

Evolutionäre Entwicklung von Proteinkanälen von Translokationsapparaten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Rolf Bredemeier
aus Oldenburg (Oldb)

Frankfurt am Main, 2008

D30

vom Fachbereich Biowissenschaften der Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Volker Müller

Gutachter: Prof. Dr. Enrico Schleiff

Gutachter: Prof. Dr. Eckhard Boles

Datum der Disputation: 31.10.2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Einheiten	VII
Zusammenfassung	VIII
Abstract	IX
1. Einleitung.....	1
1.1 Membranen und Membranproteine.....	1
1.2 β -Barrel-Proteine.....	1
1.3 Die Proteine der Omp85-Familie.....	3
1.3.1 Die prokaryotischen Omp85-Proteine.....	5
1.3.2 Die eukaryotischen Omp85-Proteine.....	6
1.4 Elektrophysiologie.....	8
1.5 Ziel der Arbeit.....	10
2. Material und Methoden.....	11
2.1 Material.....	11
2.1.1 Chemikalien.....	11
2.1.2 Enzyme und Kits.....	11
2.1.3 Stämme und Vektoren.....	11
2.1.4 Verwendete Konstrukte.....	11
2.1.5 Kulturmedien.....	11
2.1.6 Membranen.....	12
2.1.7 Antikörper.....	12
2.1.8 Säulen und Säulenmaterial.....	12
2.1.9 Lipide und Detergentien.....	13
2.1.10 Aufbau des Elektrophysiologischen Messstandes.....	13
2.1.10.1 Käfiggerüst.....	13
2.1.10.2 Messtischgerüst.....	13
2.1.10.3 Käfiggitter.....	15
2.1.10.4 Käfigtüren.....	15
2.1.10.5 Tischplatten.....	17
2.1.10.6 Messkammertisch.....	18
2.1.10.7 Stereomikroskophalterung.....	20
2.1.10.8 Messtischträger und Reiter.....	21
2.1.10.9 Perfusion.....	22

Inhaltsverzeichnis

2.1.10.10	Halterung Lichtwellenleiter und Halterung Headstage.....	25
2.1.10.11	Headstage.....	28
2.1.10.12	Messkammer.....	30
2.1.10.13	Erdungsblock und Erdung.....	31
2.1.10.14	Werkzeug.....	31
2.1.10.15	Geräteeinstellungen.....	32
2.1.10.16	Softwareeinstellungen.....	32
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.1.1	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	33
2.2.1.2	Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	33
2.2.1.3	Hitzeschocktransformation.....	33
2.2.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini-Prep).....	33
2.2.2	Biochemische Methoden.....	34
2.2.2.1	Überexpression rekombinanter Proteine.....	34
2.2.2.2	Aufreinigung von Hexahistidin-Fusionsproteinen über Ni-NTA.....	34
2.2.2.3	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	35
2.2.2.4	SDS-PAGE.....	35
2.2.2.5	Western-Blot.....	35
2.2.2.6	Rekonstitution von Kanalproteinen in Proteoliposomen.....	35
2.2.3	Elektrophysiologische Methoden.....	36
2.2.3.1	Herstellung und Chlorierung der Messelektroden.....	36
2.2.3.2	Herstellung der Salzbrücke.....	36
2.2.3.3	Herstellung der Lipidlösung.....	36
2.2.3.4	Zusammenbau der Messkammer.....	36
2.2.3.5	Versuchsvorbereitung.....	37
2.2.3.6	Leitwertmessungen.....	38
2.2.3.6.1	Protokoll zur Bestimmung des Leitwerts und des Schaltverhaltens.....	38
2.2.3.7	Spannungsrampen.....	38
2.2.3.7.1	Protokoll zur Bestimmung des Umkehrpotentials.....	39
2.2.3.8	Datenanalyse.....	39
2.2.3.8.1	Berechnung des Kanaldurchmessers.....	40
2.2.3.8.2	Berechnung der Ionenselektivität.....	40
2.2.3.8.3	Ermittlung von Unterleitwerten.....	40

Inhaltsverzeichnis

2.2.3.8.4	Ermittlung von Schaltfrequenzen.....	41
3.	Ergebnisse.....	42
3.1	Montage des Elektrophysiologischen Messstandes.....	42
3.1.1	Komponenten des Elektrophysiologischen Messstandes.....	43
3.1.2	Verbindungen der Messstandkomponenten.....	45
3.1.3	Inbetriebnahme des Elektrophysiologischen Messstandes.....	45
3.2	Überexpression und Aufreinigung der verwendeten rekombinanten Proteine.....	46
3.3	Vertreter der Omp85-Familie in <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.....	48
3.3.1	Alr2269, das cyanobakterielle Omp85-Protein mit der nächsten Verwandtschaft zum Proteinimportkanal der Chloroplasten.....	48
3.3.2	Der distale C-Terminus von Omp85 als evolutionäre Keimzelle?.....	53
3.3.3	Charakterisierung der Omp85-Proteine Alr0075 und Alr4893.....	55
3.3.3.1	Alr0075.....	55
3.3.3.2	Alr4893.....	56
3.4	psToc75, der Translokationskanal der äußeren Chloroplasten-Hüllmembran von <i>Pisum sativum</i>	57
3.5	YaeT, das Omp85-Protein des Proteinintegrationskomplexes der äußeren Membran von <i>Escherichia coli</i>	62
3.6	Das mitochondrielle Omp85-Protein dmSam50 von <i>Drosophila melanogaster</i> ...	64
4.	Diskussion.....	67
4.1	Zusammenhang zwischen der Phylogenie der Omp85-Familie und ihren elektrophysiologischen Eigenschaften.....	67
4.2	Einfluss der N-terminalen Domäne auf die Funktion und Eigenschaften der Proteine der Omp85-Familie.....	69
4.3	Funktion der Omp85-Proteine von <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.....	71
4.4	Die evolutionäre Entwicklung der Proteine der Omp85-Familie.....	72
5.	Schlussfolgerung und Ausblick.....	75
6.	Literaturverzeichnis.....	80
	Abbildungsverzeichnis.....	88
	Tabellenverzeichnis.....	89
	Eigene Veröffentlichungen.....	90
	Danksagung.....	91
	Erklärung.....	92
	Lebenslauf.....	93

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure (amino acid)
Abb.	Abbildung
Alu	Aluminium
Amp.	Ampicillin
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CMC	kritische Mizellarkonzentration
Coomassie	Coomassie-Brilliant-Blau R-250
d	Durchmesser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DIN	Norm des Deutschen Instituts für Normung
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung
His ₆	Hexahistidin
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ISO	Norm der Internationalen Organisation für Normung
Kap.	Kapitel
LPS	Lipopolysaccharid
M	Metrisches ISO-Gewinde
Mega-9	N-nonanoyl-N-methylglucamid
MeOH	Methanol
MOPS	3-N-(Morpholino)propansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
N _{2,liq.}	flüssiger Stickstoff
NaP _i	Natrium-Phosphatpuffer
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure (nitrilotriacetic acid)
Omp	Protein der äußeren Hüllmembran (outer membrane protein)
P _x	Permeabilität des Ions x
p.a.	pro analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
POM	Polyoxymethylen
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
Sam	Sortierungs- und Assemblierungsmaschinerie der äußeren Mitochondrienmembran
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
t	Zeit
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
Teflon	Polytetrafluorethylen
Tic	Translocon der inneren Hüllmembran von Chloroplasten
Toc	Translocon der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Methylglycin
Triton X-100	<i>p</i> -Isooctylphenoxy-polyethoxyethanol

Einheiten

U_{com}	Kommandopotential
U_{rev}	Umkehrpotential
vgl.	vergleiche
(v/v)	Volumen / Volumen
(w/v)	Gewicht / Volumen
\emptyset	Durchmesser

Einheiten

A	Ampere
Å	Ångström ($1\text{Å} = 1 \cdot 10^{-10} \text{ m}$)
C	Celsius
Da	Dalton ($1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$)
g	Gramm
h	Stunde
Hz	Hertz
l	Liter
m	Meter
M	mol/l
min	Minute
mol	Mol
OD_x	optische Dichte bei der Wellenlänge x (in nm)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration (potentia hydrogenii)
psi	Druck (pound per square inch; $1 \text{ psi} = 6894,76 \text{ Pa}$)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
s	Sekunde
S	Siemens
V	Volt

Zusammenfassung

β -Barrel-Membranproteine der Omp85-Familie besitzen essentielle Funktionen in der Lipidbiogenese und der Proteinintegration und -assemblierung in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien. Auch in endosymbiotisch erworbenen Organellen der Eukaryoten übernahmen Vertreter dieser Proteinfamilie wichtige Rollen, wie bei der Translokation von Vorstufenproteinen durch die äußere Hüllmembran von Chloroplasten und der Assemblierung von Proteinkomplexen in der äußeren Hüllmembran von Mitochondrien. Eine phylogenetische Analyse der bekannten Vertreter dieser Proteinfamilie wies auf eine Aufspaltung der Omp85-Familie in zwei Hauptzweige hin. Während der Toc75-Zweig aus plastidären und cyanobakteriellen Omp85-Proteinen besteht, bilden mitochondrielle Proteine sowie die Omp85-Vertreter der Proteobakterien eine zweite Unterfamilie, den Sam50-Zweig. In dieser Arbeit wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften von pro- und eukaryotischen Vertretern beider Unterfamilien verglichen. Zu diesem Zweck wurde ein elektrophysiologischer Messstand konstruiert, mit dem diese Kanalproteine mittels der Lipid-Bilayer-Technik untersucht werden konnten.

Die Analyse der experimentellen Daten der verwendeten Omp85-Proteine zeigte deutliche Gemeinsamkeiten der gesamten Proteinfamilie hinsichtlich ihrer Kationenselektivität. Hingegen ergab ein Vergleich der Kanalleitwerte signifikante Unterschiede zwischen beiden Unterfamilien. So lagen die aus den Leitwerten berechneten Porendurchmesser bei den Mitgliedern des Toc75-Zweigs um das Zwei- bis Dreifache über den für die Vertreter des Sam50-Zweigs bestimmten Werten.

Topologievorhersagen ergaben, dass die Mitglieder der Omp85-Familie aus zwei Domänen aufgebaut sind. Durch die Analyse der elektrophysiologischen Eigenschaften von Teilkonstrukten, die aufgrund dieser Vorhersagen erstellt wurden, konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Domäne die Porenregion des β -Barrel-Proteins bildet. Die elektrophysiologischen Eigenschaften der Omp85-Proteine werden allerdings durch die N-terminale Domäne moduliert.

Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten elektrophysiologischen Ergebnisse und unter Berücksichtigung der phylogenetischen Analyse der Omp85-Familie konnte eine Hypothese zur evolutionären Entwicklung dieser sehr alten Proteinfamilie aufgestellt werden.

Abstract

β -barrel channels of the Omp85 family are essential elements in membrane biogenesis and in the integration and assembly of outer membrane protein complexes of Gram-negative bacteria. Members of this protein family also have important functions in endosymbiotically derived eukaryotic organelles, e.g. in the preprotein translocation across the outer membrane of chloroplasts or in protein complex assembly of the mitochondrial outer membrane. A phylogenetic analysis of the known Omp85 family members displayed a branching into two distinct groups. While the Toc75 branch comprises plastidary and cyanobacterial members, the Sam50 branch contains mitochondrial as well as proteobacterial Omp85 proteins.

Here, the electrophysiological properties of selected prokaryotic and eukaryotic members of both branches of the Omp85 family were determined and compared to each other. For these purposes an electrophysiological measuring stand for the lipid bilayer technique has first been constructed.

Analysis of the data derived from the electrophysiological experiments showed that all investigated members of the Omp85 family possess cation-specific selectivities. The main channel conductance however differed strongly between the two sub-branches of this protein family. A comparison of the pore diameters that were calculated from the conductance values showed that proteins of the Toc75 branch have a diameter about two to three times bigger than those of the Sam50 branch.

Topology prediction of the Omp85 proteins yielded a common domain structure within this protein class. Therefore, partial constructs comprising the predicted single domains were analyzed in this work. The obtained electrophysiological results revealed for the first time that the C-terminal domain of the Omp85 protein indeed forms the β -barrel pore while the N-terminal domain modulates its electrophysiological properties.

Based on these electrophysiological results and considering the phylogenetic analysis of the Omp85 protein family, a hypothesis on the evolutionary development of this ancient protein class is presented.

1. Einleitung

1.1 Membranen und Membranproteine

Membranen sind für lebende Organismen essentiell. Sie grenzen Zellen von ihrer Umgebung ab und schaffen Kompartimente in ihrem Inneren. So ermöglichen sie die Aufrechterhaltung spezifischer physikochemischer Bedingungen. Biologische Membranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht. Die Acylketten der Phospholipide bilden die ca. 30 Å dicke, hydrophobe Kernregion der Membran, ihre polaren Kopfgruppen bilden Membran/Wasser-Grenzflächen. Die Membran stellt ein komplexes, heterogenes Milieu dar [1]. Das von Singer & Nicolson vorgeschlagene Fluid-Mosaik-Modell beschreibt Membranen als zweidimensionale viskose Flüssigkeiten, in denen Membranproteine in der Membranebene frei diffundieren können [2]. In der heutigen Vorstellung der Membranstruktur sind verschiedene Lipidspezies nicht nur asymmetrisch über die cyto- und exoplasmatische Lipidschicht der Membran verteilt, sondern ebenso auf lateraler Ebene organisiert. So entstehen Membranregionen variabler Zusammensetzung und Dicke, sog. Mikrodomänen oder „Lipid Rafts“ [3].

Membranproteine spielen eine essentielle Rolle in vielen zellulären Prozessen. So werden durch sie so unterschiedliche Vorgänge, wie z. B. gerichteter Stofftransport, Signalaustausch, Zell-Zell-Erkennung oder Energiegewinnung, ermöglicht. Man unterscheidet zwischen peripheren und integralen Membranproteinen, welche also entweder mit der Membran assoziiert oder in sie eingebettet sind. Bioinformatische Analysen von pro- und eukaryotischen Genomen zeigten, dass zwischen 20 und 30 % aller bekannten Gene für integrale Membranproteine codieren [4, 5]. Membranproteine sind auf zwei Bauprinzipien beschränkt: α -Helixbündel und β -Barrel.

1.2 β -Barrel-Proteine

Während α -helikale Membranproteine mit Ausnahme der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien in allen zellulären Membranen vorkommen, findet man Proteine des β -Barrel-Typs ausschließlich in der äußeren Membran von Doppelmembransystemen, welche bei Gram-negativen Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten zu finden sind [6]. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf ein peroxisomales β -Barrel-Protein [7, 8]. Dies ist ungewöhnlich, da Peroxisomen lediglich von einem einzelnen Membransystem umschlossen sind. Es wurde daher diskutiert, ob diese Tatsache auf einen endosymbiotischen Ursprung der Peroxisomen oder auf eine genetische Redistribution innerhalb der Zelle, resultierend aus Gentransfers aus den endosymbiotisch erworbenen Mitochondrien und Plastiden in den Zellkern,

1. Einleitung

zurückzuführen ist [9, 10]. Eine Analyse des peroxisomalen Proteoms zeigte jedoch, dass Peroxisomen ihren Ursprung im Endoplasmatischen Reticulum (ER) haben, also nicht durch Endosymbiose entstanden sind [11]. Beobachtungen, dass sich Peroxisomen aus dem ER bilden [12], sowie Untersuchungen an Peroxisomen-freien Mutanten, die nach Komplementation durch das Wildtyp-Gen in der Lage waren, Peroxisomen *de novo* zu bilden [13], untermauern diese Ergebnisse.

