular biology* **2015**, 427, 131–145.
78. Qiu, F., Rebolledo, S., Gonzalez, C. & Larsson, H. P., *Subunit interactions during cooperative opening of voltage-gated proton channels*, *Neuron* **2013**, 77, 288–298.
79. Li, Q. *et al.*, *Resting state of the human proton channel dimer in a lipid bilayer*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, 112, E5926-35.
80. Li, Q. *et al.*, *Structural mechanism of voltage-dependent gating in an isolated voltage-sensing domain*, *Nature structural & molecular biology* **2014**, 21, 244–252.
81. Wood, M. L. *et al.*, *Water wires in atomistic models of the Hv1 proton channel*, *Biochimica et biophysica acta* **2012**, 1818, 286–293.

82. Gonzalez, C. & Larsson, H. P., *Permeation mechanism in voltage-activated proton channels: a new glimpse*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, 107, 1817–1818.
83. Ulbrich, M. H. & Isacoff, E. Y., *Subunit counting in membrane-bound proteins*, *Nature methods* **2007**, 4, 319–321.
84. Tombola, F., Ulbrich, M. H., Kohout, S. C. & Isacoff, E. Y., *The opening of the two pores of the Hv1 voltage-gated proton channel is tuned by cooperativity*, *Nature structural & molecular biology* **2010**, 17, 44–50.
85. Li, S. J. *et al.*, *The role and structure of the carboxyl-terminal domain of the human voltage-gated proton channel Hv1*, *The Journal of biological chemistry* **2010**, 285, 12047–12054.
86. Fujiwara, Y. *et al.*, *The cytoplasmic coiled-coil mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H(+) channel Hv1*, *Nature communications* **2012**, 3, 816.
87. Fujiwara, Y., Takeshita, K., Nakagawa, A. & Okamura, Y., *Structural characteristics of the redox-sensing coiled coil in the voltage-gated H<sup>+</sup> channel*, *The Journal of biological chemistry* **2013**, 288, 17968–17975.
88. Takeshita, K. *et al.*, *X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel*, *Nature structural & molecular biology* **2014**, 21, 352–357.
89. Cherny, V. V. & Decoursey, T. E., *pH-Dependent Inhibition of Voltage-Gated H<sup>+</sup> Currents in Rat Alveolar Epithelial Cells by Zn<sup>2+</sup> and Other Divalent Cations*, *The Journal of general physiology* **1999**, 114, 819–838.
90. Cherny, V. V., Henderson, L. M., Xu, W., Thomas, L. L. & DeCoursey, T. E., *Activation of NADPH oxidase-related proton and electron currents in human eosinophils by arachidonic acid*, *The Journal of Physiology* **2001**, 535, 783–794.
91. Lishko, P. V., Botchkina, I. L., Fedorenko, A. & Kirichok, Y., *Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel*, *Cell* **2010**, 140, 327–337.
92. Lishko, P. V. *et al.*, *The control of male fertility by spermatozoan ion channels*, *Annual review of physiology* **2012**, 74, 453–475.
93. Kawanabe, A. & Okamura, Y., *Effects of unsaturated fatty acids on the kinetics of voltage-gated proton channels heterologously expressed in cultured cells*, *The Journal of Physiology* **2016**, 594, 595–610.
94. Decoursey, T. E., *The intimate and controversial relationship between voltage-gated proton channels and the phagocyte NADPH oxidase*, *Immunological reviews* **2016**, 273, 194–218.

## Literaturverzeichnis

95. Decoursey, T. E., Morgan, D. & Cherny, V. V., *The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels*, *Nature* **2003**, 422, 531–534.
96. Wang, Y., Li, S. J., Wu, X., Che, Y. & Li, Q., *Clinicopathological and biological significance of human voltage-gated proton channel Hv1 protein overexpression in breast cancer*, *The Journal of biological chemistry* **2012**, 287, 13877–13888.
97. Ribeiro-Silva, L., Queiroz, F. O., da Silva, A. M. B., Hirata, A. E. & Arcisio-Miranda, M., *Voltage-Gated Proton Channel in Human Glioblastoma Multiforme Cells*, *ACS chemical neuroscience* **2016**, 7, 864–869.
98. Lishko, P., Clapham, D. E., Navarro, B. & Kirichok, Y., *Sperm patch-clamp*, *Methods in enzymology* **2013**, 525, 59–83.
99. Amoako, A. A. *et al.*, *Anandamide modulates human sperm motility: implications for men with asthenozoospermia and oligoasthenoteratozoospermia*, *Human reproduction (Oxford, England)* **2013**, 28, 2058–2066.
100. Wang, X. *et al.*, *The Voltage-gated Proton Channel Hv1 Is Required for Insulin Secretion in Pancreatic  $\beta$  Cells*, **2017**.
101. Fernandez, A., Pupo, A., Mena-Ulecia, K. & Gonzalez, C., *Pharmacological Modulation of Proton Channel Hv1 in Cancer Therapy: Future Perspectives*, *Molecular pharmacology* **2016**, 90, 385–402.
102. Wu, L.-J. *et al.*, *The voltage-gated proton channel Hv1 enhances brain damage from ischemic stroke*, *Nature neuroscience* **2012**, 15, 565–573.
103. Tian, D.-S. *et al.*, *Deficiency in the voltage-gated proton channel Hv1 increases M2 polarization of microglia and attenuates brain damage from photothrombotic ischemic stroke*, *Journal of neurochemistry* **2016**, 139, 96–105.
104. Asuaje, A. *et al.*, *The inhibition of voltage-gated H<sup>+</sup> channel (HVCN1) induces acidification of leukemic Jurkat T cells promoting cell death by apoptosis*, *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **2017**, 469, 251–261.
105. Capasso, M., Decoursey, T. E. & Dyer, M. J. S., *pH regulation and beyond: unanticipated functions for the voltage-gated proton channel, HVCN1*, *Trends in cell biology* **2011**, 21, 20–28.
106. Reinard, T., *Molekularbiologische Methoden* Ulmer, Stuttgart, **2010**.
107. Mülhardt, C., *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*, 6th ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2009**.

108. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*, *Journal of molecular biology* **1983**, 166, 557–580.
109. Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W., *High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation*, *Nucleic Acids Research* **1988**, 16, 6127–6145.
110. M. Jansohn (ed.), *Gentechnische Methoden, Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2011**.
111. Gallagher, S. R. & Desjardins, P. R., *Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy*, *Current protocols in protein science* **2008**, Appendix 3, Appendix 4K.
112. Dubendorf, J. W. & Studier, F.W., *Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor*, *Journal of molecular biology* **1991**, 219, 45–59.
113. Studier, F.W. & Moffatt, B. A., *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*, *Journal of molecular biology* **1986**, 189, 113–130.
114. Rehm, H., *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics*, 5th ed. Elsevier, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, München, **2006**.
115. Laemmli, U. K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, *Nature* **1970**, 227, 680–685.
116. Schägger, H. & Jagow, G. von, *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*, *Analytical Biochemistry* **1987**, 166, 368–379.
117. Schägger, H., *Tricine-SDS-PAGE*, *Nature protocols* **2006**, 1, 16–22.
118. Kyhse-Andersen, J., *Electroblotting of multiple gels, A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1984**, 10, 203–209.
119. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C., *How to study proteins by circular dichroism*, *Biochimica et biophysica acta* **2005**, 1751, 119–139.
120. *Circulardichroismus und Proteinstruktur - Chemgapedia*, ([www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteindynamik/circulardichroismus.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteindynamik/cd2.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteindynamik/circulardichroismus.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteindynamik/cd2.vscml.html)), aufgerufen am 13.01.2017.

## Literaturverzeichnis

121. Park, K., Perczel, A. & Fasman, G. D., *Differentiation between transmembrane helices and peripheral helices by the deconvolution of circular dichroism spectra of membrane proteins*, *Protein science : a publication of the Protein Society* **1992**, 1, 1032–1049.
122. Greenfield, N. J., *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*, *Nature protocols* **2006**, 1, 2876–2890.
123. Tamura, M., Tamura, T., Tyagi, S. R. & Lambeth, J. D., *The superoxide-generating respiratory burst oxidase of human neutrophil plasma membrane. Phosphatidylserine as an effector of the activated enzyme*, *The Journal of biological chemistry* **1988**, 263, 17621–17626.
124. Cornelius, F., *Modulation of Na,K-ATPase and Na-ATPase Activity by Phospholipids and Cholesterol. I. Steady-State Kinetics †*, *Biochemistry* **2001**, 40, 8842–8851.
125. Mitra, K., Ubarretxena-Belandia, I., Taguchi, T., Warren, G. & Engelman, D. M., *Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101, 4083–4088.
126. Han, J. & Burgess, K., *Fluorescent indicators for intracellular pH*, *Chemical reviews* **2010**, 110, 2709–2728.
127. Oregon Green 488 1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine (Oregon Green 488 DHPE), ([www.thermofisher.com/order/catalog/product/O12650](http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/O12650)), aufgerufen am 12.01.2017.
128. Eytan, G. D., *Use of liposomes for reconstitution of biological functions*, *Biochimica et biophysica acta* **1982**, 694, 185–202.
129. Rigaud, J.-L. & Lévy, D. in *Liposomes, Part B* (Elsevier2003), pp. 65–86.
130. Lasic, D. D., *The mechanism of vesicle formation*, *The Biochemical journal* **1988**, 256, 1–11.
131. Dufour, J. P., Goffeau, A. & Tsong, T. Y., *Active proton uptake in lipid vesicles reconstituted with the purified yeast plasma membrane ATPase. Fluorescence quenching of 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine*, *The Journal of biological chemistry* **1982**, 257, 9365–9371.
132. Zhang, J., Feng, Y. & Forgacs, M., *Proton conduction and bafilomycin binding by the V0 domain of the coated vesicle V-ATPase*, *The Journal of biological chemistry* **1994**, 269, 23518–23523.
133. Rottenberg, H. & Moreno-Sanchez, R., *The proton pumping activity of H(+)-ATPases: an improved fluorescence assay*, *Biochimica et biophysica acta* **1993**, 1183, 161–170.