β -Barrel-Proteine weisen eine große Bandbreite an Funktionen auf [14]. So finden sich unter den Vertretern dieses Proteintyps Strukturproteine wie OmpA, Porine wie z.B. OmpC, OmpF und PhoE und Abwehrproteine wie OmpX. Daneben finden sich Enzyme wie die Phospholipase OMPLA oder die Protease OmpT. Auch Transportprozesse werden von β -Barrel-Proteinen übernommen, es finden sich dabei sowohl passive Transporterproteine wie LamB, das Sucrose Binding Protein (SBP) und FadL, als auch aktive Transporter von Siderophoren wie FepA, FecA und FhuA oder von Vitamin B₁₂ wie BtuB. Eine weitere Gruppe der β -Barrel-Proteine wird von bakteriellen Toxinen, wie z.B. dem α -Hämolyysin von *Staphylococcus aureus* [15], gebildet. Auch strukturell unterscheiden sich β -Barrel-Proteine deutlich: so kann die Anzahl der β -Faltblätter, aus denen die Barrels zusammengesetzt sind, zwischen acht (z.B. OmpA) und 22 (z.B. FhuA) variieren. Die Außenseite des Barrels wird dabei von hydrophoben Aminosäuren gebildet, während das Innere der Pore aus hydrophilen Aminosäuren aufgebaut ist [14]. Die Loops, die die einzelnen β -Faltblätter verbinden, sind auf der extrazellulären Seite vergleichsweise länger und flexibler, teilweise ragen diese auch, wie z.B. bei FhaC, in die Pore hinein [16]. Die Porengröße differiert zwischen den verschiedenen β -Barrel-Proteinen deutlich: während z.B. OmpA ein β -Barrel ausbildet, das aus acht β -Faltblättern besteht und dessen Lumen beinahe verschlossen ist [17], bilden Vertreter, deren Barrels aus 16 bis 22 β -Faltblättern aufgebaut sind, große, wassergefüllte Poren aus [14]. Bei den 22-strängigen Transporterproteinen werden diese Poren durch eine globuläre Domäne, die als „Plug“ bezeichnet wird, verschlossen. Weiterhin gibt es Unterschiede hinsichtlich der Ausbildung oligomerer Strukturen: es finden sich sowohl Monomere (z.B. OmpX), als auch homodimere (z. B. OMPLA) und homotrimere (z.B. OmpC, FhuA) Komplexe [18]. Eine Sonderrolle nehmen Proteine wie das bereits erwähnte Toxin α -Hämolyysin bzw. das Protein MspA aus *Mycobacterium smegmatis* ein, deren Barrel von einem Heptamer (α -Hämolyysin) bzw. einem Oktamer (MspA) geformt wird [14].

Um an ihren Bestimmungsort in der äußeren Membran der Gram-negativen Bakterien zu gelangen, müssen die im Cytoplasma exprimierten β -Barrel-Proteine zunächst über die innere Membran geschleust werden. Dieser Export erfolgt über den SecYEG-Komplex [19].

Anschließend binden periplasmatische Chaperone wie Skp, DegP und SurA an die Proteine; sie verhindern einerseits deren Aggregation im Periplasma, andererseits leiten sie diese zur äußeren Membran weiter [20]. Zur Integration der β -Barrel-Proteine in die äußere Membran besitzen Gram-negative Bakterien Importkomplexe, deren zentrale Komponenten Proteine einer einzigen Unterfamilie der β -Barrel-Proteine sind. Diese Unterfamilie wird als Omp85-Familie bezeichnet [21].

1.3 Die Proteine der Omp85-Familie

Namensgebend für diese Familie ist ein Protein aus *Neisseria meningitidis*, das eine essentielle Funktion in der Biogenese der äußeren Membran dieses Bakteriums einnimmt [22]. Mitglieder der Omp85-Familie spielen neben der bereits erwähnten Integration von Proteinen in die äußere Membran Gram-negativer Bakterien eine zentrale Rolle bei der Translokation von Proteinen durch die äußere Hüllmembran von Chloroplasten [23], der Sekretion von Hämolytinen [24] oder Adhäsinen [25] sowie der Assemblierung von Proteinen der äußeren Membran von Mitochondrien [26]. Durch bioinformatische Analysen konnten mehrere Motive identifiziert werden, die innerhalb dieser Proteinfamilie konserviert sind [27-30]. Darüber hinaus gibt es Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Domänenstruktur.

Alle Vertreter besitzen eine N-terminale Domäne, die ein oder mehrere Kopien eines Sequenzmotivs enthält, das als POTRA-Motiv (Polypeptidtransport-assoziiert) bezeichnet und dem eine Funktion beim Transport von Polypeptiden durch die Membran zugeschrieben wird [27, 28, 30]. In Interaktionsanalysen mittels Crosslinking konnte eine direkte Interaktion der N-terminalen Domänen von psToc75 und Alr2269 mit dem Vorstufenprotein der plastidär lokalisierten kleinen Untereinheit der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (pSSU), nicht aber mit seiner muren Form (mSSU) gezeigt werden [31]. Erst kürzlich wurde die Struktur der N-terminalen Domäne des Omp85-Proteins YaeT aus *Escherichia coli* durch kristallographische Untersuchungen aufgeklärt [32]. Durch spektroskopische Untersuchungen und Röntgenstrukturanalysen dieser Domäne konnte zudem die genaue Orientierung ihrer POTRA-Motive zueinander sowie deren Interaktion mit Teilkonstrukten des mittels YaeT integrierten Proteins PhoE bestimmt werden [33].

Demgegenüber bildet der C-Terminus die in der Membran verankerte β -Barrel-Kanalpore. Modelle der C-terminalen Domänen verschiedener Omp85-Vertreter aus *Pisum sativum* [34], *Arabidopsis thaliana* [35] und *Anabaena* sp. PCC 7120 [31] zeigen einen Aufbau des β -Barrels aus 16 membrandurchspannenden β -Faltblättern, die durch kurze Loops miteinander verbunden sind. Omp85-Proteine weisen im distalen Teil der C-terminalen

1. Einleitung

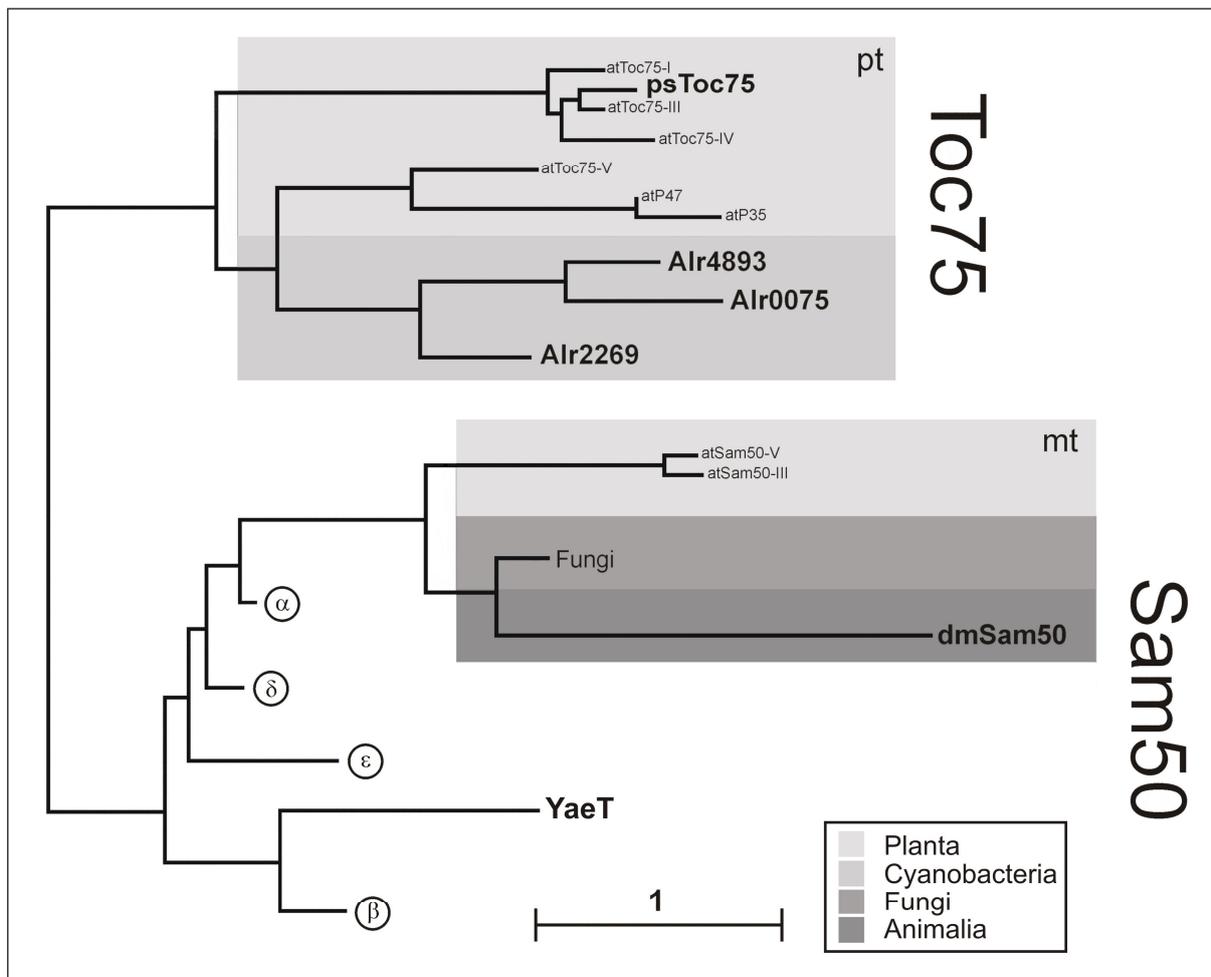


Abbildung 1.1: Phylogenetischer Stammbaum der Omp85-Familie. Die innerhalb dieser Arbeit analysierten Vertreter sind durch Fettdruck hervorgehoben, als Vergleich sind die Omp85-Proteine von *Arabidopsis thaliana*, der Fungi sowie der Untergruppen der Proteobakterien aufgeführt. pt plastidär lokalisierte Proteine, mt mitochondriell lokalisierte Proteine. α , β , δ , ϵ Untergruppen der Proteobakterien (Abbildung verändert nach [36]).

Domäne, der von den letzten acht β -Faltblättern gebildet wird und zwei konservierte Struktur motive enthält, die höchste Ähnlichkeit zueinander auf [28]. Diese bioinformatische Domänenvorhersage konnte vor kurzem durch die Röntgenstrukturanalyse des zur Omp85-TpsB-Superfamilie gehörenden Two-Partner Secretion B-Proteins FhaC aus *Bordetella pertussis* bestätigt werden [16]. Inwieweit Eigenschaften und Funktion der Kanalpore durch die N-terminale Domäne beeinflusst werden, wurde jedoch bisher noch nicht untersucht.

Das Ergebnis einer phylogenetischen Analyse der Omp85-Familie ist in Abb. 1.1 dargestellt [36]. Deutlich zeigt sich die Aufspaltung der Familie in zwei Subgruppen. Der eine Hauptarm der Omp85-Familie besteht aus cyanobakteriellen Vertretern sowie Proteinen, die am Import cytoplasmatisch translaterter Proteine in die Chloroplasten beteiligt sind (in Abb. 1.1 mit „Toc75“ bezeichnet), während der andere Hauptarm aus Vertretern der verschiedenen

Untergruppen der Proteobakterien sowie mitochondriellen Proteinen besteht (mit „Sam50“ bezeichnet).

1.3.1 Die prokaryotischen Omp85-Proteine

Escherichia coli (*E. coli*) ist ein Gram-negatives Bakterium aus der γ -Untergruppe der Proteobakterien. Gram-negative Bakterien besitzen zwei Membransysteme, die durch das Periplasma getrennt sind, welches eine dünne Peptidoglykanschicht enthält. Das Omp85-Protein YaeT ist in der äußeren Membran lokalisiert und besitzt eine essentielle Funktion in *E. coli*. YaeT bildet zusammen mit den Lipoproteinen YfgL, YfiO, NlpB und SmpA einen Komplex, der die Integration von Membranproteinen in die äußere Membran von *E. coli* ermöglicht [37, 38]. Die genaue Funktion der einzelnen Komponenten innerhalb dieses Komplexes ist noch unbekannt. Ein Ausschalten von YaeT führt jedoch zu schweren Defekten in der Integration von β -Barrel-Proteinen in die äußere Membran [39-41].

In *Neisseria meningitidis*, einem Bakterium aus der β -Untergruppe der Proteobakterien, sind im Gegensatz zu *E. coli* bisher keine weiteren Komponenten eines Komplexes gefunden worden. Die genaue Funktion von Omp85 ist noch nicht bekannt. Es wird diskutiert, dass Omp85 wie in *E. coli* an der Integration der Proteine in die äußere Zellmembran beteiligt ist [21]. Andererseits wird eine Funktion von Omp85 beim Export von Phospholipiden und Lipopolysacchariden (LPS) in die äußere Zellmembran beschrieben [42], vergleichbar etwa mit der Funktion von OstA/Imp beim LPS-Export in *E. coli* [43, 44].

Eine evolutionäre Analyse der Genome von *Arabidopsis thaliana* und verschiedener Cyanobakterien hat gezeigt, dass innerhalb der heute bekannten Cyanobakterien die Gattungen *Nostoc* und *Anabaena* als evolutionär nächste Verwandte der Chloroplasten angesehen werden können [45]. Da das Genom von *Anabaena* sp. PCC 7120 komplett sequenziert wurde [46] und Werkzeuge zu seiner genetischen Manipulation etabliert werden konnten [47], stellt dieses Cyanobakterium einen idealen Modellorganismus dar. *Anabaena* sp. PCC 7120 ist ein filamentöses Cyanobakterium, das neben vegetativen Zellen einen weiteren Zelltyp ausbildet, der als Heterozyste bezeichnet wird und in dem die Stickstofffixierung stattfindet.

Das Genom von *Anabaena* sp. PCC 7120 enthält drei Gene, die für Vertreter der Omp85-Familie kodieren: *alr2269*, *alr0075* und *alr4893* [28]. Die phylogenetische Analyse dieser Proteine der Omp85-Familie zeigt, dass Alr0075 und Alr4893 eine größere Ähnlichkeit zueinander aufweisen als zu Alr2269 (siehe Abb. 1.1). Diese drei Vertreter der Omp85-

Familie unterscheiden sich vor allem in der Größe ihrer N-terminalen Domäne, während die C-terminale Porenregion jeweils aus etwa 350 Aminosäuren besteht.

Von diesen drei Proteinen weist Alr2269 die größte Verwandtschaft zum Importkanal der Chloroplasten auf (siehe Abb. 1.1) [36, 48]. Das Protein ist *in vitro* in der Lage, homotrimere Komplexe zu bilden, wofür wahrscheinlich die Selbstinteraktion der N-terminalen Domäne verantwortlich ist [31, 36]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von Alr2269 plastidäre Vorstufenproteine binden kann. Während Alr2269 und Alr4893 in der äußeren Membran sowohl von Heterozysten, als auch von vegetativen Zellen identifiziert wurde, konnte Alr0075 bisher lediglich in vegetativen Zellen nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung, K. Nicolaisen).

Über die Funktion dieser drei Omp85-Proteine in *Anabaena* sp. PCC 7120 ist bisher wenig bekannt. Jüngste Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Alr2269 eine wichtige Rolle beim Lipidexport in die äußere Zellmembran spielen und somit eine vergleichbare Funktion wie OstA/Imp in *E. coli* oder möglicherweise Omp85 in *N. meningitidis* einnehmen könnte.

1.3.2 Die eukaryotischen Omp85-Proteine

Man nimmt an, dass Chloroplasten vor etwa 1,2 Milliarden Jahren durch die Aufnahme eines Cyanobakteriums in eine eukaryotische Zelle entstanden sind (Endosymbionten-Hypothese) [49, 50]. Im Laufe der Zeit wurde der Großteil der genetischen Information der Chloroplasten in das Genom der Wirtszelle übertragen, vermutlich, um eine Koordination der Metabolismen von Wirtszelle und Endosymbiont zu gewährleisten [51]. Für die plastidären Proteine, welche also seither im Cytosol synthetisiert wurden, musste daher ein System etabliert werden, das den Transport dieser Proteine in die Chloroplasten bewerkstelligt. Dieses Transportsystem wird von zwei heterooligomeren Proteinkomplexen gebildet, die in der äußeren (TOC-Komplex, Translocon at the Outer envelope of Chloroplasts) bzw. der inneren Hüllmembran der Chloroplasten (TIC-Komplex, Translocon at the Innner envelope of Chloroplasts) lokalisiert sind und deren Komponenten teils prokaryotischen, teils eukaryotischen Ursprungs sind [52]. Der TOC-Kernkomplex besteht aus den Komponenten Toc75, Toc34 und Toc159. Toc75 bildet als Vertreter der Omp85-Familie den Importkanal dieses Translokationskomplexes. Toc34 ist ein GTP-abhängiger Rezeptor für plastidäre Vorstufenproteine [53], während Toc159 das zentrale Motorprotein des TOC-Komplexes bildet, welches den Import der Vorstufenproteine in die Chloroplasten koordiniert [54]. Zum TOC-Komplex gehören neben dem Kernkomplex der Hsp90-abhängige Vorstufenprotein-

1. Einleitung

Rezeptor Toc64 [55] sowie das Protein Toc12, das die Interaktion des TOC-Komplexes mit der Transportmaschinerie des Intermembranraums vermittelt [56].