134. Casadio, R., *Measurements of transmembrane pH differences of low extents in bacterial chromatophores*, *Eur Biophys J* **1991**, 19.
135. Sanden, T., Salomonsson, L., Brzezinski, P. & Widengren, J., *Surface-coupled proton exchange of a membrane-bound proton acceptor*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, 107, 4129–4134.
136. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1963*, ([www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1963/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1963/)), aufgerufen am 17.01.2017.
137. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1991*, ([www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1991/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1991/)), aufgerufen am 17.01.2017.
138. Neher, E., *Ionenkanäle für die inter- und intrazelluläre Kommunikation. (Nobel-Vortrag)*, *Angewandte Chemie* **1992**, 104, 837–843.
139. *Pressemitteilung: Der Nobelpreis in Chemie 2003*, ([www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2003/press-ge.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2003/press-ge.html)), aufgerufen am 17.01.2017.
140. MacKinnon, R., *Kaliumkanäle und die atomare Basis der selektiven Ionenleitung (Nobel-Vortrag)*, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 4363–4376.
141. Morgan, D. & Decoursey, T. E., *Diversity of voltage gated proton channels*, *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **2003**, 8, s1266-79.
142. Hojberg, J. et al., *An electrochemical impedance spectroscopy investigation of the overpotentials in Li-O<sub>2</sub> batteries*, *ACS applied materials & interfaces* **2015**, 7, 4039–4047.
143. Basiaga, M., Walke, W., Paszenda, Z., Karasinski, P. & Szewczenko, J., *The effects of a SiO<sub>2</sub> coating on the corrosion parameters cpTi and Ti-6Al-7Nb alloy*, *Biomatter* **2014**, 4, e28535.
144. Schäfer, E. et al., *Shape oscillations of Dictyostelium discoideum cells on ultramicroelectrodes monitored by impedance analysis*, *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2011**, 7, 723–726.
145. Ngavouka, M. D. N. et al., *Mismatch detection in DNA monolayers by atomic force microscopy and electrochemical impedance spectroscopy*, *Beilstein journal of nanotechnology* **2016**, 7, 220–227.
146. Daniels, J. S. & Pourmand, N., *Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges*, *Electroanalysis* **2007**, 19, 1239–1257.

## Literaturverzeichnis

147. Naumann, R. *et al.*, *The peptide-tethered lipid membrane as a biomimetic system to incorporate cytochrome c oxidase in a functionally active form*, *Biosensors and Bioelectronics* **1999**, 14, 651–662.
148. Hwang, E. T. *et al.*, *A Decaheme Cytochrome as a Molecular Electron Conduit in Dye-Sensitized Photoanodes*, *Advanced functional materials* **2015**, 25, 2308–2315.
149. Li, M. *et al.*, *Single Enzyme Experiments Reveal a Long-Lifetime Proton Leak State in a Heme-Copper Oxidase*, *Journal of the American Chemical Society* **2015**, 137, 16055–16063.
150. Steinem, C., Janshoff, A., Ulrich, W.-P., Sieber, M. & Galla, H.-J., *Impedance analysis of supported lipid bilayer membranes, A scrutiny of different preparation techniques*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1996**, 1279, 169–180.
151. Steinem, C. *et al.*, *Valinomycin-mediated transport of alkali cations through solid supported membranes*, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1998**, 45, 17–26.
152. Schmitt, E. K., Nurnabi, M., Bushby, R. J. & Steinem, C., *Electrically insulating pore-suspending membranes on highly ordered porous alumina obtained from vesicle spreading*, *Soft Matter* **2008**, 4, 250–253.
153. Schmitt, E. K., Weichbrodt, C. & Steinem, C., *Impedance analysis of gramicidin D in pore-suspending membranes*, *Soft Matter* **2009**, 5, 3347.
154. Eva Katharina Schmitt, Dissertation, Georg-August-Universität, **2009**.
155. Macdonald, D. D., *Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy*, *Electrochimica Acta* **2006**, 51, 1376–1388.
156. Hsu, C. H. & Mansfeld, F., *Technical Note, Concerning the Conversion of the Constant Phase Element Parameter  $Y_0$  into a Capacitance*, *CORROSION* **2001**, 57, 747–748.
157. Jorcin, J.-B., Orazem, M. E., Pébère, N. & Tribollet, B., *CPE analysis by local electrochemical impedance spectroscopy*, *Electrochimica Acta* **2006**, 51, 1473–1479.
158. Valincius, G., Meskauskas, T. & Ivanauskas, F., *Electrochemical impedance spectroscopy of tethered bilayer membranes*, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2012**, 28, 977–990.
159. Kozuch, J. *et al.*, *Voltage-dependent structural changes of the membrane-bound anion channel hVDAC1 probed by SEIRA and electrochemical impedance spectroscopy*, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2014**, 16, 9546–9555.
160. Ashrafuzzaman, M. & Tuszynski, J. A., *Membrane biophysics* Springer, Berlin, London, **2011**.



161. MACDONALD, J. & POTTERJR, L., *A flexible procedure for analyzing impedance spectroscopy results*, Description and illustrations, *Solid State Ionics* **1987**, 24, 61–79.
162. Giaever, I. & Keese, C. R., *Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1984**, 81, 3761–3764.
163. Stolwijk, J. A., Matrougui, K., Renken, C. W. & Trebak, M., *Impedance analysis of GPCR-mediated changes in endothelial barrier function: overview and fundamental considerations for stable and reproducible measurements*, *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **2015**, 467, 2193–2218.
164. Siebert, F. & Hildebrandt, P. W., *Vibrational spectroscopy in life science* Wiley-VCH, Weinheim, Chichester, **2008**.
165. Hartstein, A., Kirtley, J. R. & Tsang, J. C., *Enhancement of the Infrared Absorption from Molecular Monolayers with Thin Metal Overlayers*, *Phys. Rev. Lett.* **1980**, 45, 201–204.
166. Osawa, M. in *Near-field optics and surface plasmon polaritons*, edited by S. Kawata (Springer, Berlin, London, 2001), pp. 163–187.
167. Miyake, H., Ye, S. & Osawa, M., *Electroless deposition of gold thin films on silicon for surface-enhanced infrared spectroelectrochemistry*, *Electrochemistry Communications* **2002**, 4, 973–977.
168. Weickert, M. J., Doherty, D. H., Best, E. A. & Olins, P. O., *Optimization of heterologous protein production in Escherichia coli*, *Current Opinion in Biotechnology* **1996**, 7, 494–499.
169. Hannig, G. & Makrides, S. C., *Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli*, *Trends in Biotechnology* **1998**, 16, 54–60.
170. Carbonell, X., Corchero, J. L., Cubarsi, R., Vila, P. & Villaverde, A., *Control of Escherichia coli growth rate through cell density*, *Microbiological research* **2002**, 157, 257–265.
171. Seddon, A. M., Curnow, P. & Booth, P. J., *Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera*, *Biochimica et biophysica acta* **2004**, 1666, 105–117.
172. Rebecca Maria Rixen, Bachelorarbeit, Georg-August Universität Göttingen, **2016**.
173. Rebecca Maria Rixen, Bericht der Fachvertiefung, Georg-August Universität Göttingen, **2016**.
174. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M., *Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels*, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 850–858.

## Literaturverzeichnis

175. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V. & Mann, M., *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*, *Nature protocols* **2006**, 1, 2856–2860.
176. Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H., Yoshida, M. & Kagawa, Y., *Purified proton conductor in proton translocating adenosine triphosphatase of a thermophilic bacterium*, *The Journal of biological chemistry* **1977**, 252, 6125–6131.
177. Fang, G. *et al.*, *Manipulation of activity and orientation of membrane-reconstituted di-tripeptide transport protein DtpT of Lactococcus lactis*, *Molecular membrane biology* **1999**, 16, 297–304.
178. Schwamborn, M., Schumacher, J., Sibold, J., Teiwes, N. K. & Steinem, C., *Monitoring ATPase induced pH changes in single proteoliposomes with the lipid-coupled fluorophore Oregon Green 488*, *The Analyst* **2017**.
179. Kozuch, J., Steinem, C., Hildebrandt, P. & Millo, D., *Kombinierte elektrochemische und oberflächenverstärkte IR-absorptionsspektroskopische Untersuchung von Gramicidin A in trägerfixierten Lipiddoppelschichtmembranen*, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 8238–8241.
180. Wiebalck, S. *et al.*, *Monitoring the Transmembrane Proton Gradient Generated by Cytochrome bo3 in Tethered Bilayer Lipid Membranes Using SEIRA Spectroscopy*, *The journal of physical chemistry. B* **2016**, 120, 2249–2256.
181. Jackman, J., Knoll, W. & Cho, N.-J., *Biotechnology Applications of Tethered Lipid Bilayer Membranes*, *Materials* **2012**, 5, 2637–2657.
182. Janshoff, A. & Steinem, C., *Transport across artificial membranes-an analytical perspective*, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2006**, 385, 433–451.
183. Steinem, C. & Janshoff, A., *Modellmembranen auf Oberflächen. Verankert und doch mobil*, *Chemie in unserer Zeit* **2008**, 42, 116–127.
184. Urdapilleta, E., Bellotti, M. & Bonetto, F. J., *Impedance analysis of cultured cells: a mean-field electrical response model for electric cell-substrate impedance sensing technique*, *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* **2006**, 74, 41908.
185. Kong, J. & Yu, S., *Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures*, *Acta biochimica et biophysica Sinica* **2007**, 39, 549–559.
186. Barth, A. & Zscherp, C., *What vibrations tell us about proteins*, *Quarterly reviews of biophysics* **2002**, 35, 369–430.
187. Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. & D'Ari, R., *Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth*, *Journal of bacteriology* **2007**, 189, 8746–8749.

188. Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H. & Kompala, D. S., *Plasmid-encoded protein: the principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria*, *Biotechnology and bioengineering* **1990**, 35, 668–681.
189. Wang, H. *et al.*, *Improving the expression of recombinant proteins in E. coli BL21 (DE3) under acetate stress: an alkaline pH shift approach*, *PloS one* **2014**, 9, e112777.
190. Toombes, G. E. S. & Swartz, K. J., *Divining the design principles of voltage sensors*, *The Journal of general physiology* **2014**, 143, 139–144.
191. Peng, D. *et al.*, *Purification and structural study of the voltage-sensor domain of the human KCNQ1 potassium ion channel*, *Biochemistry* **2014**, 53, 2032–2042.
192. Agharkar, A., Rzadkowski, J., McBroom, M. & Gonzales, E. B., *Detergent screening of the human voltage-gated proton channel using fluorescence-detection size-exclusion chromatography*, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2014**, 23, 1136–1147.
193. Newstead, S., Ferrandon, S. & Iwata, S., *Rationalizing alpha-helical membrane protein crystallization*, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2008**, 17, 466–472.
194. Parker, J. L. & Newstead, S., *Current trends in  $\alpha$ -helical membrane protein crystallization*, An update, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2012**, 21, 1358–1365.
195. Palmer, I. & Wingfield, P. T., *Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from Escherichia coli*, *Current protocols in protein science* **2004**, Chapter 6, Unit 6.3.
196. Singh, S. M. & Panda, A. K., *Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins*, *Journal of bioscience and bioengineering* **2005**, 99, 303–310.
197. Schlager, B., Straessle, A. & Hafen, E., *Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression*, *BMC biotechnology* **2012**, 12, 95.
198. Lau, F. W. & Bowie, J. U., *A method for assessing the stability of a membrane protein*, *Biochemistry* **1997**, 36, 5884–5892.
199. Qiagen, ([www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/protein/expression-purification-detection/ni-nta-agarose/](http://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/protein/expression-purification-detection/ni-nta-agarose/)), aufgerufen am 28.07.2017.
200. Qiagen, *The QIAexpressionist*, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, ([www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=79ca2f7d-42fe-4d62-8676-4cfa948c9435&lang=en](http://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=79ca2f7d-42fe-4d62-8676-4cfa948c9435&lang=en)), aufgerufen am 28.07.2017.
201. Suzuki, H. & Terada, T., *Removal of dodecyl sulfate from protein solution*, *Analytical Biochemistry* **1988**, 172, 259–263.

## Literaturverzeichnis

202. Gale, E. F. & Epps, H. M., *The effect of the pH of the medium during growth on the enzymic activities of bacteria (Escherichia coli and Micrococcus lysodeikticus) and the biological significance of the changes produced*, *The Biochemical journal* **1942**, 36, 600–618.
203. Suelter, C. H. & DeLuca, M., *How to prevent losses of protein by adsorption to glass and plastic*, *Analytical Biochemistry* **1983**, 135, 112–119.
204. Haines, T. H., *Anionic lipid headgroups as a proton-conducting pathway along the surface of membranes: a hypothesis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1983**, 80, 160–164.
205. Georgievskii, Y., Medvedev, E. S. & Stuchebrukhov, A. A., *Proton Transport via the Membrane Surface*, *Biophysical Journal* **2002**, 82, 2833–2846.
206. Georgievskii, Y., Medvedev, E. S. & Stuchebrukhov, A. A., *Proton transport via coupled surface and bulk diffusion*, *The Journal of Chemical Physics* **2002**, 116, 1692–1699.
207. Marsh, D., *CRC handbook of lipid bilayers* CRC Press, Boca Raton, Fla., **1990**.
208. Rostovtseva, T. K., Aguilera, V. M., Vodyanoy, I., Bezrukov, S. M. & Parsegian, V. A., *Membrane Surface-Charge Titration Probed by Gramicidin A Channel Conductance*, *Biophysical Journal* **1998**, 75, 1783–1792.
209. Kristina Kramer, Bachelorarbeit, Georg-August Universität Göttingen, **2015**.
210. D'Avanzo, N. *et al.*, *Differential lipid dependence of the function of bacterial sodium channels*, *PloS one* **2013**, 8, e61216.
211. Betaneli, V., Petrov, E. P. & Schwille, P., *The role of lipids in VDAC oligomerization*, *Biophysical Journal* **2012**, 102, 523–531.
212. Yeagle, P. L., *Cholesterol and the cell membrane*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1985**, 822, 267–287.
213. Bukiya, A. N. *et al.*, *Cholesterol increases the open probability of cardiac K<sub>ACh</sub> currents*, *Biochimica et biophysica acta* **2015**, 1848, 2406–2413.
214. Romanenko, V. G. *et al.*, *Cholesterol sensitivity and lipid raft targeting of Kir2.1 channels*, *Biophysical Journal* **2004**, 87, 3850–3861.
215. Bock, J., Szabó, I., Gamper, N., Adams, C. & Gulbins, E., *Ceramide inhibits the potassium channel Kv1.3 by the formation of membrane platforms*, *Biochemical and biophysical research communications* **2003**, 305, 890–897.

216. Hajdú, P., Varga, Z., Pieri, C., Panyi, G. & Gáspár, R., *Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes*, *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **2003**, 445, 674–682.
217. Rehberg, B., Urban, B. W. & Duch, D. S., *The membrane lipid cholesterol modulates anesthetic actions on a human brain ion channel*, *Anesthesiology* **1995**, 82, 749–758.
218. WU, C. et al., *The effect of hypercholesterolemia on the sodium inward currents in cardiac myocyte*, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **1995**, 27, 1263–1269.
219. Levitan, I., Fang, Y., Rosenhouse-Dantsker, A. & Romanenko, V., *Cholesterol and ion channels*, *Sub-cellular biochemistry* **2010**, 51, 509–549.
220. Gensure, R. H., Zeidel, M. L. & Hill, W. G., *Lipid raft components cholesterol and sphingomyelin increase H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> permeability of phosphatidylcholine membranes*, *The Biochemical journal* **2006**, 398, 485–495.
221. Rigaud, J.-L., Pitard, B. & Levy, D., *Reconstitution of membrane proteins into liposomes, Application to energy-transducing membrane proteins*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1995**, 1231, 223–246.
222. Koning, R. I., Dissertation, University of Groningen, **2003**.
223. Stuart, M. C. A. & Boekema, E. J., *Two distinct mechanisms of vesicle-to-micelle and micelle-to-vesicle transition are mediated by the packing parameter of phospholipid-detergent systems*, *Biochimica et biophysica acta* **2007**, 1768, 2681–2689.
224. Kragh-Hansen, U., Le Maire, M. & Møller, J. V., *The Mechanism of Detergent Solubilization of Liposomes and Protein-Containing Membranes*, *Biophysical Journal* **1998**, 75, 2932–2946.
225. Lichtenberg, D., Ahyayauch, H. & Goñi, F. M., *The mechanism of detergent solubilization of lipid bilayers*, *Biophysical Journal* **2013**, 105, 289–299.
226. Knol, J., Sjollem, K. & Poolman, B., *Detergent-mediated reconstitution of membrane proteins*, *Biochemistry* **1998**, 37, 16410–16415.
227. Surma, M. A., Szczepaniak, A. & Króliczewski, J., *Comparative studies on detergent-assisted apocytochrome b6 reconstitution into liposomal bilayers monitored by Zetasizer instruments*, *PloS one* **2014**, 9, e111341.
228. Dröse, S., Galkin, A. & Brandt, U., *Proton pumping by complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from Yarrowia lipolytica reconstituted into proteoliposomes*, *Biochimica et biophysica acta* **2005**, 1710, 87–95.

## Literaturverzeichnis

229. Schuldiner, S., Rottenberg, H. & Avron, M., *Determination of DeltapH in Chloroplasts. 2. Fluorescent Amines as a Probe for the Determination of DeltapH in Chloroplasts*, *Eur J Biochem* **1972**, 25, 64–70.
230. Grzesiek, S., Otto, H. & Dencher, N. A., *delta pH-induced fluorescence quenching of 9-aminoacridine in lipid vesicles is due to excimer formation at the membrane*, *Biophysical Journal* **1989**, 55, 1101–1109.
231. Kano, K. & Fendler, J. H., *Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles*, *Biochimica et biophysica acta* **1978**, 509, 289–299.
232. Thelen, M., Petrone, G., O'Shea, P. S. & Azzi, A., *The use of fluorescein-dipalmitoylphosphatidylethanolamine for measuring pH-changes in the internal compartment of phospholipid vesicles*, *Biochimica et biophysica acta* **1984**, 766, 161–168.
233. Hughes, L. D., Rawle, R. J. & Boxer, S. G., *Choose your label wisely: water-soluble fluorophores often interact with lipid bilayers*, *PloS one* **2014**, 9, e87649.
234. Bordovsky, S. S., Wong, C. S., Bachand, G. D., Stachowiak, J. C. & Sasaki, D. Y., *Engineering Lipid Structure for Recognition of the Liquid Ordered Membrane Phase*, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2016**, 32, 12527–12533.
235. Shimokawa, N., Nagata, M. & Takagi, M., *Physical properties of the hybrid lipid POPC on micrometer-sized domains in mixed lipid membranes*, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2015**, 17, 20882–20888.
236. Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G. & Cullis, P. R., *Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1985**, 812, 55–65.
237. Decoursey, T. E., *Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways*, *Physiological reviews* **2003**, 83, 475–579.
238. Rottenberg, H., *Proton electrochemical potential gradient in vesicles, organelles, and prokaryotic cells*, *Methods in enzymology* **1989**, 172, 63–84.
239. Kang, J., Huguenard, J. R. & Prince, D. A., *Voltage-gated potassium channels activated during action potentials in layer V neocortical pyramidal neurons*, *Journal of neurophysiology* **2000**, 83, 70–80.
240. Cahalan, M. D., Chandy, K. G., DeCoursey, T. E. & Gupta, S., *A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes*, *The Journal of Physiology* **1985**, 358, 197–237.

241. Moffat, J. C. *et al.*, *Proton transport through influenza A virus M2 protein reconstituted in vesicles*, *Biophysical Journal* **2008**, 94, 434–445.
242. Brändén, M., Sandén, T., Brzezinski, P. & Widengren, J., *Localized proton microcircuits at the biological membrane-water interface*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103, 19766–19770.
243. Decoursey, T. E., *Voltage-gated proton channels: what's next?*, *The Journal of Physiology* **2008**, 586, 5305–5324.
244. Musset, B. *et al.*, *Oligomerization of the voltage-gated proton channel*, *Channels (Austin, Tex.)* **2010**, 4, 260–265.
245. Tombola, F., Ulbrich, M. H. & Isacoff, E. Y., *Architecture and gating of Hv1 proton channels*, *The Journal of Physiology* **2009**, 587, 5325–5329.
246. Cuthbert, A. W., *Importance of guanidinium groups of blocking sodium channels in epithelia*, *Molecular pharmacology* **1976**, 12, 945–957.
247. Sun, H., Greathouse, D. V., Andersen, O. S. & Koeppe, R. E., *The preference of tryptophan for membrane interfaces: insights from N-methylation of tryptophans in gramicidin channels*, *The Journal of biological chemistry* **2008**, 283, 22233–22243.
248. Durkin, J. T., Providence, L. L., Koeppe, R. E. & Andersen, O. S., *Formation of non-beta 6.3-helical gramicidin channels between sequence-substituted gramicidin analogues*, *Biophysical Journal* **1992**, 62, 145–159.
249. Qiu, F. *et al.*, *Molecular mechanism of Zn<sup>2+</sup> inhibition of a voltage-gated proton channel*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2016**, 113, E5962-E5971.
250. Martín-Molina, A., Rodríguez-Beas, C. & Faraudo, J., *Effect of calcium and magnesium on phosphatidylserine membranes: experiments and all-atomic simulations*, *Biophysical Journal* **2012**, 102, 2095–2103.
251. Wang, Y., Zhang, S. & Li, S. J., *Zn(2+) induces apoptosis in human highly metastatic SHG-44 glioma cells, through inhibiting activity of the voltage-gated proton channel Hv1*, *Biochemical and biophysical research communications* **2013**, 438, 312–317.
252. Kapus, A., Romanek, R. & Grinstein, S., *Arachidonic acid stimulates the plasma membrane H<sup>+</sup> conductance of macrophages*, *The Journal of biological chemistry* **1994**, 269, 4736–4745.