Während in *Pisum sativum* lediglich ein einziges Toc75-Protein bekannt ist, weist das Genom von *Arabidopsis thaliana* insgesamt sechs Gene von Toc75-Homologen auf [28]; von diesen werden allerdings lediglich fünf Proteine exprimiert, da *atToc75-I* ein Pseudogen ist [57]. Aus der Analyse des Expressionsmusters, das stark mit demjenigen der anderen Importkomplex-Komponenten korreliert [58], sowie dem im Vergleich zu den anderen Toc75-Homologen aus *A. thaliana* höchsten Expressionslevel [57, 58] lässt sich schließen, dass der Hauptimportkanal vom Protein *atToc75-III* gebildet wird. Darüber hinaus besitzt *atToc75-III* auch die größte Ähnlichkeit zu *psToc75* [23]. *atToc75-IV* besitzt eine hohe Ähnlichkeit zu *atToc75-III*, während die Omp85-Proteine *atToc75-V*, *atP35* und *atP47* eine höhere Ähnlichkeit zu den Omp85-Proteinen von *Anabaena* sp. PCC 7120 aufweisen (siehe Abb. 1.1).

Mitochondrien haben sich vor etwa 1,8 Milliarden Jahren durch Aufnahme eines α -Proteobakteriums, also ebenso wie die Chloroplasten endosymbiotisch, entwickelt [59] und besitzen daher auch eine doppelte Hüllmembran. Ebenfalls wurde der Großteil des mitochondrialen Genoms in den Zellkern übertragen, so dass eine Vielzahl mitochondrialer Proteine im Cytosol translatiert wird und durch eine Transportmaschinerie importiert werden muss. Im Gegensatz zur plastidären Funktion des Omp85-Proteins als zentraler Pore des TOC-Komplexes, die den Import plastidärer Proteine ermöglicht, findet man den mitochondrialen Vertreter der Omp85-Familie im SAM-Komplex (Sorting and Assembly Machinery), der die Integration von Proteinen in die äußere Mitochondrienmembran ermöglicht. Sam50 bildet hier die zentrale Pore des SAM-Komplexes und übernimmt somit in Mitochondrien eine vergleichbare Funktion wie YaeT in der äußeren Hüllmembran von *E. coli*. Neben Sam50 besteht der SAM-Komplex aus den Komponenten Sam35, Sam37 und Mdm10 [60]. Sam35 ermöglicht die Bindung des zu importierenden Proteins an den SAM-Komplex. Die Bindung erfolgt über ein konserviertes C-terminales Sequenzmotiv der mitochondrialen β -Barrel-Proteine, das als β -Signal bezeichnet wird [61]. Sam37 hingegen ist an der Dissoziation des integrierten Proteins vom Komplex beteiligt [62] und stabilisiert zudem den SAM-Komplex [63]. Mdm10 scheint eine Rolle bei der Interaktion des SAM-Komplexes mit anderen Komponenten der äußeren Mitochondrienmembran zu spielen [60].

1.4 Elektrophysiologie

Zur Analyse der β -Barrel-Proteine werden verschiedenste Techniken eingesetzt, wie z.B. biochemische [31], spektroskopische [33], kristallographische [16] oder elektrophysiologische Methoden [64]. Mithilfe elektrophysiologischer Untersuchungsmethoden ist es durch die Analyse der biophysikalischen Eigenschaften von Kanalproteinen möglich, u.a. deren Durchmesser, ihre Ionenselektivität und das Schaltverhalten zu ermitteln und zu vergleichen. Eine weit verbreitete Methode ist das Patch Clamping, das von Neher und Sakmann entwickelt wurde und die Untersuchung von Proteinkanälen *in vivo* ermöglicht [65]. Einen guten Überblick über diese Methode geben Neher und Sakmann im Buch „Single-Channel Recording“ [66]. Parallel dazu wurde eine weitere elektrophysiologische Methode entwickelt: die Lipid-Bilayer-Technik. Ausgangspunkt dieser Methode waren Versuche von Miller und Racker, die Fragmente des Sarkoplasmatischen Reticulums mit einer künstlichen Lipidmembran fusionierten [67]. Bei dieser Methode wird ein Lipidfilm auf eine Öffnung in einem Septum (z.B. aus Delrin, Polycarbonat oder Teflon) aufgetragen, das zwei Elektrolytgefüllte Halbkammern voneinander trennt. Über die Messkammermembran wird durch Verwendung unterschiedlich konzentrierter Elektrolyte in den Halbkammern nicht nur ein elektrochemischer, sondern auch ein osmotischer Gradient errichtet. Durch diesen osmotischen Gradienten wird die Fusion von Proteoliposomen, in deren Membran Kanalproteine rekonstituiert wurden, mit der Lipidmembran der Messkammer induziert (Abb. 1.2A). Aufgrund des osmotischen Gradienten strömt Wasser in das Proteoliposom ein, das dadurch anschwillt und mit der Messkammermembran fusioniert (Abb. 1.2B), wodurch das Kanalprotein in die Lipidmembran der Messkammer eingebaut wird (Abb. 1.2C). Der Kontakt von Liposomen- und Messkammermembran kann durch die Bindung zugegebener bivalenter Kationen wie Ca^{2+} an die negativ geladenen Kopfgruppen beider Membranen erleichtert werden.

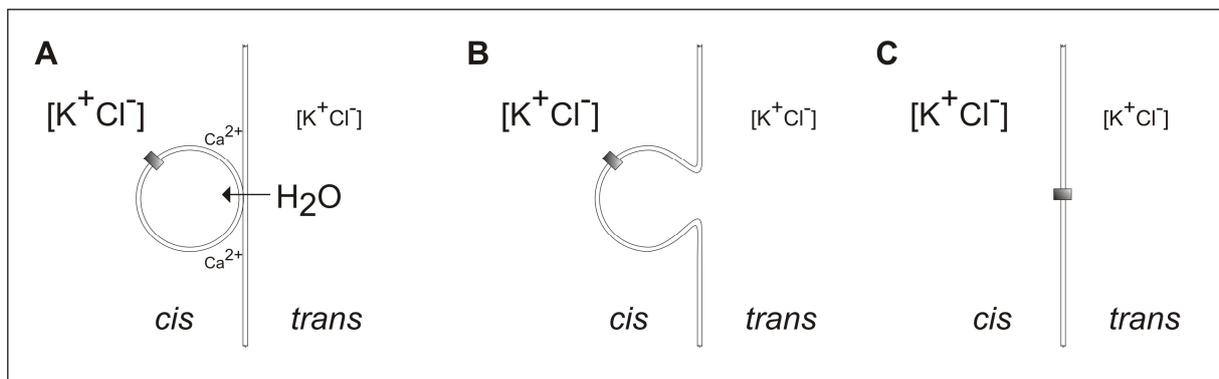


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Ca^{2+} -induzierten Fusion von Proteoliposomen mit dem planaren Bilayer (nach [67]). Erläuterungen im Text.

1. Einleitung

In Abbildung 1.3A ist der Aufbau des Lipid-Bilayer-Messsystems schematisch dargestellt. Eine Lipidmembran stellt aufgrund der isolierenden Eigenschaften ihrer hydrophoben Kernregion eine Barriere dar, über die kein Stromfluss stattfinden kann. Man kann sie sich elektronisch als Kondensator vorstellen, über den durch Anlegen einer Spannung aufgrund der polaren Lipidkopfguppen zwar ein elektrisches Potential aufgebaut werden kann, durch den jedoch kein Stromfluss möglich ist. Durch den Einbau eines Kanalproteins in die Lipidmembran wird jedoch eine elektrische Verbindung zwischen beiden Halbkammern hergestellt. Das Kanalprotein wirkt somit wie ein parallel zum Membrankondensator geschalteter Widerstand (siehe Abb. 1.3B). Der Reziprokwert des Kanalwiderstandes R_C wird als Leitwert bezeichnet und ist direkt proportional zur Stromstärke der durch den Kanal fließenden Ionen. Diese hängt dabei neben der angelegten Spannung U_{com} nur von den Eigenschaften des Kanalproteins, wie z.B. dessen Porengröße und der Ladungsverteilung im Inneren der Kanalpore, ab. Mithilfe einer Mess- und Kontrolleinheit, der sogenannten „Headstage“, kann eine definierte Spannung an die Membran angelegt und der resultierende Stromfluss durch das Kanalprotein gemessen und aufgezeichnet werden.

Mit dem Lipid-Bilayer-Messsystem können somit die biophysikalischen Eigenschaften von Kanalproteinen, wie ihr Leitwert oder ihre Ionenselektivität, ermittelt und miteinander verglichen werden. Darüber hinaus kann z.B. durch die Untersuchung von Teilkonstrukten eines Kanalproteins der Einfluss der verschiedenen Proteindomänen auf die Funktion des Kanals bestimmt werden.

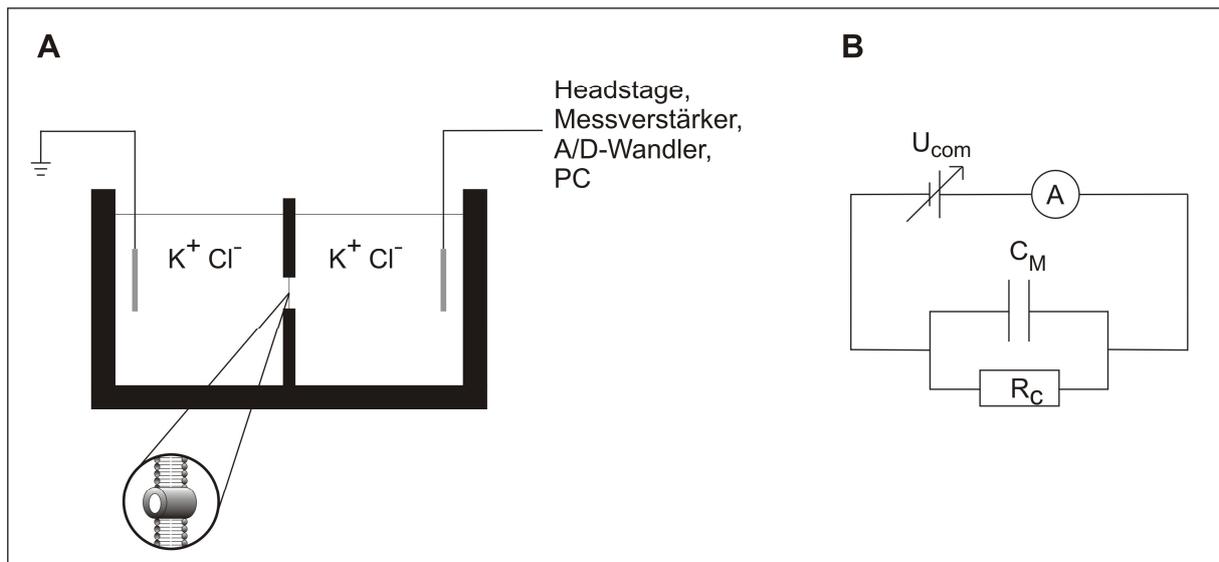


Abbildung 1.3: Lipid-Bilayer-Messsystem. (A) Schematische Darstellung des Systems, im Insert ist ein in die Membran eingebautes Kanalprotein gezeigt. (B) Ersatzschaltbild zu (A). U_{com} Spannungsquelle, A Amperemeter, C_M Kapazität des Bilayers, R_C Widerstand des Kanalproteins.

Daher stellt dieses System ein ideales Werkzeug zur Analyse der Eigenschaften der Proteine der Omp85-Familie dar. Mithilfe der Lipid-Bilayer-Technik kann ein Vergleich von Omp85-Vertretern aus den beiden Hauptarmen der Omp85-Familie (siehe Abb. 1.1) durchgeführt werden. Auch kann die vorhergesagte Domänenstruktur der Proteine [36] verifiziert und mögliche regulatorische Einflüsse der N-terminalen Domäne auf die biophysikalischen Eigenschaften des kanalbildenden C-Terminus bestimmt werden. Zudem können durch den Vergleich der biophysikalischen Eigenschaften von Omp85-Proteinen der endosymbiotischen Organellen mit ihren prokaryotischen Verwandten möglicherweise Rückschlüsse auf eine veränderte Funktion gezogen werden.

1.5 Ziel der Arbeit

Innerhalb dieser Arbeit sollten Proteine der Omp85-Familie biophysikalisch charakterisiert werden. Hierzu musste zunächst ein elektrophysiologisches Messsystem konstruiert, aufgebaut, in Betrieb genommen und getestet werden, mit dem die ausgewählten Vertreter mithilfe der Lipid-Bilayer-Technik untersucht werden konnten.

Nach der Etablierung des Messsystems sollten Fragestellungen bearbeitet werden, die sich aus Ergebnissen phylogenetischer, struktureller und biochemischer Analysen dieser Proteinfamilie ergaben. Konkret sollte dabei den folgenden Fragestellungen nachgegangen werden:

Spiegelt sich die phylogenetische Aufteilung der Omp85-Familie in zwei Untergruppen in den biophysikalischen Eigenschaften wider und lassen die biophysikalischen Eigenschaften der Omp85-Proteinkanäle Rückschlüsse auf die evolutionäre Entwicklung dieser Proteinfamilie zu?

Unterscheiden sich die eukaryotischen Omp85-Vertreter in den endosymbiotisch entstandenen Organellen von ihren prokaryotischen Verwandten in ihren Eigenschaften?

Besitzt die N-terminale Domäne einen Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften der C-terminalen Porenregion?

Gibt es Unterschiede in den biophysikalischen Eigenschaften der drei homologen Vertreter der Omp85-Familie in *Anabaena* sp. PCC 7120?

Durch die Beantwortung dieser Fragen sollten innerhalb dieser Arbeit fundamentale Grundlagen zum Verständnis der Funktion der Omp85-Proteine gelegt sowie wichtige Rückschlüsse auf die Evolution dieser Proteinfamilie ermöglicht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in hochreiner Form (p.a.) von Sigma Aldrich (München), Roth (Karlsruhe), Roche (Penzberg) und Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Enzyme und Kits

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase und Taq-Polymerase wurden von Roche (Penzberg), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und Qiagen (Hilden) bezogen.

Zur DNA-Isolierung im Mini-Maßstab wurde das Kit NucleoSpin Plasmid, zur Isolierung im Midi-Maßstab das Kit NucleoBond PC100 (jeweils Macherey & Nagel) eingesetzt. Die Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen wurde mit dem Kit NucleoSpin Extract II (Macherey & Nagel) durchgeführt.

2.1.3 Stämme und Vektoren

Zur DNA-Amplifikation wurde der Stamm *E. coli* DH5 α (GibcoBRL, Eggenstein) verwendet. Konstrukte wurden im Stamm *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen, Madison, USA) überexprimiert. Die verwendeten Konstrukte waren hierzu in die Vektorsysteme pET21 (Novagen), pTrcHis2, pRSET6d (beide Invitrogen) bzw. pQE (Qiagen) kloniert worden.

2.1.4 Verwendete Konstrukte

Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Die eingesetzten Teilkonstrukte der Proteine Alr2269, PsToc75 und YaeT sind in Abb. 2.1 schematisch dargestellt.