## Literaturverzeichnis

253. Kendall, J. K. R. *et al.*, *Effect of the structure of cholesterol-based tethered bilayer lipid membranes on ionophore activity*, *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* **2010**, 11, 2191–2198.
254. Jeuken, L. J. C. *et al.*, *Direct electrochemical interaction between a modified gold electrode and a bacterial membrane extract*, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2005**, 21, 1481–1488.
255. Kuhlmann, J. W., Mey, I. P. & Steinem, C., *Modulating the lateral tension of solvent-free pore-spanning membranes*, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2014**, 30, 8186–8192.
256. Jeuken, L. J.C. *et al.*, *Phase separation in mixed self-assembled monolayers and its effect on biomimetic membranes*, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, 124, 501–509.
257. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. & Ruyschaert, J. M., *Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures*, *Sub-cellular biochemistry* **1994**, 23, 405–450.
258. Dong, A., Huang, P. & Caughey, W. S., *Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra*, *Biochemistry* **2002**, 29, 3303–3308.
259. Decoursey, T. E., *Structural revelations of the human proton channel*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, 112, 13430–13431.
260. Goldschen-Ohm, M. P. & Chanda, B., *How to open a proton pore-more than S4?*, *Nature structural & molecular biology* **2015**, 22, 277–278.
261. Kučerka, N., Nieh, M.-P. & Katsaras, J., *Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature*, *Biochimica et biophysica acta* **2011**, 1808, 2761–2771.



## 8 Anhang

### 8.1 Kodierende Nukleinsäuresequenz nach der Umklonierung

ATG GGC AGC AGC CAT CAT CAT CAT CAC AGC AGC GGC CTG GTG CCG  
CGC GGC AGC CAT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG  
GAT CCG AAT TCG AGC TCC GTC GAC AAG CTT GGA TCC GCC ACC

ATG GCC ACC TGG GAC GAG AAG GCC GTG ACA AGA CGG GCC AAA GTG GCC  
CCT GCC GAG CGG ATG AGC AAG TTC CTG AGA CAC TTC ACC GTC GTG GGC GAC  
GAC TAC CAC GCC TGG AAC ATC AAC TAC AAG AAG TGG GAG AAC GAG GAA  
GAA GAG GAA GAG GAA GAA CAG CCC CCA CCC ACC CCT GTG TCT GGC GAA  
GAA GGC AGA GCC GCC GCT CCT GAT GTG GCT CCT GCT CCT GGA CCT GCT CCT  
AGA GCC CCC CTG GAC TTC AGA GGC ATG CTG CGG AAG CTG TTC AGC AGC  
CAC CGG TTC CAA GTG ATC ATC ATC TGC CTG GTG GTG CTG GAC GCC CTG CTG  
GTG CTG GCC GAG CTG ATC CTG GAT CTG AAG ATC ATC CAG CCC GAC AAG  
AAC AAC TAC GCC GCC ATG GTG TTC CAC TAC ATG AGC ATC ACC ATC CTG GTG  
TTC TTC ATG ATG GAA ATC ATC TTC AAG CTG TTC GTG TTC CGG CTG GAA TTT  
TTC CAC CAC AAG TTC GAG ATC CTG GAC GCT GTC GTG GTG GTG GTG TCC TTC  
ATC CTG GAC ATC GTG CTG CTG TTC CAG GAA CAC CAG TTC GAG GCC CTG GGC  
CTG CTG ATT CTG CTG AGA CTG TGG CGG GTG GCC CGG ATC ATC AAC GGC ATC  
ATC ATC AGC GTG AAA ACC AGA AGC GAG CGG CAG CTG CTG CGG CTG AAG  
CAG ATG AAT GTG CAG CTG GCC GCC AAG ATC CAG CAC CTG GAA TTT TCT TGC  
AGC GAG AAA GAG CAG GAA ATC GAG CGG CTG AAC AAG CTG CTG AGG CAG  
CAC GGC CTG CTG GGC GAA GTG AAC AGC GGA TCC

Abbildung 8-1: Das Fusionsprotein kodierende Nukleinsäuresequenz. Rot hervorgehoben ist die angefügte DNA-Sequenz, welche den Fusionstag kodiert. Fett markiert ist das Startcodon der H<sub>v</sub>1 Wildtyp kodierenden DNA.

## Anhang

### 8.2 Aminosäuresequenz des H<sub>V</sub>1-Fusionsproteins

10	20	30	40
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MASMTGGQQM	GRDPNSSSVD
50	60	70	80
KLGSATMATW	DEKAVTRRAK	VAPAERMSKF	LRHFTVVGDD
90	100	110	120
YHAWNINYYK	WENEEEEEEE	EQPPPTPVSG	EEGRAAAPDV
130	140	150	160
APAPGPAPRA	PLDFRGMLRK	PLDFRGMLRK	IICLVVLDAL
170	180	190	200
LVLAEILDL	KIIQPKNNY	AAMVFHYMSI	TILVFFMMEI
210	220	230	240
IFKLFVFRLE	FFHHKFEILD	AVVVVVSFIL	DIVLLFQEHQ
250	260	270	280
FEALGLLILL	RLWRVARIIN	GIISVKTRS	ERQLRLKQM
290	300	310	320
NVQLAAKIQH	LEFSCSEKEQ	EIERLNKLLR	QHGLLGEVNS GS

Abbildung 8-2: Aminosäuresequenz des H<sub>V</sub>1-Fusionsproteins. Rot markiert ist das, dass Startcodon repräsentierende, Methionin des ursprünglichen H<sub>V</sub>1-WT Proteins. Blau markiert wurde der eingefügte N-terminale His-Tag. Grün markiert sind die im Protein vorliegenden Tryptophane.

### 8.3 Berechnung der Anzahl an H<sub>V</sub>1-Kanälen pro Vesikel

Da die mittlere Größe der Vesikel bekannt ist (vgl. Kapitel 4.2.1) und auch das Protein-zu-Lipid-Verhältnis ( $\frac{p}{l}$ ) der Proteoliposomen bestimmt werden konnte, kann unter Berücksichtigung verschiedener Annahmen die Anzahl an H<sub>V</sub>1-Kanälen ( $N_{H_{V1}}$ ) pro Vesikel auf Grundlage der Anzahl der Lipide ( $N_{Lipid}$ ) bestimmt werden.

$$N_{H_{V1}} = N_{Lipid} \cdot \frac{p}{l} \quad 8-1$$

Die Anzahl der Lipide ist dabei durch den Quotienten ihrer absoluten Oberfläche im Vesikel ( $A_{Lipid}$ ) und Kopffläche pro Lipid ( $a_{Lipid}$ ) bestimmt.

$$N_{Lipid} = \frac{A_{Lipid}}{a_{Lipid}} \quad 8-2$$

Die absolute Fläche der Lipide ist definiert als Summe der äußeren und inneren Vesikeloberfläche ( $A_{\text{äußere Monoschicht}} + A_{\text{innere Monoschicht}}$ ) abzüglich des Proteinanteils ( $A_{H_{V1}}$ ).

$$A_{Lipid} = A_{\text{äußere Monoschicht}} + A_{\text{innere Monoschicht}} - A_{H_{V1}} \quad 8-3$$

Unter der Annahme, dass ein Vesikel eine perfekte Kugel ist, ist die Oberfläche der äußeren Membran als  $A_{\text{äußere Monoschicht}} = \pi \cdot d_V^2$  und innere Oberfläche als  $A_{\text{innere Monoschicht}} = \pi \cdot (d_V - 2h_{\text{Membran}})^2$  definiert. Hierbei wird ein mittlerer Vesikeldurchmesser ( $d_V$ ) von 100 nm und eine Membrandicke ( $h_{\text{Membran}}$ ) von 4 nm berücksichtigt.<sup>[261]</sup> Die Proteinoberfläche lässt sich nach Gleichung 8-4 bestimmen.

$$A_{H_{V1}} = x \cdot (\pi \cdot d_{SUV}^2 + \pi(d_{SUV} - 2h_{\text{Membran}})^2) \quad 8-4$$

Der Proteinanteil  $x$  wird durch Gleichung 8-5 beschrieben und berücksichtigt das Protein-zu-Lipid-Verhältnis sowie das Verhältnis der Oberflächen pro Molekül. Bei der Berechnung wurde eine mittlere Lipidoberfläche von 0.63 nm<sup>2</sup> angenommen.<sup>[261]</sup> Auf Basis der chimären Kristallstruktur wurde, ausgehend von einer horizontalen Proteinorientierung innerhalb der Membran, mit Hilfe des implementierten Tools *Jmol* der *RCSB Protein Data Bank* eine Oberfläche von etwa 5 nm<sup>2</sup> ermittelt.<sup>[88,261]</sup> Zudem wurde mit dem korrigierten Protein-zu-Lipid-Verhältnis von 1:17300 ( $n/n$ ) gerechnet.

$$x = \frac{a_{H_{V1}}}{a_{H_{V1}} + 17300 \cdot a_{Lipid}} \quad 8-5$$

## Anhang

Tabelle 8-1: Berechnete Parameter zur Bestimmung der Anzahl an H<sub>v</sub>1 Kanälen pro Proteoliposom bei einer Rekonstitution von 1:17300 (*n/n*).