2.1.5 Kulturmedien

Als Kultivierungsmedium wurde 2YT verwendet [68]. Festmedien wurden durch Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar hergestellt. Das zur Selektion verwendete Antibiotikum Ampicillin wurde in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml nach Autoklavierung der Medien nach deren Abkühlung (bei Festmedien auf etwa 45 °C) zugefügt.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.1: Verwendete Konstrukte. Angegeben sind die Namen der Proteinkonstrukte und Gene, die Konstrukt­längen (Anzahl der Aminosäuren, aa), die verwendeten Plasmidvektoren, die Konstruktsequenzen (bezogen auf die Aminosäurepositionen in den Voll­längenproteinen) und der jeweilige Herkunftsorganismus der Konstrukte. Alle Konstrukte enthielten einen C-terminalen Hexahistidin-Tag. ^aKonstrukt von M.T. Bohnsack, ^bKonstrukte von L. Borissenko.

Protein-konstrukt	Gen	Länge [aa]	Plasmid-vektor	Konstrukt-sequenz [aa]	Organismus
Alr2269	<i>alr2269</i>	833	pET21d	1-833	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120
AnaA	<i>alr2269</i>	310	pTrcHis2	161-470	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120
AnaC	<i>alr2269</i>	366	pTrcHis2	467-833	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120
AnaD	<i>alr2269</i>	132	pTrcHis2	702-833	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120
Alr0075	<i>alr0075</i>	491	pET21d	1-491	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120
Alr4893	<i>alr4893</i>	676	pET21d	1-676	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120
PsA	<i>psToc75</i>	291	pTrcHis2	149-439	<i>Pisum sativum</i>
PsC	<i>psToc75</i>	371	pTrcHis2	439-809	<i>Pisum sativum</i>
PsD	<i>psToc75</i>	131	pTrcHis2	679-809	<i>Pisum sativum</i>
dmSam50 ^a	<i>dmSam50</i>	464	pQE80N	1-464	<i>Drosophila melanogaster</i>
YaeT ^b	<i>yaeT</i>	810	pRSET6d	1-810	<i>Escherichia coli</i>
YaeT _{C-term} ^b	<i>yaeT</i>	338	pRSET6d	473-810	<i>Escherichia coli</i>

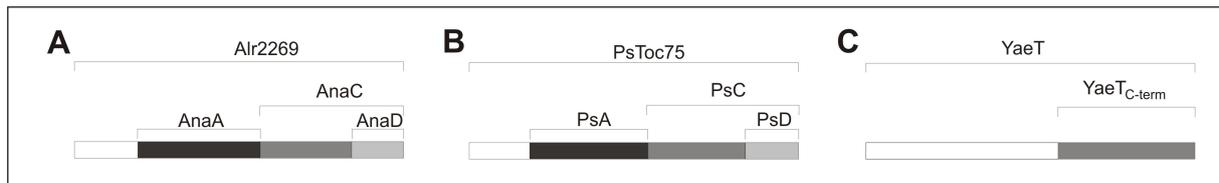


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. (A) Alr2269, (B) PsToc75, (C) YaeT.

2.1.6 Membranen

Nitrocellulosemembranen (Protran BA-S83, 0,2 µm) wurden von Schleicher & Schüll (Dassel) bezogen.

2.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper wurden durch Injektion rekombinant exprimierter und aufgereinigter Proteine in Kaninchen hergestellt. Injektion und Haltung der Kaninchen sowie die Gewinnung der Antiseren wurden von Pineda (Berlin) durchgeführt. Sekundäre Antikörper gegen Kaninchen IgG-Konjugate wurden von Sigma (München) bezogen.

2.1.8 Säulenmaterial

Ni-NTA-Säulenmaterial wurde von Qiagen (Hilden) bezogen.

2.1.9 Lipide und Detergentien

Zur Herstellung der Proteoliposomen und der Lipidmembran des Lipid-Bilayer-Messsystems wurde L- α -Phosphatidylcholin Typ IV-S (Sigma, München) verwendet. Lipide und rekombinant exprimierte Proteine wurden mit dem Detergens Mega-9 (Sigma, München) solubilisiert.

2.1.10 Aufbau des Elektrophysiologischen Messstandes

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Verschraubungen der Trägerholme des Messstandes (Quadratprofil S-40) unter Verwendung des Spannbügelsatzes S-40 und der Nutensteine L (jeweils Rose+Krieger GmbH, Minden) vorgenommen. Hierbei wurden die mitgelieferten Schrauben verwendet, weitere Verschraubungen wurden mit Schrauben der Firma Schrauben Preisinger (München) vorgenommen. Die verwendeten Unterlegscheiben (Durchmesser 6,4x12, DIN 125) und Muttern wurden ebenfalls von Schrauben Preisinger bezogen.

2.1.10.1 Käfiggerüst

Die unteren Querstreben wurden so angebracht, dass sich Käfigtischplatte und Messtischplatte auf einer Höhe befanden (Abb. 2.2). Auf der Rückseite wurde eine zusätzliche Querstrebe zur Fixierung der Abstandshalter des Messtisches montiert.

2.1.10.2 Messtischgerüst

Die Beine des Messtisches wurden zur Stabilisierung mit Querholmen verbunden (Abb. 2.3). Auf den vorderen unteren Querholm wurde zugunsten der Beinfreiheit verzichtet. Zur korrekten waagerechten Ausrichtung des Messtisches wurden höhenverstellbare Füße (Gelenkstützfuß M6, Rose+Krieger) angeschraubt. Zur Vermeidung von Störungen durch mechanische Schwingungen wurde die Tischplatte des Messtisches auf vier pneumatischen Schwingungsdämpfern (cplusw GmbH, Hamburg, siehe Abb. 2.6 unten rechts) gelagert, die an den Eckpunkten des Gerüsts mit Schrauben (M6x12, DIN 933) und mit Unterlegscheiben befestigt wurden. Hierzu wurden M6-Gewinde in das Messtischgerüst geschnitten (Abb. 2.3 „Draufsicht“). Die Bohrlöcher zur Befestigung der Messtischplatte wurden mit einem Versenker abgesenkt (Befestigung mit M10x20, DIN 7991). Um mechanische Störungen durch Kontakt von Messtischplatte und Käfigtischplatte zu verhindern, wurde der Messtisch über Abstandshalter (zwischen den hinteren Tischbeinen und der unteren Querstrebe des Käfiggerüsts) mit dem Käfiggerüst verbunden.

2. Material und Methoden

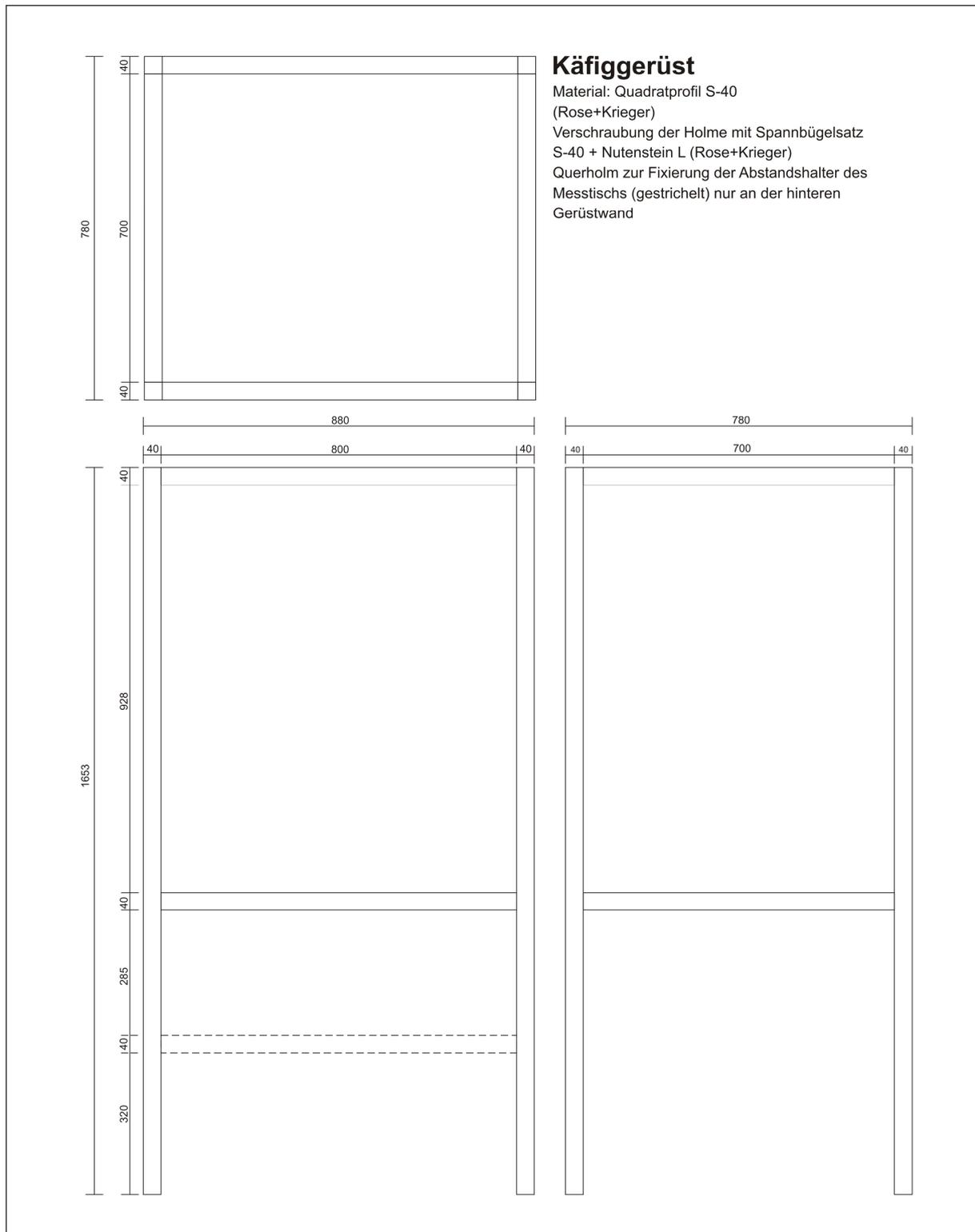


Abbildung 2.2: Konstruktionszeichnung des Käfiggerüsts. Erläuterungen siehe Kap. 2.1.10.1.

2. Material und Methoden

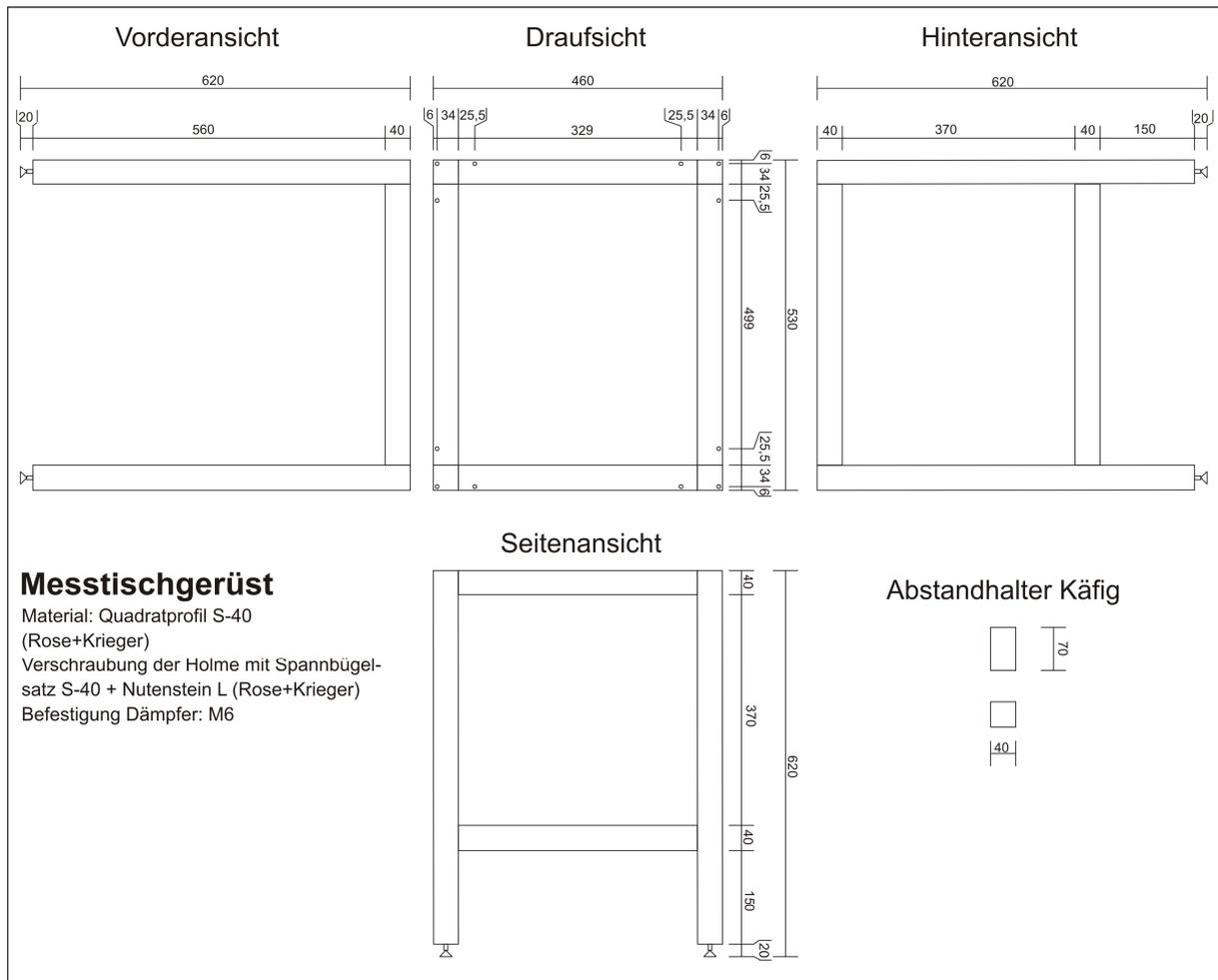


Abbildung 2.3: Konstruktionszeichnung des Messtischgerüsts. Erläuterungen siehe Kap. 2.1.10.2.

2.1.10.3 Käfiggitter

Die Käfigplatten wurden aus Lochgittermaterial (Al 99,5, Stärke 1,5 mm, Firma Batzer Stahl- und Metallhandels GmbH, Gräfelfing) hergestellt (Abb. 2.4). Zur Befestigung am Rahmen mussten teilweise Stege aus dem Gitter herausgesägt werden. Die Platten wurden mit M6x12, DIN 7984, mit Unterlegscheiben und Nutenstein F am Käfiggerüst befestigt.

2.1.10.4 Käfigtüren

Die Leisten (Abb. 2.5 links, Material: AlMg3, Stärke 10 mm, Alu Meier GmbH, München) wurden zum fertigen Rahmen verschweißt. Die Türgitter wurden aus Lochgittermaterial (Al 99,5, Stärke 1,5 mm, Firma Batzer) hergestellt und mit M3x6, DIN 84 am Türrahmen befestigt. Mit dem Käfigrahmen wurden die Türen durch je zwei Aushängescharniere (Nutgeom. 40, Rose+Krieger) verbunden. Um den Käfig komplett schließen zu können, wurden Käfigtüren und Käfiggerüst mit Magnetschlössern (Typ M72/GP2, Rose+Krieger)

2. Material und Methoden

ausgestattet. Als Türgriffe wurden Hartplastikgriffe von Elektrophoresekamern (Abb. 2.5 oben rechts) verwendet, die mit M4x16, DIN 84 am Rahmen befestigt wurden.