$A_{\text{äußere Monoschicht}} / \text{nm}^2$	31416
$A_{\text{innere Monoschicht}} / \text{nm}^2$	26591
$x / \%$	0.05
$A_{\text{Hv1}} / \text{nm}^2$	27
$A_{\text{Lipid}} = / \text{nm}^2$	57979
$N_{\text{Lipid}}$	92116
$N_{\text{Hv1}}$	5.3

Unter Annahme einer Rekonstitution mit einem realen Protein-zu-Lipidverhältnis von 1:17300 (*n/n*), liegen pro Proteoliposomen etwa fünf H<sub>v</sub>1-Kanäle im Mittel vor.

## 8.4 Matlab Skript

```
% General parameters for loading files

% closing all windows and cleaning all parameters to ensure clean start

close all

clear all

% 1st line to read

r_first = 126;

% columns to use

r_zp = 5;

r_zpp = 6;

r_freq = 1;

r_Voltage = 3;

% Limit for the plots, for autoscale use -inf as low and inf as max
```

```
% Resistance  
lim_low_x_R=-inf;  
lim_up_x_R=inf;  
lim_low_y_R=-1;  
lim_up_y_R=15;  
% Capacitance  
lim_low_x_C=-inf;  
lim_up_x_C=inf;  
lim_low_y_C=-1;  
lim_up_y_C=5;  
  
% should every trace be plotted (value=1) ?  
single_plots = 0;  
% plot only certain Voltage Values? Simple enter the mV in one row array  
p_mV = [];  
  
% Folder for tBLM Data  
f_tBLM = 'Folder for tBLM Data ';  
% Init struct for tBLM  
d_tBLM=[];  
  
% Folder for SAM Data  
f_SAM = 'Folder for SAM Data';  
% Init struct for SAM  
d_SAM=[];
```

## Anhang

```
% Init Resultsstructs
```

```
Results=[];
```

```
% Folder to save the Data
```

```
f_home = 'Folder to save Data';
```

```
% Name for saved Data
```

```
p_name = 'Name for saved Data';
```

```
% checking if home is current directory
```

```
if strcmp(pwd,f_home)~=1
```

```
    dmy = 'none';
```

```
    while (strcmp(dmy,'home')||strcmp(dmy,'current'))~=1
```

```
        disp('Current Folder is not the home folder! Which Folder should be used?')
```

```
        disp(['enter home for ',f_home,' or current for ', pwd,': ']);
```

```
        dmy = input('Folder: ','s');
```

```
    switch dmy
```

```
        case 'home'
```

```
            disp('home will be used')
```

```
            f_work = f_home;
```

```
        case 'current'
```

```
            disp('current directory will be used')
```

```
            f_work = pwd;
```

```
    otherwise
```

```
        disp('no appropriate Folder given, repeat!')
```

```

        end

    end

else

    f_work=f_home;

end

% loading tBLM Data from Folder

% Saved in Struct d_tBLM z_p for Z' and z_pp for Z''

cd(f_tBLM);

f_list = dir('*.*z');

for i = 1:length(f_list);

    a = lda(f_list(i).name, r_first);

    d_tBLM(i).z_p = a(:,r_zp);

    d_tBLM(i).z_pp = a(:,r_zpp);

    d_tBLM(i).fname = f_list(i).name;

    d_tBLM(i).freq = a(:,r_freq);

    d_tBLM(i).Voltage = mean(a(:,r_Voltage)).*1000;

end

cd(f_work);

% loading SAM Data from Folder

% Saved in Struct d_tBLM z_p for Z' and z_pp for Z''

cd(f_SAM);

f_list = dir('*.*z');

for i = 1:length(f_list);

    a = lda(f_list(i).name, r_first);

```

## Anhang

```
d_SAM(i).z_p = a(:,r_zp);
d_SAM(i).z_pp = a(:,r_zpp);
d_SAM(i).fname = f_list(i).name;
d_SAM(i).freq = a(:,r_freq);
d_SAM(i).Voltage = mean(a(:,r_Voltage)).*1000;

end

cd(f_work);

% Calculating Resistance
if length(d_tBLM) ~= length(d_SAM)
    disp('Error in Data, no matching experiments')
else
    for i = 1:length(d_tBLM)
        Results(i).Resistance = d_tBLM(i).z_p ./ d_SAM(i).z_p;
        Results(i).Capacitance = d_SAM(i).z_pp ./ d_tBLM(i).z_pp;
        Results(i).files_used = ['tBLM: ', d_tBLM(i).fname, ' / SAM: ', d_SAM(i).fname];
        Results(i).folder_tBLM = f_tBLM;
        Results(i).folder_SAM = f_SAM;
        Results(i).freq_control = d_tBLM(i).freq ./ d_SAM(i).freq;
        Results(i).freq = d_tBLM(i).freq;
        Results(i).Voltage_control = d_tBLM(i).Voltage ./ d_SAM(i).Voltage;
        Results(i).Voltage = d_tBLM(i).Voltage;
        if mean(Results(i).freq_control)~=1
            disp('Frequencies do not match!')
            return
        elseif Results(i).freq_control~=1
```



```

        disp('Volatges do not match!')

        return

    else

    end

end

end

% Generating Plots

% Creating also a legend

legend_num = [];

for i = 1 : length(Results)

    legend_num = [legend_num; round(Results(i).Voltage)];

end

if single_plots == 1

    for i = 1 : length(Results)

        figure(i)

        subplot(2,1,1)

        semilogx(Results(i).freq,Results(i).Resistance);

        axis([lim_low_x_R lim_up_x_R lim_low_y_R lim_up_y_R])

        xlabel('Freq / Hz')

        ylabel('Resistance')

        title(f_tBLM)

        legend(strcat(num2str(legend_num(i)), ' mV'))

        subplot(2,1,2)

        semilogx(Results(i).freq,Results(i).Capacitance);

```

## Anhang

```
axis([lim_low_x_C lim_up_x_C lim_low_y_C lim_up_y_C])
xlabel('Freq / Hz')
ylabel('Capacitance')
end
end

% Gathering all in one Graph
% plotting only selected Voltages?
if isempty(p_mV) ~= 1
    [C,ia] = intersect(legend_num,p_mV);
    for i = 1 : length(ia)
        figure(length(Results)+1)
        subplot(2,1,1)
        semilogx(Results(i).freq,Results(ia(i)).Resistance);
        axis([lim_low_x_R lim_up_x_R lim_low_y_R lim_up_y_R])
        xlabel('Freq / Hz')
        ylabel('Resistance')
        title(f_tBLM)
        hold on
        subplot(2,1,2)
        semilogx(Results(i).freq,Results(ia(i)).Capacitance);
        axis([lim_low_x_C lim_up_x_C lim_low_y_C lim_up_y_C])
        xlabel('Freq / Hz')
        ylabel('Capacitance')
        hold on
    end
end
```

```

legend_num = C;
else
for i = 1 : length(Results)
figure(length(Results)+1)
subplot(2,1,1)
semilogx(Results(i).freq,Results(i).Resistance);
axis([lim_low_x_R lim_up_x_R lim_low_y_R lim_up_y_R])
xlabel('Freq / Hz')
ylabel('Resistance')
title(f_tBLM)
hold on
subplot(2,1,2)
semilogx(Results(i).freq,Results(i).Capacitance);
axis([lim_low_x_C lim_up_x_C lim_low_y_C lim_up_y_C])
xlabel('Freq / Hz')
ylabel('Capacitance')
hold on
end
end
figure(length(Results)+1)
subplot(2,1,1)
legendCell = cellstr(strcat(num2str(legend_num), ' mV'));
legend(legendCell)
hold off

% Exporting .txt files

```

## Anhang

```
for i = 1 : length(Results)

    dmy_str_CAP = strcat([p_name, '_Capacitance_', num2str(Results(i).Voltage), '_mV'], '.txt');

    dmy = Results(i).Capacitance;

    save(dmy_str_CAP, 'dmy', '-ascii')

    clear dmy

    dmy_str_RES = strcat([p_name, '_Resistance_', num2str(Results(i).Voltage), '_mV'], '.txt');

    dmy = Results(i).Resistance;

    save(dmy_str_RES, 'dmy', '-ascii')

end

dmy_str_CAP= strcat([p_name, '_Frequencies', '_Hz'], '.txt');

dmy = Results(i).freq;

save(dmy_str_CAP, 'dmy', '-ascii')

% Clearing up after work

clear i a ans dmy1 dmy2 f_list r_zpp r_zp r_first i f_work f_home f_SAM f_tBLM f_list

clear lim_low_x_R lim_up_x_R lim_low_y_R lim_up_y_R lim_low_x_C lim_up_x_C
lim_low_y_C lim_up_y_C

clear ia ib C legend_num legend_str r_freq r_Voltage p_mV legendCell single_plots dmy_str

% Saving workspace

save([p_name, '.mat'])
```

## 8.5 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Topologie spannungsgesteuerter Kationen- und Protonenkanäle. 6
- Abbildung 1-2: Schematische, topologische Darstellung der Aminosäuresequenz (UniProtKB-Q96D96) des hH<sub>v</sub>1-Protonenkanals. 9
- Abbildung 1-3: Modell der strukturellen Konformationsänderung während der Öffnung des H<sub>v</sub>1-Protonenkanals nach Mony *et al.*<sup>[74]</sup> Die Aktivierung des Kanal resultiert aus einer Umorientierung der S4-Helix, welche auf Grund der Depolarisation von der „down“-Konformation im geschlossenen Zustand in die „up“-Konformation wechselt. Hierbei kommt es ebenfalls zu einer Rotation der S4-Helix. Die Öffnung des Kanals wird anschließend durch eine Änderung der S1-Helix induziert. 12
- Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Positionen der Aminosäuren innerhalb der Heptaden-Wiederholung. 14
- Abbildung 1-5: Kristallstruktur des chimären mHV1-Kanals im geschlossenen Zustand nach Takeshita *et al.*<sup>[88]</sup> 15
- Abbildung 3-1: Schematische Darstellung einer Umklonierung. 22
- Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Regulation des verwendeten T7-Promoter Expressionssystems. 31
- Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Prinzips der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie. 35
- Abbildung 3-4: Schematische Darstellung des Aufbaus der Semidry Western Blot Apparatur. 39
- Abbildung 3-5: Vektordarstellung des linear polarisierten Lichts vor (A) und nach dem Durchtritt (B) durch ein optisch aktives Medium. 45
- Abbildung 3-6: Charakteristische Verläufe der CD-Spektren der Sekundärstrukturelemente  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und Random coil. 46
- Abbildung 3-7: Strukturformel von Natriumdodecylsulfat 48
- Abbildung 3-8: Strukturformel von *n*-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat 48
- Abbildung 3-9: Strukturformel von 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat 49
- Abbildung 3-10: Strukturformel von *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid 49
- Abbildung 3-11: Strukturformel von *n*-Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid 49
- Abbildung 3-12: Strukturformel von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin 50
- Abbildung 3-13: Strukturformel von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol 50
- Abbildung 3-14: Strukturformel von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serin 51
- Abbildung 3-15: Strukturformel von Cholesterin 51