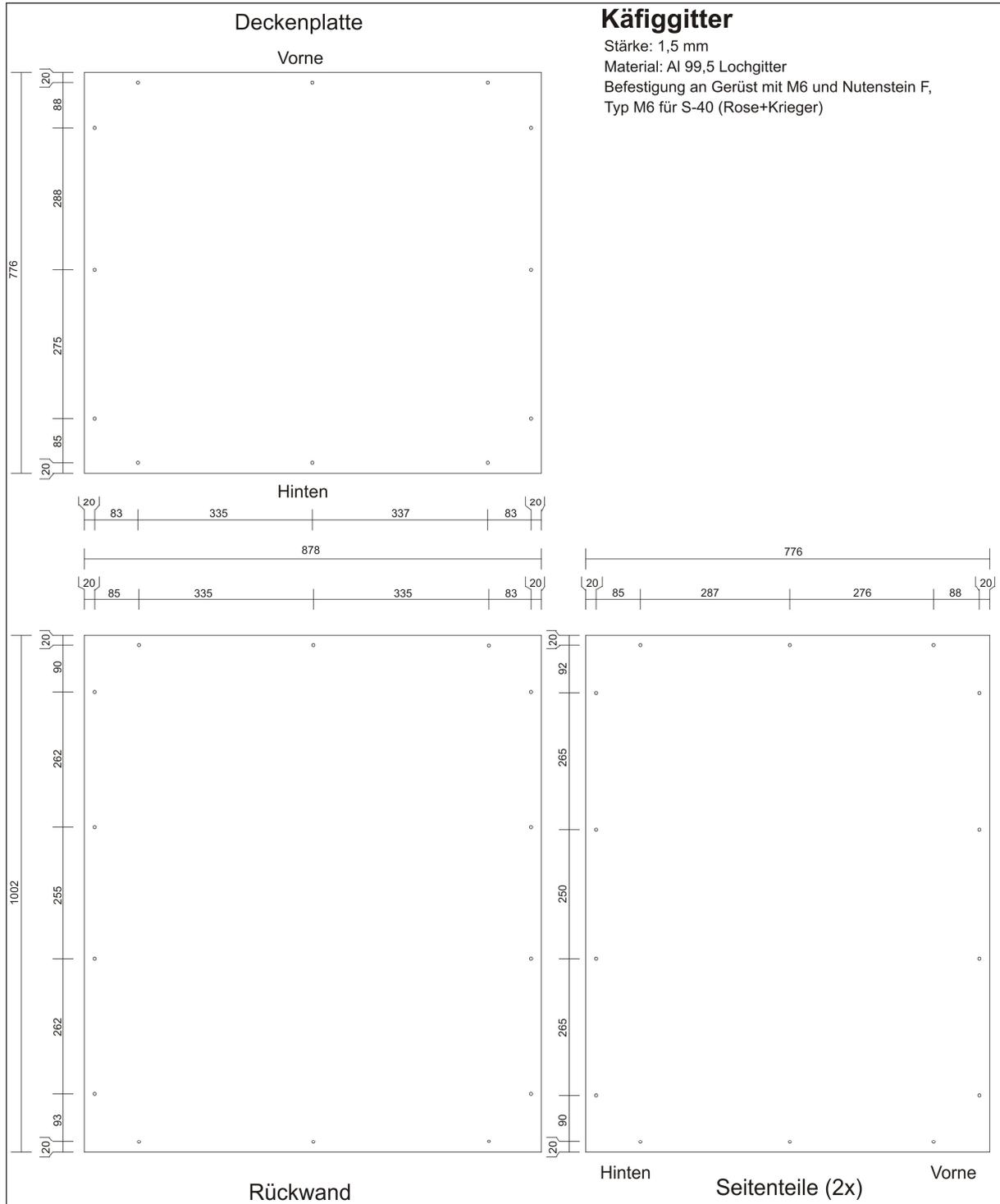


Abbildung 2.4: Konstruktionszeichnung der Käfiggitter. Erläuterungen siehe Kap. 2.1.10.3.

2. Material und Methoden

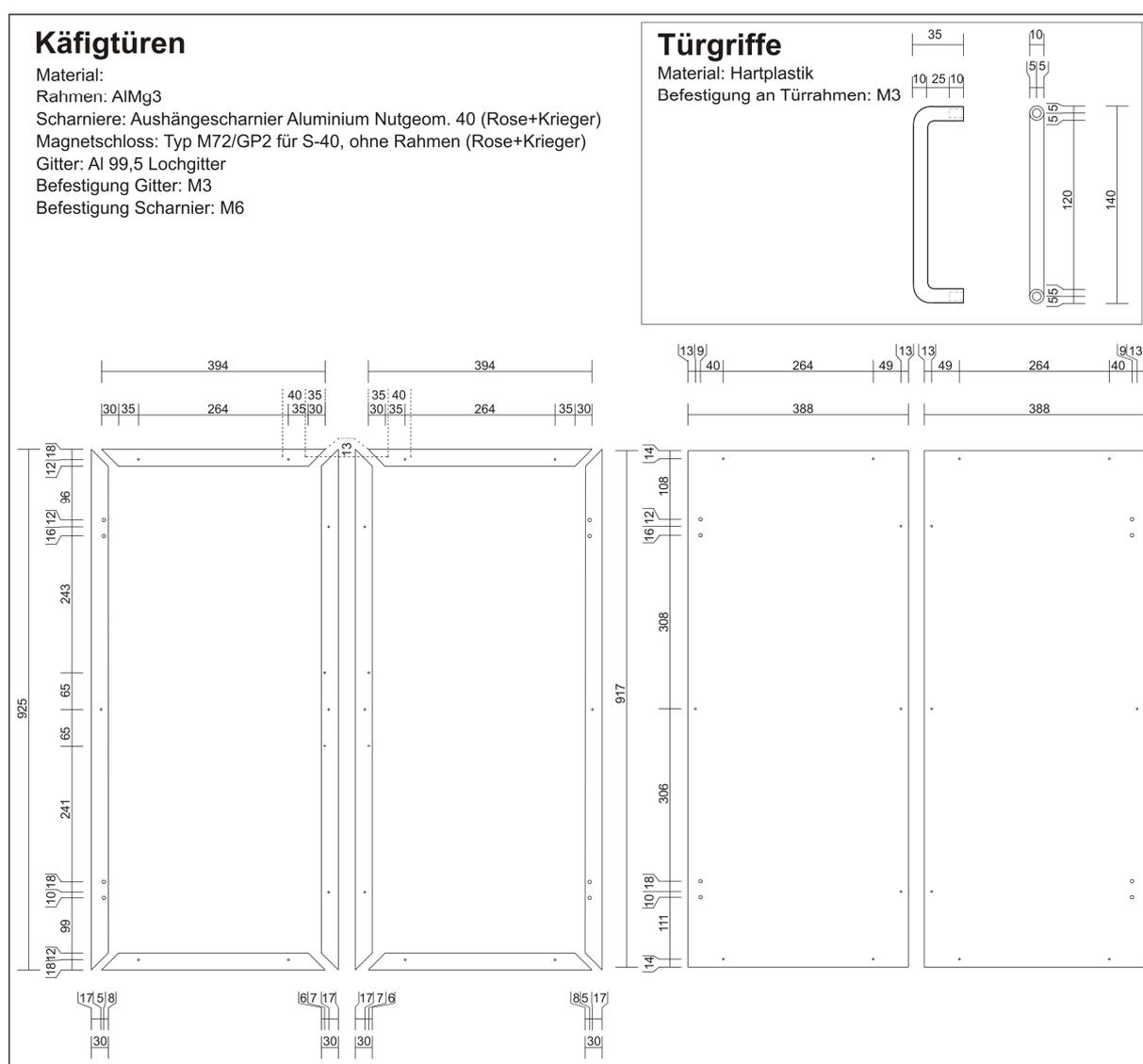


Abbildung 2.5: Konstruktionszeichnung der Käfigtüren. Erläuterungen siehe Kap. 2.1.10.4.

2.1.10.5 Tischplatten

Beide Tischplatten wurden aus einer großen Platte (Material: AlMg3, Stärke 10 mm, Alu Meier) herausgefräst (Abb. 2.6). Die Messtischplatte wurde danach aus der Käfigtischplatte so herausgefräst, dass zwischen beiden Platten auf jeder Seite ein Abstand von 1 cm (zur Vermeidung mechanischer Störungen) bestand. Aus der Käfigtischplatte wurden an den Ecken jeweils Aussparungen für die senkrechten Käfigholme herausgesägt. Die Bohrlöcher zur Befestigung der Käfigtischplatte wurden mit einem Versenker abgesenkt (Befestigung: M6x20, DIN 7991 und Nutenstein F, Rose+Krieger). Weiterhin wurden Löcher zur Befestigung von Binokular- und Perfusionshalterung (Befestigung: jeweils M6x20, DIN 912, mit Unterlegscheiben) gebohrt. Im hinteren rechten Bereich der Käfigtischplatte wurde zur Durchleitung des Lichtwellenleiters eine Aussparung (\varnothing 2 cm) herausgefeilt.

2. Material und Methoden

Seite aus dem Tisch herausgeführt und mögliche elektromagnetische Störungen durch das Kabel mit einer Abschirmung aus verzinnem Kupfergeflecht (Werkstatt Botanisches Institut der LMU München) verhindert. Zur Höhenjustierung des Messkammertischs (um die Zentrierung des Bilayers im Stereomikroskop zu gewährleisten) wurde dieser an den Mikrometertrieb eines Mikromanipulators M1 (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen) montiert (Befestigung: M3x10, DIN 912). Die Höhenjustierung wurde mit M3x10, DIN 912 an die Halterungsplatte des Messkammertischs (Abb. 2.8 links, Material: AlMg3, Stärke 10 mm) angebracht. Hierbei wurden die Bohrlöcher zur Versenkung der Schraubenköpfe 5 mm tief

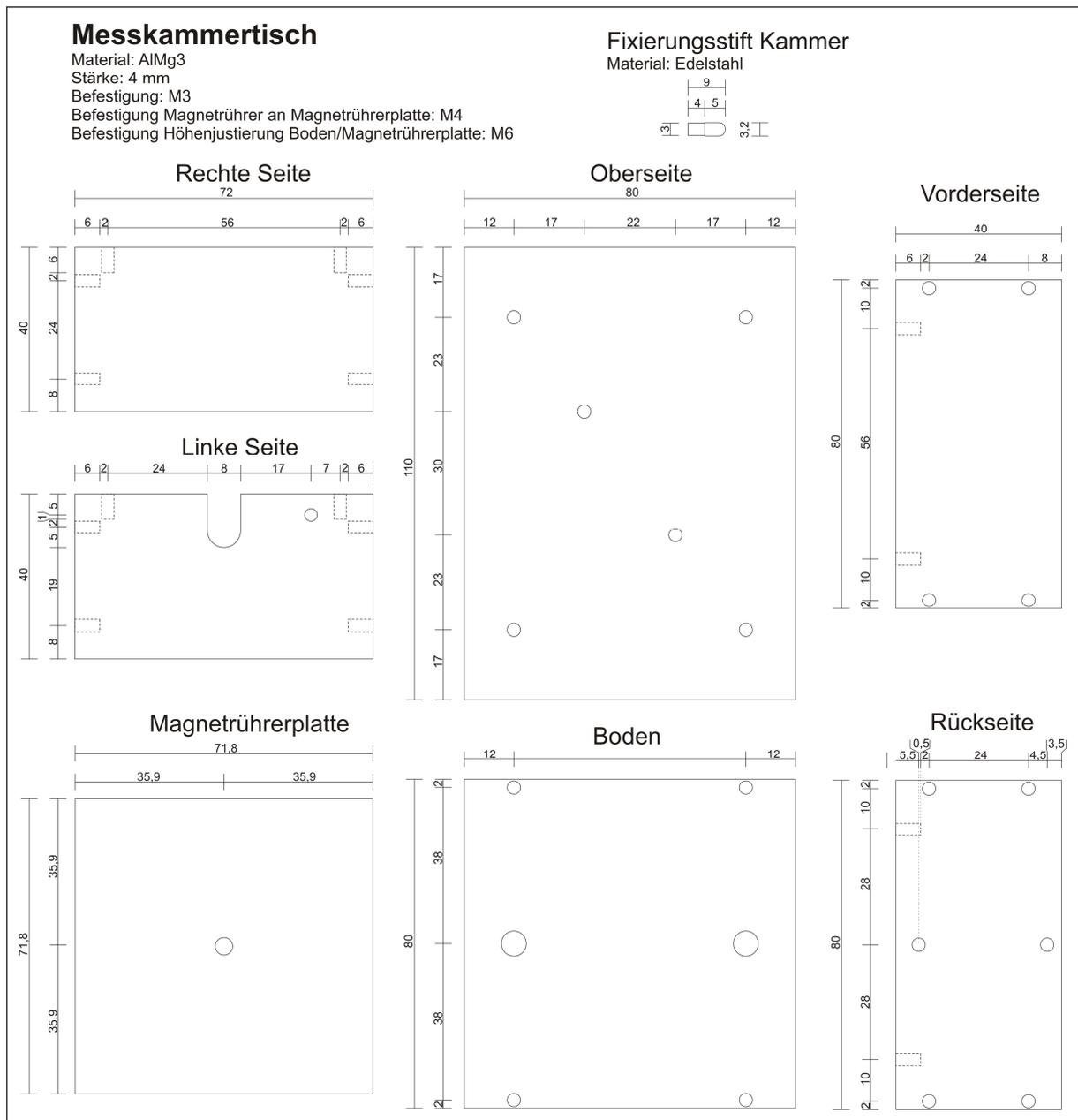


Abbildung 2.7: Konstruktionszeichnung des Messkammertischs. Erläuterungen siehe Kap. 2.1.10.6.

2. Material und Methoden

auf einen Durchmesser von 6 mm verbreitert. Zur Befestigung des Trichterhalters (Abb. 2.8 rechts, mit M3x6, DIN 84) wurde an der linken Seite ein M3-Gewinde 6 mm tief in die Halterungsplatte geschnitten (Glasstrichter: 35 mm, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Die Halterungsplatte wurde über M6x20, DIN 912 und Unterlegscheiben an einen Reiter 50 X 95, Breite 80 mm (LINOS Photonics GmbH & Co. KG, Göttingen) geschraubt und am horizontalen Messtischträger befestigt.

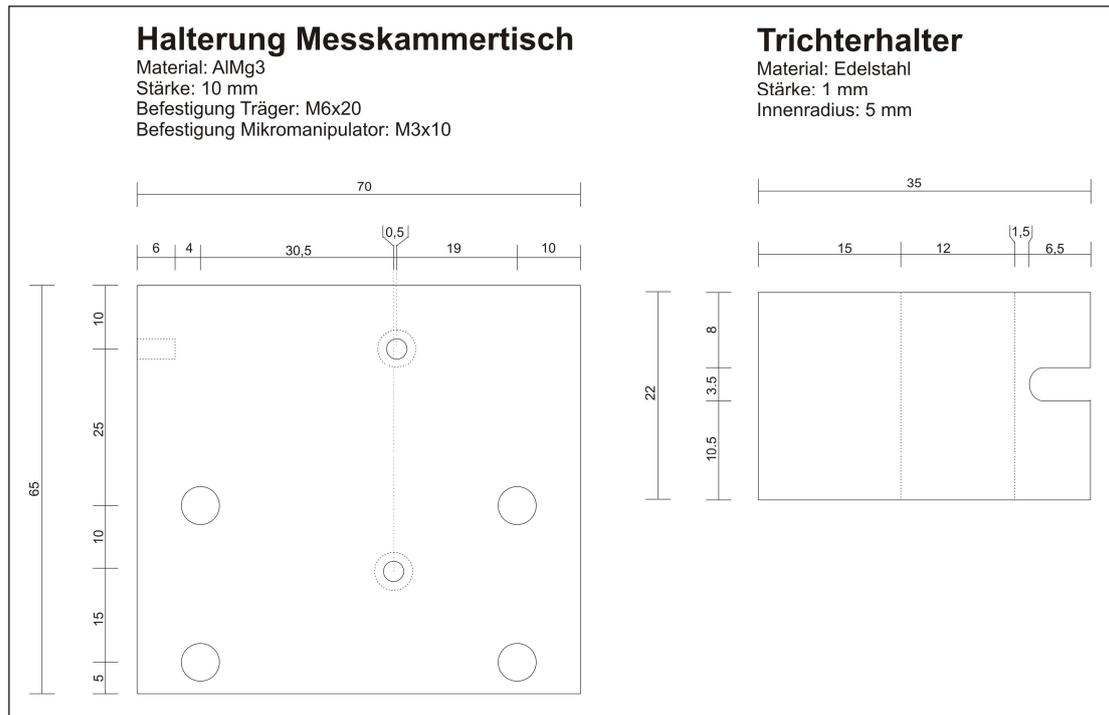


Abbildung 2.8: Konstruktionszeichnungen der Messkammertischhalterung und des Trichterhalters. Erläuterungen siehe Kap. 2.1.10.6.

2.1.10.7 Stereomikroskophalterung

Zur optischen Kontrolle der Versuche wurde ein Stereomikroskop SMZ1000, Okular C-W 10X/22, Objektiv PLAN 1X, PS Auflichtstativ mit Fokussiertrieb und Binokulartubus P-BT (NIKON GmbH, Düsseldorf) verwendet. Das Auflichtstativ wurde so umgebaut, dass das Mikroskop horizontal fokussiert werden konnte. Hierzu wurde eine Mikroskophalterung hergestellt, die aus zwei Streben (Quadratprofil S-40) und einer Halterungsplatte (Material: AlMg3, Stärke 10 mm) bestand (Abb. 2.9). Die Platte wurde an den Streben mit M6x20, DIN 912, mit Unterlegscheiben und Nutensteinen L verbunden. Die Innengewinde des Spannbügelsatzes S-40 wurden in die Streben geschraubt und die Streben dann an der Käfigtischplatte mit M6x20 und Unterlegscheiben befestigt. Als oberer Abschluss der Streben wurden Kopfplatten (Material: AlMg3, Stärke 4 mm) mit M6x20, DIN 7991 aufgesetzt. Das

2. Material und Methoden

Auflichtstativ des Stereomikroskops wurde schließlich mit den mitgelieferten M5-Schrauben an der Halterungsplatte montiert.

Um eine präzise Handhabung beim Auftragen des Lipids und der Zugabe der Liposomen zu gewährleisten, wurde eine Armstütze (Quadratprofil S-40) zwischen der rechten Strebe der Mikroskophalterung und der Perfusionsstrebe eingebaut. Die Stütze wurde mit mehreren Lagen Schaumstoff (Verpackungsmaterial) umwickelt, die mit Kabelbindern fixiert wurden.

2.1.10.8 Messtischträger und Reiter

Messkammertisch, Headstage, Perfusion, Erdungsblock und Lichtwellenleiter sind über Trägerelemente des Profilsystems X 95 (LINOS, Abb. 2.9B) mit dem Messtisch verbunden.

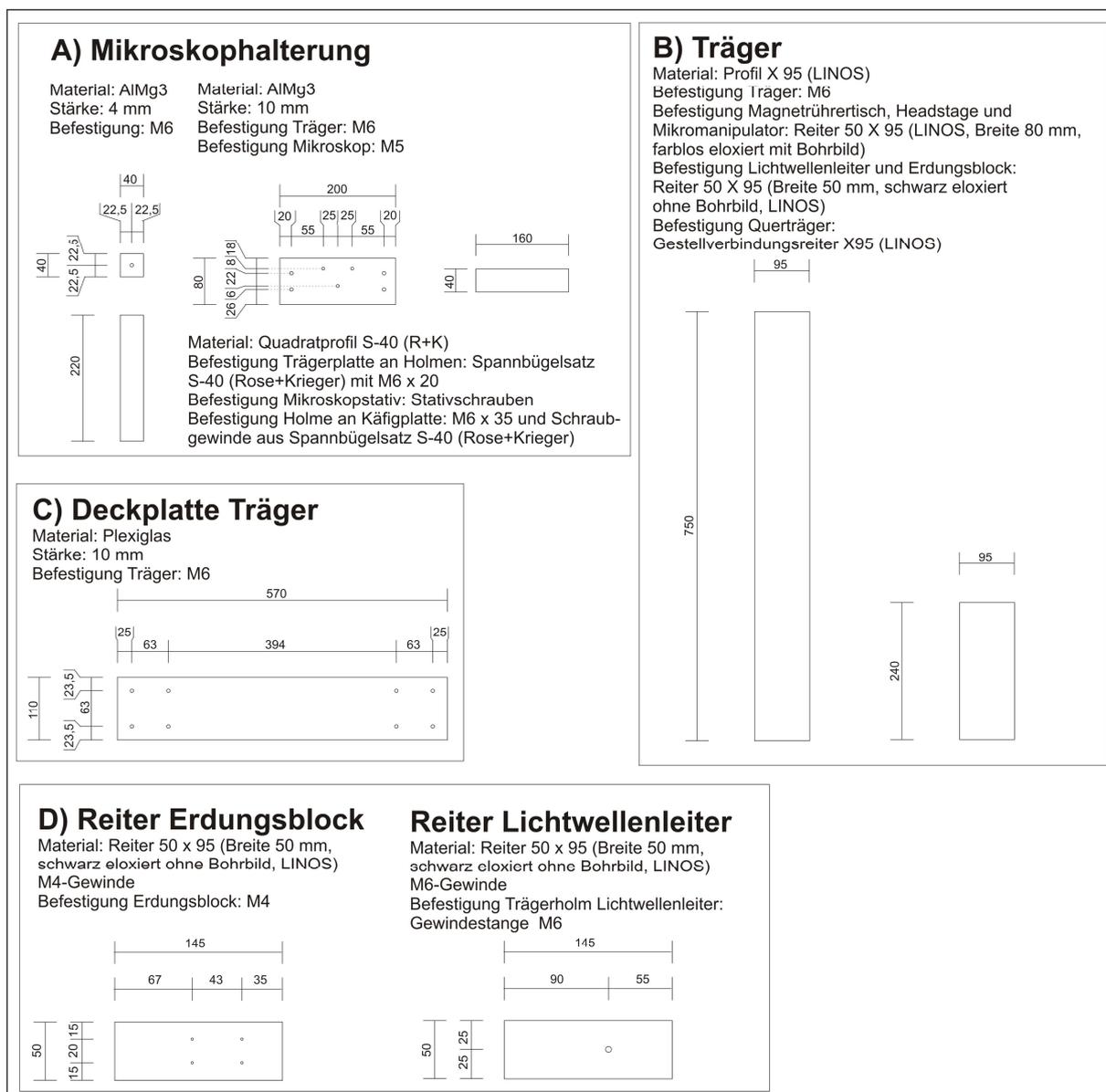


Abbildung 2.9: Konstruktionszeichnungen von (A) Mikroskophalterung, (B, C) Messtischträger und (D) Reitern. Erläuterungen siehe Kap. 2.1.10.7 und 2.1.10.8.

Zur Stabilisierung wurden die beiden senkrechten Trägerholme (Abb. 2.9B links) über eine Deckplatte (Material: Plexiglas, Stärke 10 mm, Werkstatt Botanisches Institut, Abb. 2.9C) miteinander verbunden. Die Träger wurden an der Messkammertischplatte und der Deckplatte jeweils mit M6x20, DIN 912 und Unterlegscheiben verschraubt. Das horizontale Trägerelement (Abb. 2.9B rechts) wurde über einen Gestellverbindungsreiter X 95 (LINOS) mit dem rechten senkrechten Träger verbunden. Zur Befestigung von Messkammertisch, Headstage und Perfusion wurden Reiter 50 X 95, Breite 80 mm verwendet, Lichtwellenleiter und Erdungsblock wurden über Reiter 50 X 95, Breite 50 mm (schwarz eloxiert, ohne Bohrbild, LINOS) an die Träger montiert. Zur Verschraubung des Erdungsblocks wurden M4-Gewinde und zur Befestigung des Lichtwellenleiters M6-Gewinde in die Reiter geschnitten (siehe Abb. 2.9D).

2.1.10.9 Perfusion

Die Perfusion dient dem Austausch der Salzlösungen in der Messkammer. Das System besteht aus einer auf der Käfigtischplatte montierten Strebe mit Spritzenhaltern, an denen Spritzen (60 ml, Dispomed Witt, Gelnhausen) über Senkrechtpanner mit Winkelfuß (Hoffmann GmbH Qualitätswerkzeuge, München) fixiert sind. Von diesen führen Silikonschläuche (Länge: 80 cm, Ø 4 mm) zu einem manuell per Mikromanipulator justierbaren Arm, an dessen Ende Adaptern die Schläuche mit Injektionsnadeln verbinden. Über den Mikromanipulator können die Nadeln in die Halbkammern der Messkammer eingeführt werden.

Innengewinde des Spannbügelsatzes S-40 wurden in den Trägerholm (Quadratprofil S-40, Abb. 2.10A) geschraubt und dieser dann mit M6x20 und mit einer Unterlegscheibe an der Käfigtischplatte befestigt. Als oberer Abschluss der Streben wurde eine Kopfplatte (Material: AlMg3, Stärke 4 mm) mit M6x20, DIN 7991 aufgesetzt. Wie in Kap. 2.1.10.7 erwähnt, wurde eine Armstütze als Verbindung zwischen Mikroskophalterung und Perfusionsstütze montiert.

Die Spritzenhalter wurden aus Alu-Stangenmaterial (40x50 mm, Alu Meier) gefertigt (Abb. 2.10C). Zur Fixierung der Spritzen wurden Fugen in die Halter gefräst. Die Spritzenhalter wurden über zwei M6x25, DIN 912 (aus dem Spannbügelsatz S-40) und Nutenstein L an der Strebe befestigt. Hierfür wurden Öffnungen (Ø 6,4 mm) in den Boden des Spritzenhalters gebohrt. Zum Versenken der Schraubenköpfe wurden diese im oberen Bereich auf Ø 11 mm erweitert.

Für die Montage der Senkrechtpanner (mit M4x10, DIN 84) wurden M4-Gewinde seitlich in die Spritzenhalter geschnitten. Die Klemmhalterung zur Fixierung der Spritze (Abb. 2.10B)

2. Material und Methoden

wurde aus Kunststoff (Werkstatt Botanisches Institut) hergestellt und mit einem zentralen M5-Gewinde ausgestattet (Befestigung mit M5x30, DIN 933 mit Kontermutter M5,

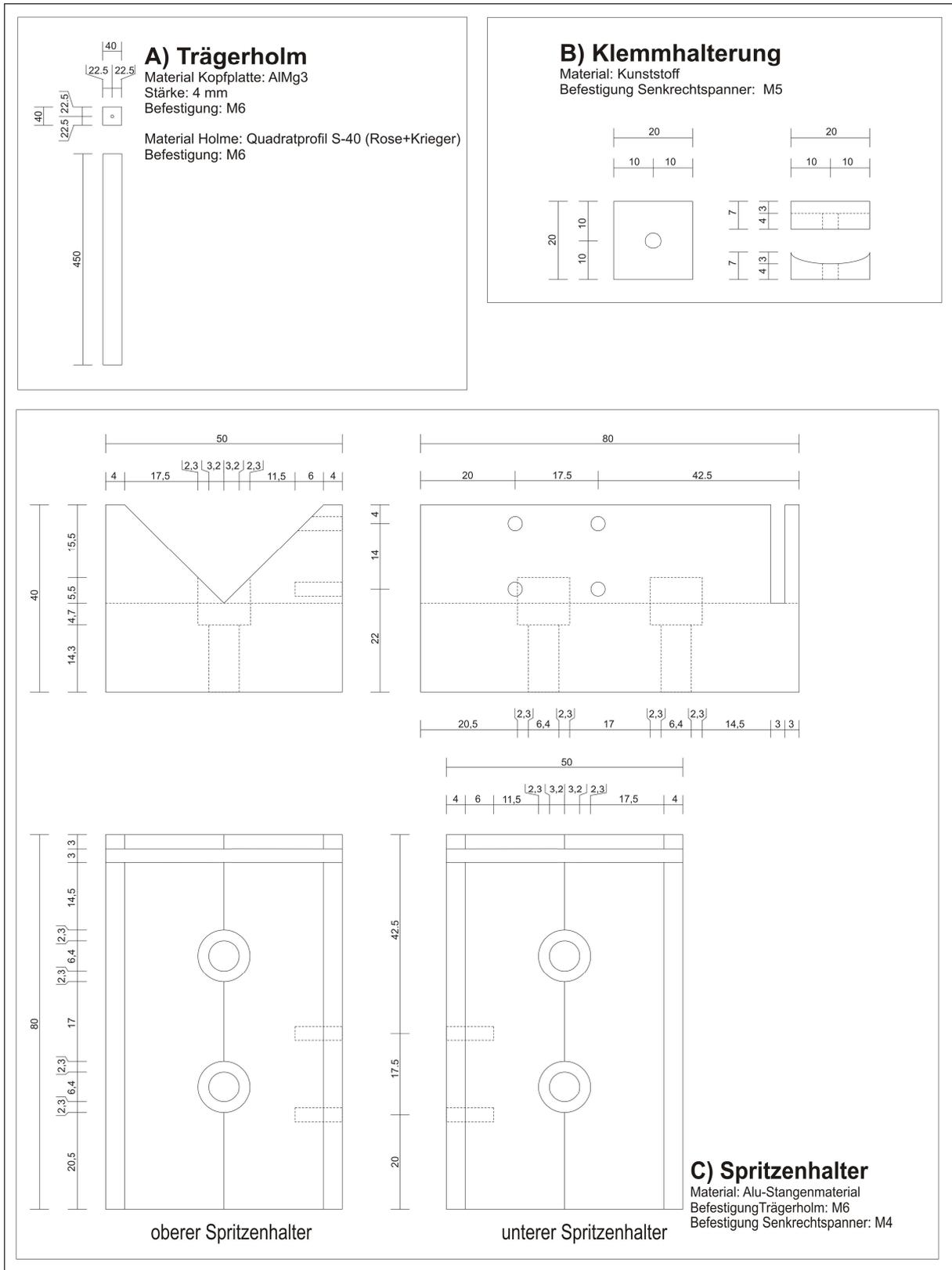


Abbildung 2.10: Konstruktionszeichnungen der Perfusion (Baugruppe Käfigtischplatte). Erläuterungen siehe Kap. 2.1.10.9.

2. Material und Methoden

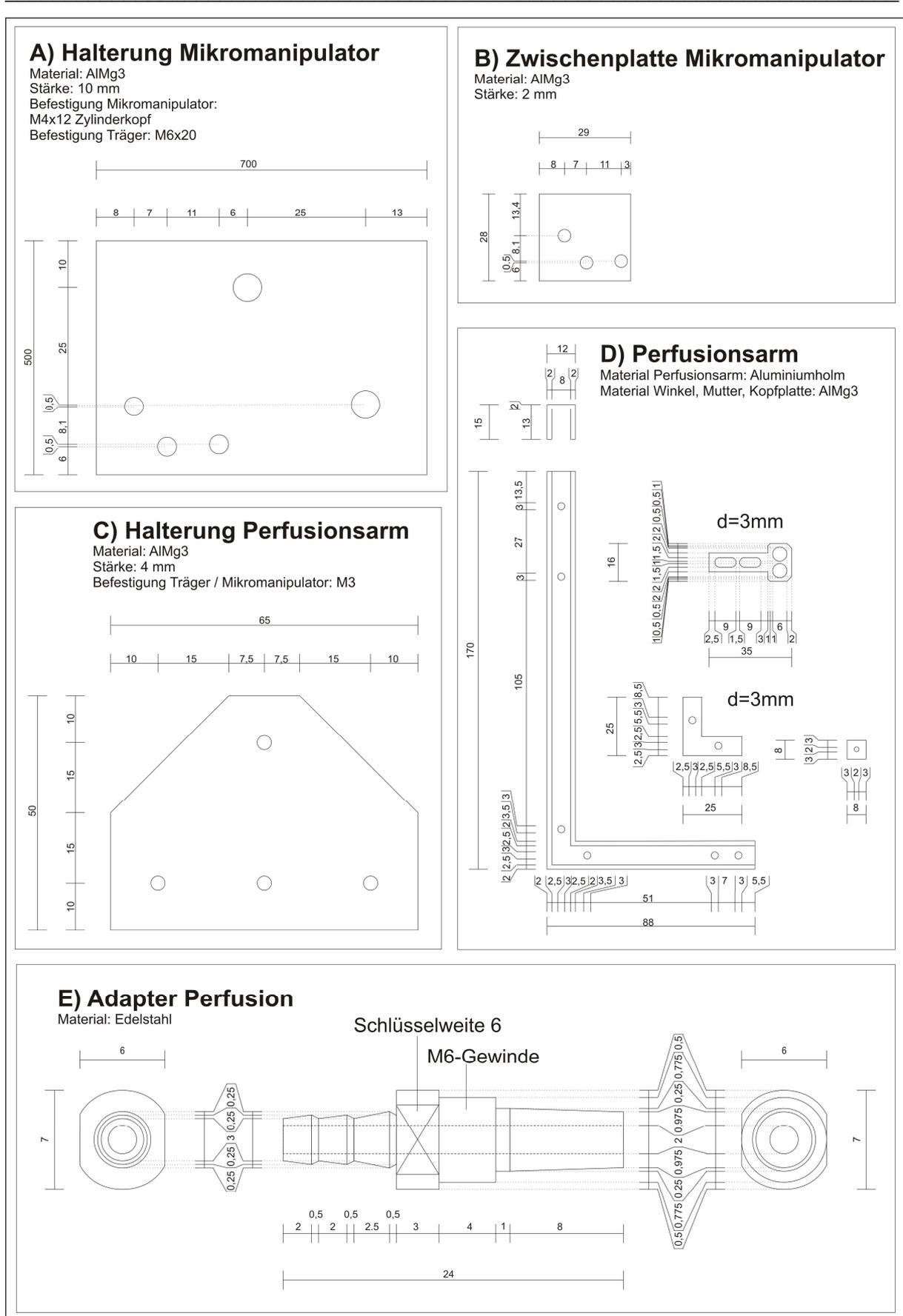


Abbildung 2.11: Konstruktionszeichnungen der Perfusion (Baugruppe Messtisch). Erläuterungen siehe Kap. 2.1.10.9.