## Anhang

Abbildung 3-16: Strukturformel von Oregon Green® 488 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin 52

Abbildung 3-17: Schematische Darstellung der Rekonstitution nach der Methode der direkten Insertion. 54

Abbildung 3-18: Vereinfachte Darstellung des Jablonski-Diagramms. 57

Abbildung 3-19: Strukturformel von 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin,  $C_{14}H_{11}ClN_2O$ ,  $M = 258.7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . 58

Abbildung 3-20: Schematische Darstellung des Prinzips des Protonenfluss-Test. 59

Abbildung 3-21: Schematische Darstellung der Goldelektrode der Impedanzspektroskopie. 64

Abbildung 3-22: Schematische Darstellung der unter der Messkammer fixierten Goldelektrode. 65

Abbildung 3-23: Auftragung der Impedanz in Form eines Zeigerdiagramms. 68

Abbildung 3-24: Ersatzschaltbild einer einfachen Lipiddoppelschicht im wässrigen Medium. 71

Abbildung 3-25: Nyquist-Diagramm der Simulation des Ersatzschaltbildes aus Abbildung 3-24. 72

Abbildung 3-26: Bode-Diagramm des Ersatzschaltbildes aus Abbildung 3-24 mit  $R_{el} = 1 \text{ k}\Omega$ ,  $R_m = 1 \text{ M}\Omega$  und  $C_m = 0.1 \text{ }\mu\text{F}$ . 73

Abbildung 3-27: Cole-Cole-Plot der Simulation des dazugehörigen Ersatzschaltbildes (siehe Abbildung 3-24). 74

Abbildung 3-28: Fotografie der Dreielektrodenanordnung während der impedanzspektroskopischen Messungen. 75

Abbildung 3-29: Strukturformel des Dihydrocholesteryl-2-(2-(2-ethoxy)ethoxy)ethanethiol (WK3SH),  $C_{33}H_{60}O_3S$ ,  $M = 536.9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . 78

Abbildung 3-30: Schematische Darstellung des Prozesses der SEIRA-Elektroden Präparation. 79

Abbildung 4-1: Dokumentation der einzelnen Umklonierungsschritte veranschaulicht anhand der zugehörigen Agarosegele. 82

Abbildung 4-2: Fotografie einer LB-Agarplatte (inkl. Kanamycin) nach der Kultivierung über Nacht bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . 83

Abbildung 4-3: Das theoretische Wachstum von *E. coli*-Zellen während der Kultivierung verläuft in 4 Phasen. 85

Abbildung 4-4: Zellwachstum des *E. coli*-Stammes BL21 Gen-X im Fall der IPTG induzierten HVCN1-Expression (blau) und ohne IPTG (grün). 86

Abbildung 4-5: SDS-Gel des Zellaufschlusses der BL21 Gen-X-Zellen. 87

Abbildung 4-6: Der Ausschnitt des SDS-Gels zeigt die Überstände (S2) aus dem Detergens *Screening*. 88

Abbildung 4-7: SDS-Gel nach dem zweiten Isolationsschritt, d. h. der Solubilisierung des Proteins. 89

- Abbildung 4-8: SDS-Gel der Isolation des spannungsgesteuerten Protonenkanals aus BL21 Gen-X.<sup>[172]</sup> 90
- Abbildung 4-9: SDS-Gel Analyse der Aufreinigung. 91
- Abbildung 4-10: SDS-Gel der Isolation und Aufreinigung des H<sub>v</sub>1-Proteins aus BL21(DE3). 93
- Abbildung 4-11: Kombinierte Analyse zur Identifikation des isolierten Proteins. 94
- Abbildung 4-12: Gemittelttes CD-Spektrum von H<sub>v</sub>1 in Dialysepuffer. 95
- Abbildung 4-13: SDS-Gel und Western Blot nach Dichtegradientenzentrifugation von POPC/POPG/Chol (55:25:20) Proteoliposomen mit einem nominalen Protein-zu-Lipid-Verhältnis von 1:9700 (*n/n*). 96
- Abbildung 4-14: Kalibrationskurve der Peakflächen der H<sub>v</sub>1-Referenzproben. 97
- Abbildung 4-15: Bestimmung der Verteilung der Durchmesser der Proteoliposomen durch dynamische Lichtstreuung. 98
- Abbildung 4-16: Exemplarischer ACMA (2.3 μM) basierter Fluxtest des Protonenkanals H<sub>v</sub>1 in kleinen unilamellaren Vesikeln bestehend aus POPC/POPG (75:25). 99
- Abbildung 4-17: Relative Änderungen der normierten Fluoreszenzintensitäten eines ACMA (2.3 μM) basierten Protonen-Fluxtests. 101
- Abbildung 4-18: Ergebnisse für A<sub>60</sub> nach exponentieller Anpassung der Daten der ACMA basierten Flusstests, zum Nachweis der erfolgreichen Rekonstitution aktiven H<sub>v</sub>1-Proteins. 104
- Abbildung 4-19: Ermittelte Anteile der Proteinaktivität aufweisenden Liposomen. 105
- Abbildung 4-20: Gemittelter A<sub>60</sub>-Wert der ACMA basierten Fluxtests der Blindproben. 106
- Abbildung 4-21: Gemittelte Halbwertszeit τ<sub>1/2</sub> der ACMA basierten Fluxtests. 107
- Abbildung 4-22: Normierte Fluoreszenzintensitäten des ACMA-Fluxtests an POPG bzw. POPS-haltigen Proteoliposomen. 108
- Abbildung 4-23: Einfluss des Protein-zu-Lipidverhältnis auf die Rekonstitution von H<sub>v</sub>1 in POPC/POPX/Chol (X=S oder G, 55:25:20) Liposomen. 109
- Abbildung 4-24: Inhibition des H<sub>v</sub>1-Kanals mittels 2GBI in POPC/POPS/Chol (55:25:20) Liposomen. 111
- Abbildung 4-25: Spektren der normierte Intensitäten des ACMA basierten Fluxtests. 113
- Abbildung 4-26: Temperaturabhängige Protonentranslokation veranschaulicht anhand des ACMA Protonenfluss-Test. 115
- Abbildung 4-27: Bestimmung des pK<sub>s</sub>-Wertes des lipidgekoppelten Fluorophors OG488-DHPE einer POPC/POPS/Chol/OG488-DHPE (54.5:25:20:0.5) Lipidmembran. 117
- Abbildung 4-28: Schematische Darstellung der Funktionsweise des OG488-DHPE basierten Protonenfluss-Tests. 118
- Abbildung 4-29: Abnahme des intravesikulären pH-Wertes innerhalb von H<sub>v</sub>1 Proteoliposomen. 121

## Anhang

Abbildung 4-30: Inhibition des  $H_V1$ -Kanals mittels 2GBI in POPC/POPS/Chol/OG488-DHPE (54.5:25:20:0.5) Liposomen (P/L = 1:12000 ( $n/n$ )). 122

Abbildung 4-31: Grafische Auftragung der prozentualen Inhibition des Kanals gegen die Konzentration an 2GBI. 123

Abbildung 4-32: Schematische Darstellung des Aufbaus einer *tethered bilayer lipid membrane* (tBLM) zur impedanzspektroskopischen Charakterisierung des  $H_V1$ -Kanals. 125

Abbildung 4-33: Bode-Diagramm (A) und Cole-Cole Auftragung (B) einer WK3SH/6MH-Monoschicht (1:4 ( $n/n$ ), SAM, orange) sowie der darauf gebildeten  $H_V1$ -haltigen Lipiddoppelschicht (tBLM, grau). 126

Abbildung 4-34: Cole-Cole-Auftragung der spannungsabhängigen impedanzspektroskopischen Charakterisierung der SAM (A) und des  $H_V1$ -Protonenkanals einer POPC/POPG/Chol (55:25:20) Lipidmembran (B). 128

Abbildung 4-35: Getrennte Auftragung der normierten kapazitiven und resistiven Anteile der Impedanzspektren der  $H_V1$ -tBLM aus Abbildung 4-34 gegen die Frequenz. 130

Abbildung 4-36: Auftragung der gemittelten minimalen ( $C_{Min}$ ) und maximalen Kapazitäten ( $C_{Max}$ ) der  $H_V1$ -tBLM in Abhängigkeit des angelegten Membranpotentials. 131

Abbildung 4-37: Cole-Cole Auftragung des WK3SH/6MH-SAM (70:30 ( $n/n$ ), orange) der SEIRA Präparation, sowie das Spektrum nach dem Spreiten der  $H_V1$ -Proteoliposomen (grau). 132

Abbildung 4-38: SEIRA-Differenzspektren, unter Nutzung des SAM-Spektrums als Referenz, nach Adsorption der Proteoliposomen der Lipidzusammensetzung POPC/POPG/Chol (55:25:20, P/L = 1:17300 ( $n/n$ ), schwarz) auf der SAM-Oberfläche und nach dem erneuten Spülen der Membran mit Puffer (rot). Die Banden im Bereich von 2900–3000  $cm^{-1}$  sind charakteristisch für C-H-Schwingungen und werden den Lipiden der Doppelschicht zugeordnet. Die Bande bei 1737  $cm^{-1}$  ist der C=O-Steckschwingung der Lipide zuzuordnen. Der Intensitätsanstieg der Lipidschicht zugehörigen Banden nach dem Spülen deutet auf ein zusätzliches Spreiten von Vesikeln hin. Dieses geht mit einer Verdrängung von Wasser einher und spiegelt sich in einer negativen OH-Bande bei etwa 3500  $cm^{-1}$  wider. Die positiven Banden bei 1657  $cm^{-1}$  und 1552  $cm^{-1}$  sind charakteristisch für die Amid-I und Amid-II Banden  $\alpha$ -helikaler Strukturelementen von Proteinen in  $H_2O$ .<sup>[185,186]</sup> Da die breite negative Bande der  $H_2O$ -Biegeschwingung in diesem Bereich überlagert, sind die Intensitäten der Amid-I und Amid-II-Banden nach dem Spülen reduziert. Pufferzusammensetzung: 20 mM HEPES; 100 mM  $Na_2SO_4$ , pH 4. 133

Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der Vesikel-Solubilisierung. (I) Zu Beginn liegen reine Vesikel vor. Mit steigender Detergenkonzentration inserieren zunehmend mehr Detergenmoleküle (blau). Die Sättigung ist am Übergang zu Phase II erreicht. (II) In dieser Phase liegen gesättigte Liposomen und gemischte Lipid-Detergen-Mizellen vor. Die Trübung nimmt auf Grund der beginnenden Solubilisierung ab. (III) Die Solubilisierung ist vollständig wenn nur noch gemischte Mizellen vorliegen. Zu diesem Zeitpunkt erreicht die Trübung ihr Minimum. Bei der Bildung von Proteoliposomen wird das System um eine



weitere Komponente, dem Protein, ergänzt. Der Ablauf ist jedoch äquivalent.<sup>[221]</sup> Abbildung erstellt nach Rigaud *et al.*<sup>[129]</sup> 149

Abbildung 5-2: Flächenanteil der äußeren Monoschicht an der Gesamtoberfläche der Lipidoberfläche eines kugelförmigen Vesikels in Abhängigkeit des Durchmessers. 155

Abbildung 5-3: Auftragung des Betrags der Potentialdifferenzen über die Vesikelmembran gegen die Anzahl der transportierten Ionen X. 157

Abbildung 8-1: Das Fusionsprotein kodierende Nukleinsäuresequenz. 197

Abbildung 8-2: Aminosäuresequenz des H<sub>V</sub>1-Fusionsproteins. 198

## 8.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme und deren Genotypen. 23

Tabelle 3-2: Zusammensetzung der Puffer der Plasmidisolierung.<sup>[110]</sup> 24

Tabelle 3-3: Verwendete Typ II Restriktionsendonukleasen und deren Spezifikation. 25

Tabelle 3-4: Allgemeines Pipettierschema der Proben der Agarose-Gelelektrophorese. 27

Tabelle 3-5: Zusammensetzung der Puffer zur Isolation von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel. 28

Tabelle 3-6: Pipettierschema der Ligationsansätze mit unterschiedlichen Vektor-zu-Insert-Verhältnissen. 29

Tabelle 3-7: Sequenz der für die DNA-Sequenzierung verwendeten Primer. 30

Tabelle 3-8: Zusammensetzung der Puffer der Expression und Zellyse. 32

Tabelle 3-9: Pipettierschema des Detergens *Screenings*. 34

Tabelle 3-10: Zusammensetzung des Elutionspuffers. 35

Tabelle 3-11: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels nach Schägger. 37

Tabelle 3-12: Zusammensetzung der, bei der SDS-PAGE nach Schägger, verwendeten Puffer: 38

Tabelle 3-13: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen der Western Blot Analyse. 41

Tabelle 3-14: Zusammensetzung des Dialysepuffers. 42

Tabelle 3-15: Parameter der CD-spektroskopischen Messungen des Proteins H<sub>V</sub>1. 47

Tabelle 3-16: Zusammensetzung der Lipidfilme der H<sub>V</sub>1 Rekonstitution. 52

Tabelle 3-17: Zusammensetzung der Lipidfilme, welche den Lipid gebundenen Fluorophor Oregon Green® 488 enthielten. 53

Tabelle 3-18: Zusammensetzung des Vesikelpuffer. 55

Tabelle 3-19: Zusammensetzung des Fluxpuffer und der Stammlösungen des Protonenfluss-Test. 60

Tabelle 3-20: pK<sub>s</sub>-Werte des freien und lipidgebundenen Fluorophore FITC und OG488.<sup>[135]</sup> 61

Tabelle 3-21: Zusammensetzung des Messpuffer der impedanzspektroskopischen Untersuchungen des rekombinanten H<sub>V</sub>1-Kanals. 65

## Anhang

Tabelle 3-22: Parameter der Impedanzspektroskopie.	75
Tabelle 4-1: Ergebnisse der exponentiellen Anpassung der in Abbildung 4-26 dargestellten Graphen.	116
Tabelle 4-2: Parameter und berechnete Dissoziationskonstante der Inhibition des H <sub>v</sub> 1-Kanals durch 2GBI.	123
Tabelle 4-3: Gemittelte Ergebnisse und Fehler der nicht-linearen Anpassung (im Bereich 0.8-2·10 <sup>4</sup> Hz) der Impedanzspektren mittels $R(RC)(RCPE)$ -Ersatzschaltbild (siehe Abb. 4-29).	127
Tabelle 5-1: Parameter zur Beschreibung der Solubilisierungseigenschaften des Detergens DM.	150
Tabelle 8-1: Berechnete Parameter zur Bestimmung der Anzahl an H <sub>v</sub> 1 Kanälen pro Proteoliposom bei einer Rekonstitution von 1:17300 ( $n/n$ ).	200

## 8.7 Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

2GBI	2-Guanidinobenzimidazol
A	Absorption
a	Auslenkung
Abb.	Abbildung
ACMA	9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridine
AEA	N-Arachidonylethanolamid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
c	Konzentration
C	Celsius
CCCP	Carbonylcyanidchlorophenylhydrazon
CD	Circulardichroismus
cDNA	komplementäre DNA
Chol	Cholesterol

C <sub>i</sub> -VSP	engl. <i>voltage-sensing phosphatase</i> aus <i>Ciona intestinalis</i>
CMC	Kritische Mizellbildungskonzentration (engl. <i>critical micelle concentration</i> )
d	Durchmesser
DDM	n-Dodecyl-β-D-Maltosid
DHPE	1,2-Dihexadecyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DLS	dynamische Lichtstreuung
DOPG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
DTT	Dithiothreitol
DM	n-Decyl-β-D-Maltopyranosid
ε	Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F <sub>i</sub>	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluorescein
F <sub>max</sub>	maximale Fluoreszenzintensität
F <sub>min</sub>	minimale Fluoreszenzintensität
f	Resonanzfrequenz
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GUV	riesige unilamellare Vesikel (engl. <i>giant unilamellar vesicles</i> )
Hz	Hertz
h	Planck'sches Wirkungsquantum
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His <sub>6</sub>	sechsfacher Histidinrest

## Anhang

Hv1	Spannungsgesteuerter Protonenkanal 1( <i>engl. voltage-gated proton channel 1</i> )
I	Intensität
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ISC	intersystem crossing
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
L	Liter
$\lambda$	Wellenlänge
LB	<i>engl. lysogeny both</i>
LUV	große unilamellare Vesikel ( <i>engl. large unilamellar vesicles</i> )
M	Molare Masse
m	Molar
m	Milli, Meter
m	Masse
min	Minute
$\mu$	Mikro
mVSOP	<i>engl. mouse voltage-sensor domain-only protein</i>
MW	Molekulargewicht
n	Nano
n/n	Stoffmengen zu Stoffmengen Verhältnis
NaCl	Natriumchlorid
NOX	NADPH-Oxidase
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte

OG488	Oregon Green 488
PAGE	Polyarcylamid-Gelelektrophorese
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPS	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SB-12	n-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propan-sulfonat
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SOC	engl. <i>super optimal broth</i>
SR	Strahlungslose Relaxation
SSM	festkörperunterstützte Membran (engl. <i>solid supported membrane</i> )
SUV	kleine unilamellare Vesikel (engl. <i>small unilamellar vesicle</i> )
$\theta$	Elliptizität
$\Theta$	Phasenwinkel Theta
t	Zeit
T	Temperatur
$T_m$	Hauptphasenumwandlungstemperatur
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v	Frequenz / Schwingungszustand
V	Volumen
VIS	sichtbar (engl. <i>visible</i> )

## Anhang

VSD	Spannungssensitive Domäne ( <i>engl. voltage sensing domain</i> )
v/v	Volumen zu Volumen Verhältnis
WT	Wildtyp
w/v	Masse zu Volumen Verhältnis
w/w	Masse zu Masse Verhältnis
WW	Wechselwirkung

## 8.8 Chemikalien, Bakterienstämme und Enzyme

2-Guanidinbenzimidazol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
6-Mercaptohexanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
ACMA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Acrylamid/Bisacrylamid-Mix Rotiphorese	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Agar	Merck (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
BL21(DE3) One Shot cells	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
BL21(DE3)pLysS One shot cells	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
BL21 Gen-X™ cells	Genlantis (San Diego)
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Carbonylcyanidchlorophenylhydrazon	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Cholesterin	
Chloroform abs.	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Chlorwasserstoff konz.	Merck (Darmstadt)
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor	Hoffmann La Roche (Grenzach-Whylen)

cocktail	
Coomassie Brilliant Blue G-250	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Cumarinsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DNase1	AppliChem (Darmstadt)
DTT	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Eisessig	Fischer Scientific
Entwickler-Lösung	Developer CBX, Carestream (New York)
Ethanol abs.	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Fast Digest HindIII	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
Fast Digest XhoI	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
Fixier-Lösung	Developer CBX, Carestream (New York)
GelRed™	Biotium (Fremont)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Goat anti-mouse Antibody	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas)
Größenstandard	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
HEPES	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Imidazol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
IPTG	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

## Anhang

Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Luminol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Lysozym	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Magermilch	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid·Hexahydrat	Merck (Darmstadt)
Methanol abs.	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Mucosol	Merck (Darmstadt)
N-Arachidonylethanolamid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
n-Decyl- $\beta$ -D-Maltopyranosid	Calbiochem (Darmstadt)
n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumazid	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen (Hilden)
Nycodenz	
Oregon Green 488 1,2-Dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin	Thermo Fisher Scientific (Waltham)
Penta-His Antibody, BSA free	Qiagen (Hilden)
pET-28b(+)	Novagen (Darmstadt)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
POPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster)
POPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster)
POPS	Avanti Polar Lipids (Alabaster)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
SB-12	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)



SDS	Applichem (Darmstadt)
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
TEMED	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tricin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
TRIS	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Trypton	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tween-20	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Valinomycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

## 8.9 Materialien

Braungläschen	OCHS GmbH (Göttingen)
Dialyseschläuche Visking	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Dünnschichtküvette	106-QS, Helma Analytics (Müllheim)
Reaktionsgefäße unsteril	Sarstedt (Nürnberg)
Reaktionsgefäße steril	Eppendorf Biopur (Hamburg)
Eppendorfpipetten	Eppendorf (Hamburg)
Mämazytometerplättchen	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Küvetten	Sarstedt (Nürnberg)
Mikroliterspritze	Hamilton (Höchst)
Nitrocellulosemembran	Biorad (Hercules)
O-Ring	Kalrez®, DuPont™ (Newark)
Parafilm	Pechiney Plastik Packaging (Chicago)
Petrischalen	OCHS GmbH (Göttingen)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nürnberg)