DIN 934). Der Mikromanipulator zur Justierung des Perfusionsarms wurde mit M4x12, DIN84 (mit Zylinderkopf) über eine Zwischenplatte (Material: AlMg3, Stärke 2 mm, Abb. 2.11B) an einer Halterung (Abb. 2.11A) befestigt. Die Zwischenplatte wurde zur besseren Handhabung der Mikromanipulatortriebe benötigt. Die Halterung wurde mit M6x20, DIN 912 mit einem Reiter 50 X 95, Breite 80 mm (LINOS) verbunden, der am linken Messtischträger montiert wurde.

Der Perfusionsarm (Abb. 2.11D) wurde aus einem Aluminiumholm (Werkstatt Botanisches Institut) hergestellt, um die Perfusionsschläuche versenken zu können. Der rechtwinklige Knick wurde durch Heraussägen eines Keils mit anschließendem Verschweißen der Kanten erreicht. Die Stabilität des Perfusionsarms wurde erhöht, indem der rechtwinklige Knick durch einen Innenwinkel (Material: AlMg3, Stärke 3 mm, Abb. 2.11D unten Mitte) unterstützt wurde, in den zwei M3-Gewinde geschnitten und mit M3x8, DIN 963 am Arm fixiert wurden. Zur Befestigung des Arms am Mikromanipulatortrieb wurde eine Halterung (Material: AlMg3, Stärke 4 mm, Abb. 2.11C) hergestellt, die über M3x6, DIN 84 mit dem Mikromanipulator verbunden wurde. Der Perfusionsarm selbst wurde ebenfalls mit M3x6, DIN 84 an der Halterung montiert, in die hierfür zwei M3-Gewinde geschnitten wurden. In der Spitze des Arms wurde eine Halterung (Material: AlMg3, Stärke 3 mm, Abb. 2.11D oben Mitte) mit zwei M3x8, DIN 963 und selbst produzierten Muttern mit M3-Gewinde (Material: AlMg3, Stärke 3 mm, Abb. 2.11D rechts) befestigt. In die Spitze der Halterung wurden zwei M6-Gewinde geschnitten, in die die Adapter (Material: Edelstahl, Werkstatt Botanisches Institut, Abb. 2.11E) geschraubt wurden. Die Adapter wurden auf der Drehbank so geformt, dass mit ihnen auf der einen Seite die Silikonschläuche, auf der anderen Seite die Infusionskanülen (Dispomed Witt) fest verbunden werden konnten. Weiterhin besitzen die Adapter ein M6-Gewinde zur Verschraubung in der Perfusionshalterung sowie ein Kopfstück zur Verwendung eines 6mm-Schraubenschlüssels. Die Infusionskanülen wurden am vorderen Ende gekappt, so dass eine glatte Spitze entstand. Außerdem wurden die Infusionskanülen so zusammengebogen, dass sie in Kontakt miteinander standen, was einerseits eine einfachere Einführung in die Halbkammern ermöglichte, andererseits die Erdung vereinfachte, da hierdurch lediglich eine Kanüle mit einem Erdungskabel verlötet werden musste.

2.1.10.10 Halterung Lichtwellenleiter und Halterung Headstage

Der Lichtwellenleiter wurde über einen Reiter 50 X 95, Breite 50 mm (Abb. 2.9D rechts, schwarz eloxiert, ohne Bohrbild, LINOS) am horizontalen Trägerelement befestigt. Hierzu wurde ein M6-Gewinde in den Reiter geschnitten. Über ein Innengewinde des

2. Material und Methoden

Spannbügelsatzes S-40 wurde eine kurze Strebe (Abb. 2.12E unten rechts, Quadratprofil S-40) mit einer M6-Gewindestange (Abb. 2.12E unten rechts, Alu Meier) an den Reiter montiert. Die Strebe wurde mit einer Kopfplatte (Abb. 2.12E oben links, Material: AlMg3, Stärke 4 mm, Alu Meier) abgeschlossen, die über eine M6-Mutter, DIN 934 fixiert wurde. Die Halterungsstange des Lichtleiters (Abb. 2.13B, \varnothing 12 mm, Edelstahl, Werkstatt Botanisches Institut) wurde über eine Klemmvorrichtung (Abb. 2.12A, Alu-Stangenmaterial 40x50 mm, Alu Meier) an der Strebe befestigt. Dabei diente die benötigte M6x30-Schraube (DIN 912) sowohl zum Festklemmen der Halterungsstange, als auch zur Fixierung der Klemmvorrichtung (über Nutzenstein F) an der Strebe. In die Spitze der Halterungsstange wurde ein M4-Gewinde geschnitten, mit dem der Halterungsadapter (Abb. 2.12C, Material:

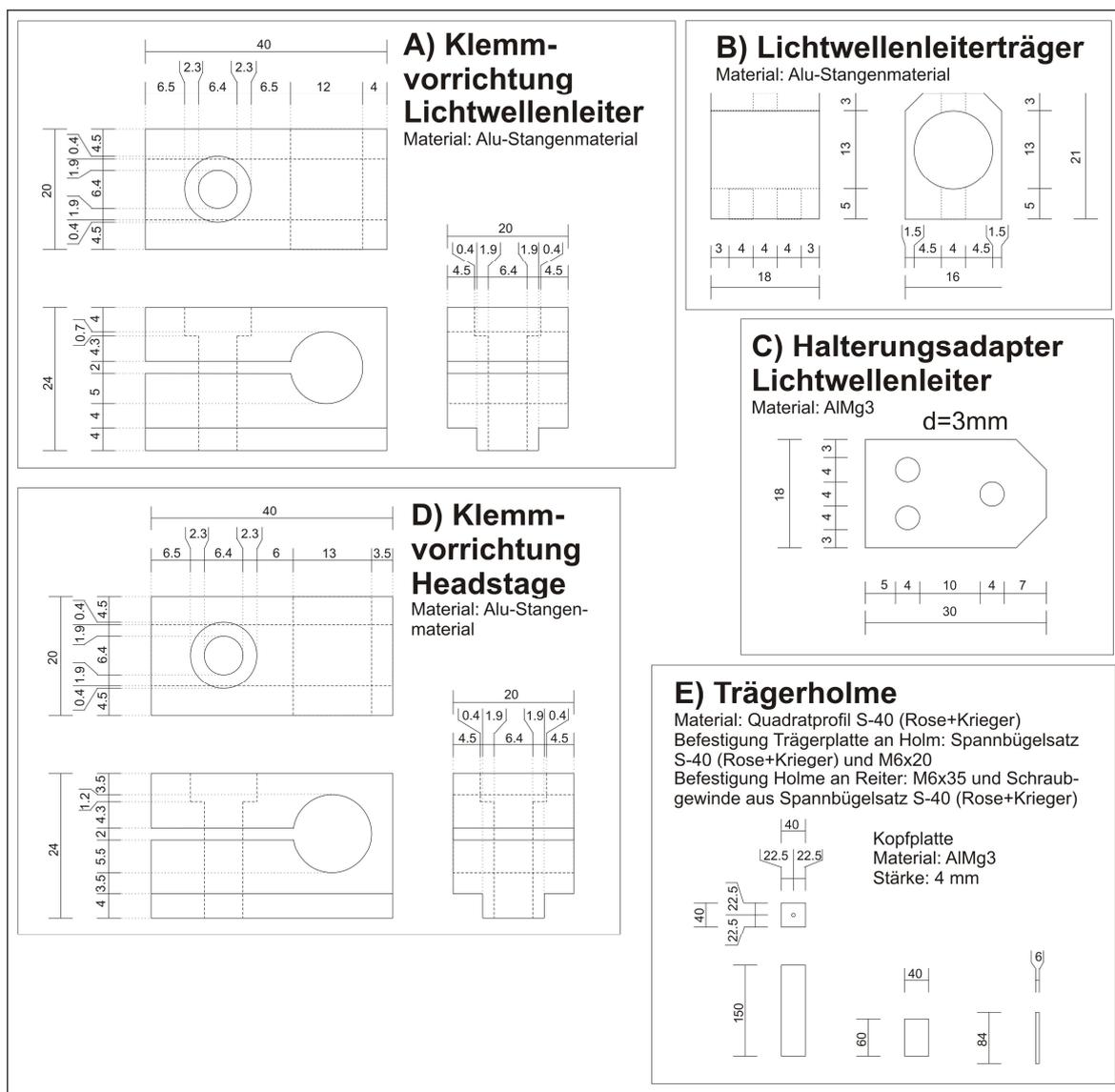


Abbildung 2.12: Konstruktionszeichnungen Headstagehalterung und Lichtwellenleiterhalterung, Teil 1. Erläuterungen siehe Kap. 2.1.10.10.

2. Material und Methoden

AlMg3, Stärke 3 mm, Alu Meier) an der Stange befestigt werden konnte (mit M4x8, DIN 84). In den Lichtwellenleiterträger (Abb. 2.12B, Alu-Stangenmaterial 40x50 mm, Alu Meier), mit dem letztlich der Kopf des Lichtwellenleiters fixiert wurde, wurden drei M4-Gewinde geschnitten. Zum Schutz des Lichtwellenleiters wurde dessen Kopf in eine Aufsteckhülse (Abb. 2.13C, Material: Kunststoff (POM), Werkstatt Botanisches Institut) geschoben. Über zwei M4x8, DIN 84 wurde der Träger mit dem Adapter verbunden, über eine weitere M4x8-Schraube (ähnlich DIN 84, Material: Kunststoff, Werkstatt Botanisches Institut) wurde der Lichtwellenleiter samt Aufsteckhülse fixiert. Die Headstage (CV-5-1GU, Axon Industries, Union City, USA) wurde über einen Reiter 50 X 95, Breite 80 mm (LINOS) am linken Messtischträger befestigt. In eine Strebe (Abb. 2.12E unten links, Quadratprofil S-40) wurden zwei Innengewinde des Spannbügelsatzes S-40 eingeschraubt und mit M6x20, DIN 912 an den Reiter montiert. Als oberer Abschluss der Strebe wurde eine Kopfplatte (Abb. 2.12E oben links, Material: AlMg3, Stärke 4 mm) mit M6x20, DIN 7991 aufgesetzt. Die Halterungsstange der Headstage (Abb. 2.13A links, Ø 13 mm, Material: Edelstahl, Werkstatt

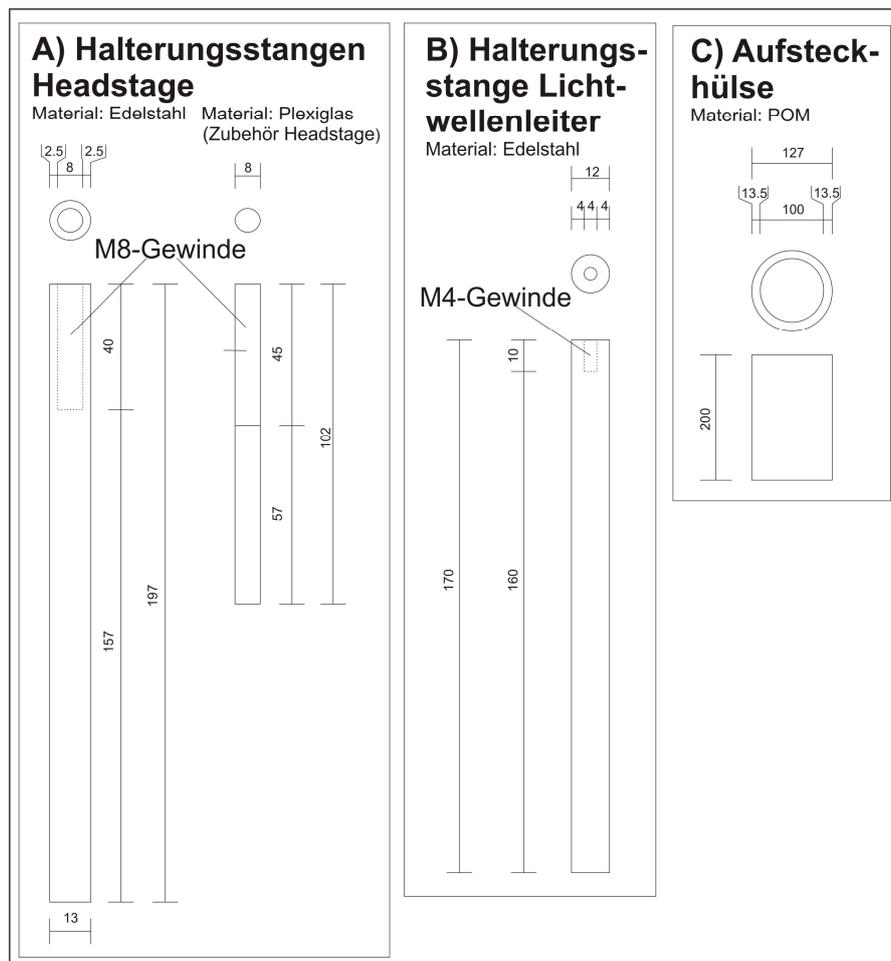


Abbildung 2.13: Konstruktionszeichnungen Headstagehalterung und Lichtwellenleiterhalterung, Teil 2. Erläuterungen siehe Kap. 2.1.10.10.

Botanisches Institut) wurde über eine Klemmvorrichtung (Abb. 2.12D, Alu-Stangenmaterial 40x50 mm, Alu Meier) an der Strebe befestigt. Dabei diente die benötigte M6x30-Schraube (DIN 912) sowohl zum Festklemmen der Halterungsstange, als auch zur Fixierung der Klemmvorrichtung an der Strebe (über Nutzenstein F). In die Spitze der Halterungsstange wurde ein M8-Gewinde geschnitten, mit dem die mitgelieferte Plexiglashalterung der Headstage (Abb. 2.13A rechts, Axon Industries), in die ein M8-Außengewinde geschnitten worden war, in die Halterungsstange geschraubt und mit einer M8-Mutter (DIN 934) fixiert werden konnte.