## Anhang

Quarzküvette	119 F-QS, Helma Analytics (Müllheim)
Reagenzgläschen	VWR International (Darmstadt)
Röntgenfilm	BioMax XAR, Carestream (New York)
Zentrifugalkonzentrator	Vivapsin 500; Sartorius AG (Göttingen)
Whatman Filterpapier	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

## 8.10 Geräte- und Softwareverzeichnis

Agarose-Gelelektrophoreseapparatur	Sub-Cell GT, Bio-Rad (Hercules)
Autoklav	
CD-Spektrometer	J-1500 CD Spectrometer, Jasco (Easton)
Feinwaage	CP55D, Sartorius (Göttingen)
Frequenzganganalysator	SI 1260, Solatron Analytical (Hampshire)
FT-IR-Spektrometer	IFS 66v/S; Bruker Tensor 27; Bruker
Hochdruckhomogenisator	LM10 Microfluidizer™, Microfluidics™ (Westwood)
Hochvakuum Bedampfungsanlage	Med 020, BAL-TEC (Liechtenstein)
Magnetrührer	MR 3001 K, Heidolph (Schwabach)
Minizentrifuge	Galaxy mini, VWR International (Darmstadt)
Netzgerät für Agarose-Gelelektrophorese	Bio-Rad PowerPac 1000, Bio-Rad (Hercules)
Netzgerät für SDS-Gelelektrophorese	Bio-Rad PowerPac 200, Bio-Rad (Hercules)
pH-Meter	Calimatic 766, Knick (Berlin)
Plasmareiniger	Zepto, Diener electronic GmbH + Co. KG (Elbhausen)
Potentiostat	SI 1287, Solatron Analytical (Hampshire)
Reinstwasseranlage	Milli-Q Gradient A 10, Millipore (Eschborn)

		Milli-Q Elix 5; Millipore (Eschborn)
SDS-Gelelektrophoreseapparatur		PerfectBlue Twin S, Peqlab (Erlangen)
Schüttler und Inkubatorhaube		SM30 & TM30, Edmund Bühler GmbH, (Tübingen)
Schüttelinkubator		Innova® 44, New Brunswick Scientific (Enfield)
Schüttler Rex Top		Heidolph (Schwabach)
Spektrophotometer/ Fluorimeter		Spectrofluorometer FP-6500, Jasco (Easton)
Thermoschüttler		Thermomixer compact, Eppendorf (Hamburg)
Tischautoklav		2540 EL, Tuttnauer (New York)
Tischzentrifuge		Heraeus Fresco 17, Thermo Scientific (Darmstadt )
Tischzentrifuge		C5415D, Eppendorf, (Hamburg)
Ultraschallbad		Sonorex RK 255 H, Bandelin (Berlin)
Ultraschall-Homogenisator mit Sonotrode MS 73		Sonopuls HD2070, Bandelin (Berlin)
Ultraschall-Homogenisator Becherresonator BR30	mit	Sonopuls HD2070, Bandelin (Berlin)
Ultrazentrifuge		Centricon T-1065; Kontron (Eching)
UV/vis-Spektrometer		V-650 Spectrophotometer, Jasco (Easton)
UV/vis-Spektrometer		NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific (Waltham)
Vakuumtrockenschrank		VD 23, Binder GmbH (Tuttlingen)
Vortexer		Heidolph (Schwabach)
Wasserbad E38		Dinkelberg Labortechnik (Neu-Ulm)
Western-Blot Semidry Apparatur		Transblot SD Semi Dry Tranfer Cell, Bio-Rad (Hercules)
Wippschüttler		CAT ST5, Zipperer GmbH (Staufen)
Zetasizer Nano S		Mavern (Herrenberg)
Zentrifuge		Allegra™ X-22R, Rotor SX4250, Beckman Coulter

## Anhang

(Krefeld)

Zentrifuge

3K30; Rotor 19776-H, Sigma (Osterode)

### Software:

MatLab R2016b

MathWorks (Natick)

Origin Pro8.5G

OriginLab Corporation (Northampton)

Z-Plot 3.5a

Solatron Analytical (Hampshire)

Z-View 3.5a

Solatron Analytical (Hampshire)

# Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Claudia Steinem für das entgegengebrachte Vertrauen und die Bereitstellung eines vielschichtigen und interessanten Themas sowie die sehr gute wissenschaftliche Betreuung und wertvollen Anregungen bedanken.

Prof. Dr. Michael Meinecke danke ich für die Übernahme des Korreferates und die Unterstützung bei der Proteinaufreinigung sowie die wissenschaftliche Begleitung meiner Arbeit.

Prof. Dr. Peter Hildebrandt, Dr. Jacek Kozuch und Enrico Forbrig von der TU Berlin gilt mein Dank für die Bereitstellung des WK3SH, sowie die Durchführung der SEIRA-Studien und der guten Kooperation, ebenso wie die herzliche Gastfreundschaft.

Mein Dank gilt Ingo für die Hilfe bei dem MATLAB-Skript und vorallem für die Gespräche untern Vätern.

Jutta danke ich für ihre andauernde, zuverlässige Arbeit und Unterstützung bei der Praktikumsvorbereitung sowie die unermüdliche Bemühung um Ordnung und Sauberkeit im Labor.

Ich danke den vier Engeln des Sekretariats: Marianne, Melanie, Dana und Tabea für all die lieben Tipps, Hilfen und die zahlreichen süßen Versuchungen in Form von Fruchtgummis und Kuchen. Ihr habt mir so manchen Tag versüßt!

Mein Dank gilt Markus, Jonas, Stefan, Philipp, Corinna, Miri und Johannes für die schnelle und gründliche Korrektur.

Mein Dank gilt ebenfalls Gregor, Rebecca und Kristina für all die Unterstützung meiner Arbeit. Ebenso bin ich Jonas und Andrea zu dank verpflichtet, die tolle AFM Aufnahmen des Ezrins gemacht haben.

Ein großes Dankeschön möchte ich an den gesamten Arbeitskreis richten. Ich wurde hier herzlichst aufgenommen und hatte über all die Jahre viel Spaß an all dem was den AK ausmacht. Mit euch feiern und arbeiten zu dürfen ist ein Glückslos, dass ich ziehen durfte. Es gibt daher einige Momente die ich sicher nie vergessen werde. Danke dass ich euch so lange begrillen durfte. Vielen vielen Dank.

Ich danke ebenso allen Freunden, egal ob Chemiker oder Nicht-Chemiker, die ich in der Zeit in Göttingen gefunden habe für die unvergessliche Zeit. Dank euch wurden auch die Hürden des Alltags erträglicher und schnell vergessen. Danke für den gemeinsamen Urlaub am Meer und die zahllosen Grillabende. Besonderer Dank gilt hierbei Vanessa

für die wundervolle WG-Zeit in der Bertheustraße. Arne du warst auch in den schwierigsten Zeiten immer für mich da, dafür danke ich dir sehr.

Von Herzen danke ich meinen Eltern, Geschwistern und Großeltern, dass ihr mir das alles ermöglicht habt, mich unterstützt und begleitet habt. Ihr seid wundervoll, bitte bleibt so.

Julia bei dir kann ich mich gar nicht genug bedanken. Du hast mich über die gesamte Zeit der Promotion begleitet und motiviert. Du hast mir zwei zauberhafte Töchter geschenkt und du hast mich geheiratet. Meinem Leben würden ohne euch so viele schöne Augenblicke und Erinnerungen fehlen. Ich danke euch dafür und freue mich auf unsere gemeinsame, aufregende Zukunft.

# Lebenslauf

## | Persönliche Daten

Name: Benjamin Gerdes

Geburtsdatum: 19.10.1985

Geburtsort: Bremervörde, Deutschland

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet, zwei Töchter (Pia \*29.11.2015 und Nele \*29.04.2017 )

## | Studium

- 06|2013 – 12|2017 **Promotionsstudium** *Georg-August-Universität, Göttingen*  
Georg-August University School of Science (GAUSS)  
Institut für Organische und Biomolekulare Chemie (Prof. Dr. C. Steinem)  
Titel der Dissertation: *Expression und Isolation eines spannungs-gesteuerten Kanals und Rekonstitution in künstliche Membranen*
- 10|2010 – 05|2013 **Masterstudium der Chemie** *Georg-August-Universität, Göttingen*  
Master of Science, Note 1.6  
Titel der Masterarbeit: *Rasterkraftmikroskopische Charakterisierung von Ezrin auf festkörperunterstützten Membranen*
- 10|2011 – 02|2012 **Erasmus Aufenthalt** *Rijksuniversiteit Groningen, Niederlande*  
Forschungsprojekt: Synthese von 5-Hydroxynorvalin
- 10|2006 – 10|2010 **Bachelorstudium der Chemie** *Georg-August-Universität, Göttingen*  
Bachelor of Science, Note 2.4  
Titel der Bachelorarbeit: *Integration von Connexin und Pannexin in künstliche Membransysteme*

## | Schul- und Ausbildung

09|2005 – 05|2006 **Zivildienst** *Samtgemeinde Bad Bederkesa*  
Integrativer Kindergarten “Beerster Kinnerhus“

09|1998 – 06|2005 **Allgemeine Hochschulreife** *Niedersächsisches Internatsgymnasium, Bad Bederkesa*  
Abitur, Note: 2.3

## | Veröffentlichungen

2016 V. Shabardina, C. Kramer, B. Gerdes, J. Braunger, A. Cordes, J. Schäfer, I. Mey, D. Grill, V. Gerke, C. Steinem, Mode of ezrin-membrane interaction as a function of PIP<sub>2</sub> binding and pseudophosphorylation, *Biophys. J.*, Vol 110, 12, 2016.

## | Tagungsbeiträge

2016 **International Workshop “Proton and Proton-coupled Transport”, Berlin**  
Posterpräsentation: *Recombinant isolation and characterization of the human voltage-gated proton channel hHv1.*

2015 **10 th European Biophysics Congress, Dresden**  
Posterpräsentation: *Isolation, reconstitution and characterization of the human voltage-gated proton channel hHv1.*

2014 **Annual Meeting der DGfB, Lübeck**  
Posterpräsentation: *Expression, isolation and reconstitution of the human voltage-gated proton channel hHv1.*