2.1.10.11 Headstage (CV-5-1GU)

Um Spannungsspitzen beim Einschalten des Geneclamp 500B-Verstärkers (Axon Industries) bzw. beim Perfundieren der Halbkammern zu vermeiden, wurde die Headstage mit einem Unterbrechungsschalter (Kippschalter, Conrad Electronic GmbH, Hirschau) ausgerüstet. Hierzu wurde die Kammer geöffnet und der Schalter in die Leitung zwischen Messelektrode und Verstärker eingebaut (Abb. 2.14C). Um den Kippschalter in die Headstage integrieren zu können, wurden an der Frontseite (Abb. 2.14A) und in die Deckenplatte (Abb. 2.14B)

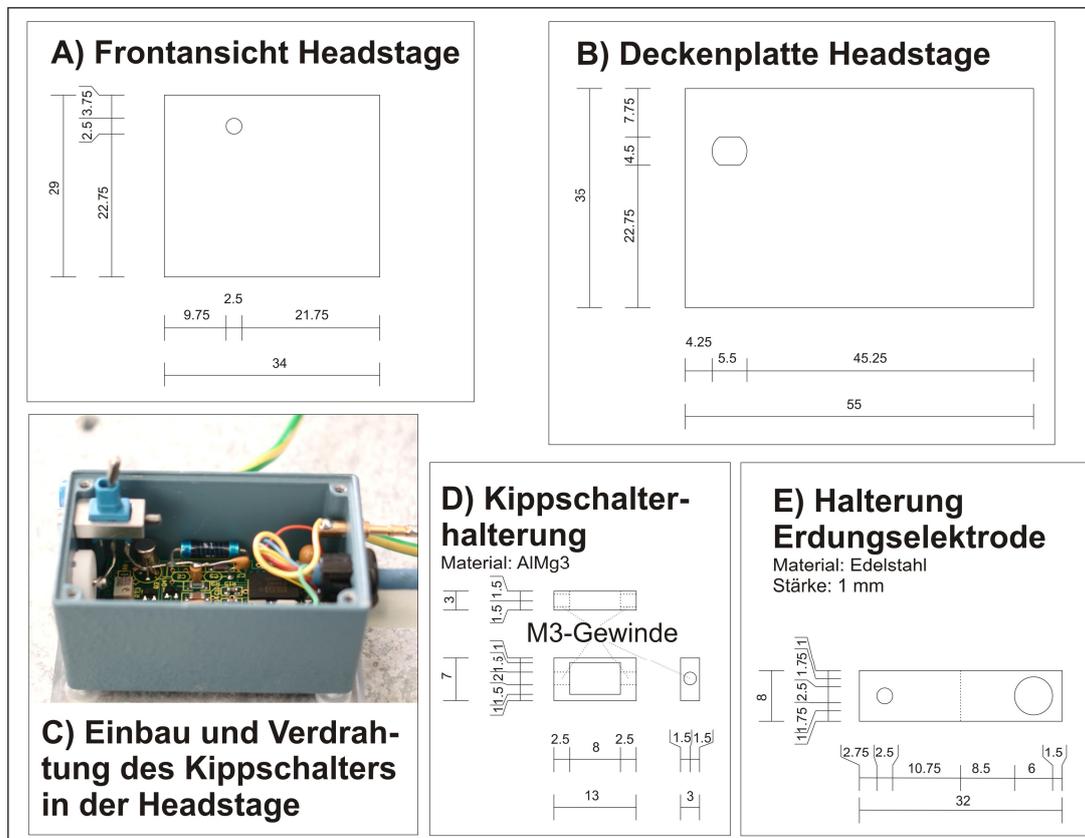


Abbildung 2.14: Konstruktionszeichnungen zum Einbau des Kippschalters in die Headstage und zur Halterung der Erdungselektrode. Erläuterungen siehe Kap. 2.1.10.11.

2. Material und Methoden

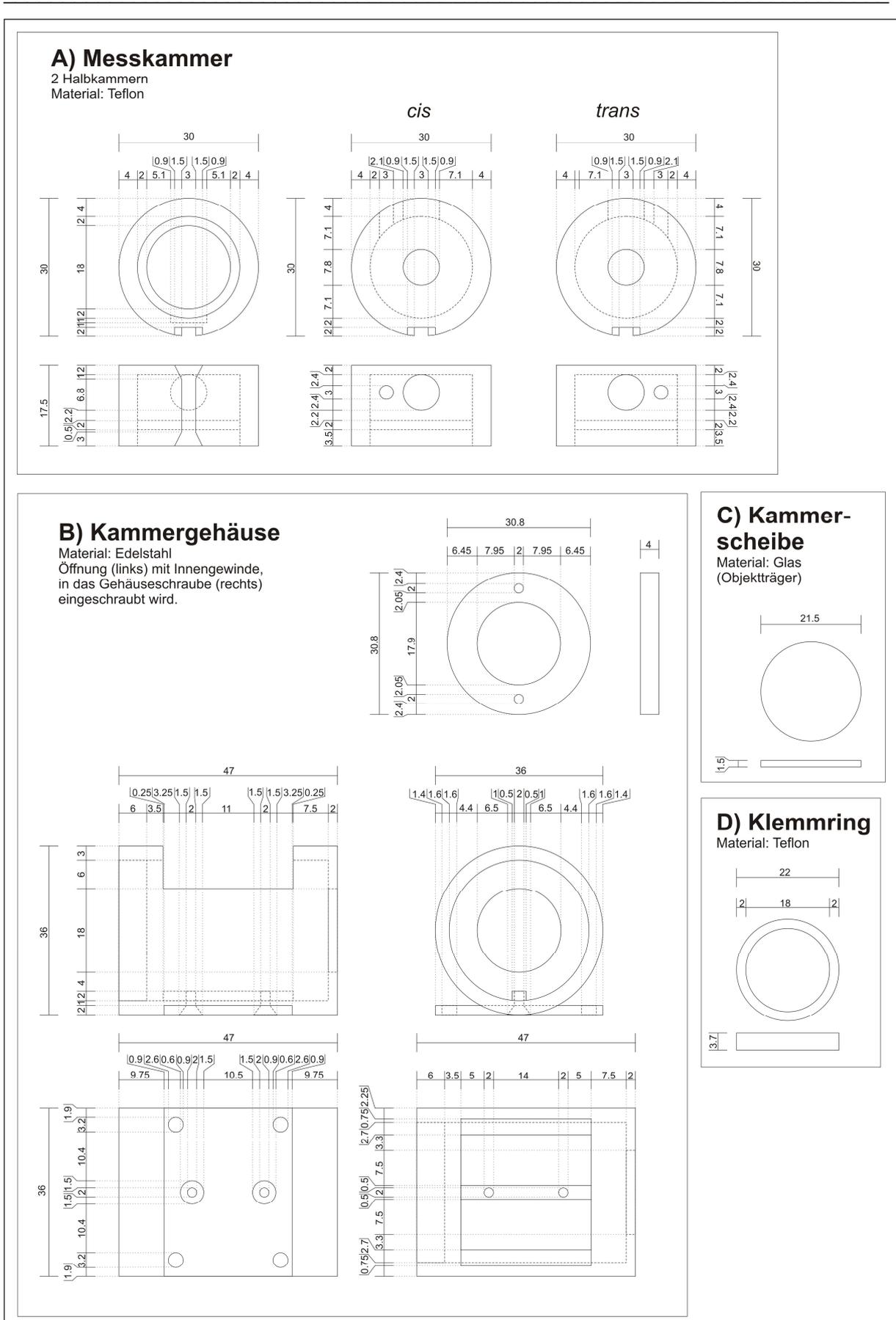


Abbildung 2.15: Konstruktionszeichnungen der Messkammer. Erläuterungen siehe Kap. 2.1.10.12.

2. Material und Methoden

Öffnungen gebohrt. Zudem wurde eine Halterung für den Kippschalter hergestellt (Abb. 2.14D), mit der der Schalter in der Headstage fixiert werden konnte. Hierzu wurden M3-Gewinde in die Stirnseiten geschnitten. Der Kippschalter wurde über das hintere Gewinde mit M3x6, DIN 84 fixiert, die Halterung wurde an der Headstage über das vordere Gewinde mit M3x6, DIN 84 befestigt (Abb. 2.14C). Als Referenzelektrode zur Headstage wurde eine geerdete Elektrode verwendet, die in die *cis*-Halbkammer ragt (siehe Abb. 3.1B). Hierzu wurde eine Halterung aus Edelstahl hergestellt (Abb. 2.14E). Diese wurde in der Mitte der Längsseite um 90° gebogen und mit M3x12, DIN 84, M3-Mutter, DIN 934 und einer Unterlegscheibe durch die bestehende Öffnung in der Acrylbodenplatte an der Headstage fixiert. Für die Referenzelektrode wurde ein Bananenstecker (Conrad Electronic GmbH) verwendet. Die passende Buchse (Conrad Electronic GmbH) wurde in die Halterung eingebaut. An die Buchse wurden Erdungskabel zur Erdungsbuchse der Headstage (über den mitgelieferten Erdungsstecker) sowie zum Erdungsblock (siehe Kap. 2.1.10.13) gelötet.

2.1.10.12 Messkammer

Die Messkammer wurde von der Feinmechanik-Werkstatt der Universität Osnabrück

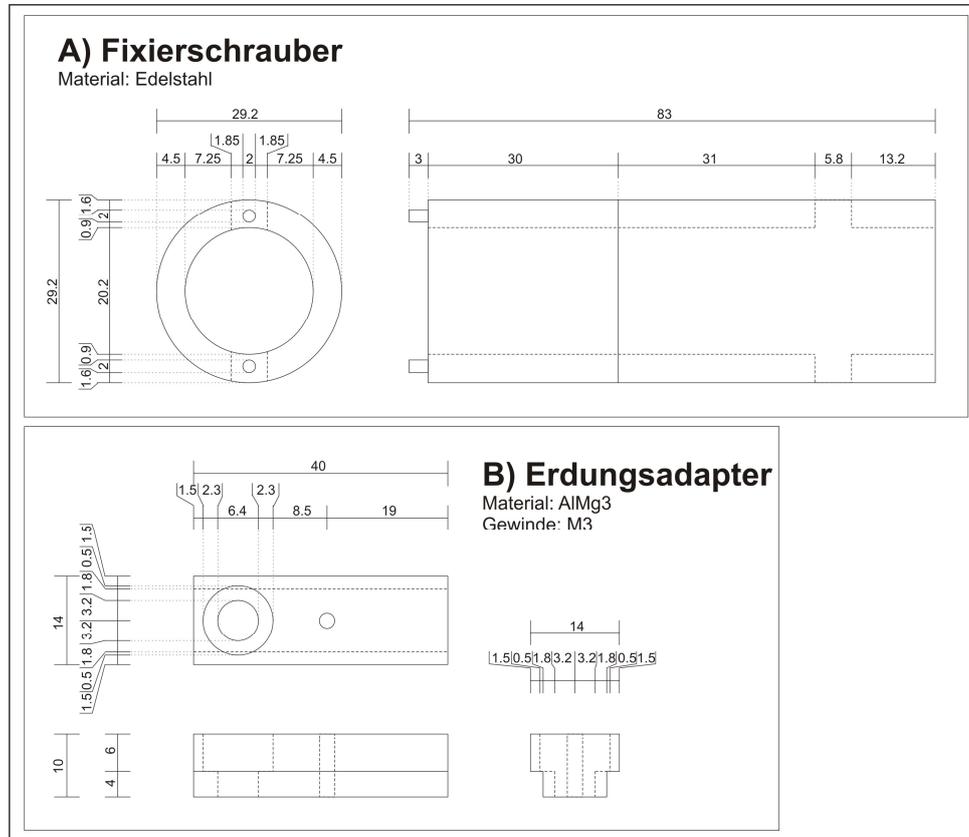


Abbildung 2.16: Konstruktionszeichnungen des Fixierschraubers und des Erdungsadapters. Erläuterungen siehe Kap. 2.1.10.12 und 2.1.10.13.

hergestellt und besteht aus zwei Teflonhalbkammern (Abb. 2.15A, *cis* und *trans*), die in ein Metallgehäuse (Abb. 2.15B Mitte und unten) eingebaut und mit einer Mutter (Abb. 2.15B oben) fixiert wurden. Die Fixierung wurde mit einem mitgelieferten Schraubwerkzeug (Abb. 2.16A) durchgeführt. Zur optischen Kontrolle wurden die Halbkammern mit Glasscheiben (Abb. 2.15C) ausgestattet, die jeweils über einen Teflonring (Abb. 2.15D) und Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA) mit den Halbkammern verbunden wurden (siehe Kap. 2.2.3.4). Abb. 3.1B zeigt eine komplett montierte Messkammer.

2.1.10.13 Erdungsblock und Erdung

Der Erdungsblock (Conrad Electronic) wurde mit M4x8, DIN 84 an einen Reiter 50 X 95, Breite 50 mm (Abb. 2.9D links, schwarz eloxiert, ohne Bohrbild, LINOS) montiert, in den M4-Gewinde geschnitten worden waren, und am linken Messtischträger befestigt. Erdungskabel wurden von folgenden Bauteilen zum Erdungsblock gelegt: Perfusion (Injektionsnadeln), Headstage (Erdungselektrode), Käfiggerüst, Magnetrüherabschirmung, Messkammertisch und GeneClamp 500B-Verstärker. Hierfür wurden Erdungskabel (Farbcode grün/gelb, Werkstatt Botanisches Institut) verwendet, die über Stiftkabelschuhe und Isoliertüllen (beides Conrad Electronic) mit dem Erdungsblock verbunden wurden. Die Abschirmung des Magnetrüherkabels wurde über einen Ringkabelschuh und M3x6, DIN 84 am Messkammertisch befestigt (Abb. 2.7 „Linke Seite“). Zur Erdung des Käfiggerüsts wurde ein Erdungsadapter (Abb. 2.16B, Alu-Stangenmaterial 40x50 mm, Alu Meier) hergestellt, der mit dem Gerüst über einen Nutzenstein F verbunden wurde. Das Erdungskabel wurde über einen Ringkabelschuh mit M3x6, DIN 84 am Erdungsblock fixiert. Zur Erdung des GeneClamp 500B-Verstärkers wurde ein Bananenstecker (Werkstatt Botanisches Institut) verwendet.

2.1.10.14 Werkzeug

Zur Durchführung von Reparaturen wurden folgende Werkzeuge beschafft (jeweils Hoffmann GmbH):

2 Einmaulschlüssel DIN 894 6 mm

2 Einmaulschlüssel DIN 894 10 mm

1 Sechskant-Winkelschraubendreher DIN 911 1,5 mm

1 Sechskant-Winkelschraubendrehersatz DIN 911 (Inhalt mm: 2 2,5 3 4 5 6)

1 Sechskant-Kugelpkopfschraubendreher 4 mm

1 Schraubendreher-Sortiment (Inhalt Schlitz: 1 2 3 4, Kreuzschlitz (Phillips): 1 2)

1 Flachrundzange 160 mm

Zudem wurde eine Lötstation MS 250 S (Conrad Electronic) zur Herstellung der Elektroden beschafft.

2.1.10.15 Geräteeinstellungen

Die Einstellungen an der Frontseite des GeneClamp 500B wurden während der Messungen wie folgt gewählt:

MODE: SETUP

DC METERS: oben: V3, mV; unten: I3, nA

SCALED OUTPUT: I3, FREQ.: 2k, Gain x1, V/nA.

Vor Beginn der Messungen wurde ein Nullabgleich der Messelektroden vorgenommen. Hierfür wurde bei symmetrischen Elektrolytkonzentrationen in der Messkammer und eingeschalteter Headstage auf der Frontseite des GeneClamp 500B im Bereich „ELECTRODE #3 (PATCH)“ die Taste „ZERO I3“ gedrückt. Bei funktionierenden Messelektroden lief nun innerhalb von etwa 10 s die Stromstärke-Anzeige im Bereich „DC METERS“ vom negativen zum positiven Extremmesswert (-10,22 bis 10,24 nA).

2.1.10.16 Softwareeinstellungen

Vor Beginn der Versuche musste der AD/DA-Wandler Digidata 1322A zunächst im Programm Clampex (Axon Industries) detektiert und kalibriert werden (über den Menüpunkt <Configure> <Digitizer>).

Im Menüpunkt <Configure> <Lab Bench> wurden die folgenden Einstellungen gewählt:

Reiter „Input Signals“ Digitizer Channels: Analog IN #0; Signals: IN 0

IN 0 Scaling: Signal units: pA; Scale factor: 0,001 V/pA; Offset: 0

IN 0 Software RC Filter: Lowpass 20 kHz

Reiter „Output Signals“ Digitizer Channels: Analog OUT #0; Signals: Cmd 0 Analog OUT #1; Signals: Cmd 1

Cmd 0: Signal units: mV; Scale factor: 20 mV/V; Holding level: 0 mV

Set digital OUT bit high during acquisition: \surd Digital Bit: 4

Cmd 1: Signal units: mV; Scale factor: 10 mV/V; Holding level: 0 mV

Set digital OUT bit high during acquisition: \surd Digital Bit: 4

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Bio-Photometer (Eppendorf AG, Hamburg) bei 260 nm. Eine optische Dichte von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA [68].

2.2.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

100 ml 2YT-Medium wurden mit *E. coli* (Stamm DH5α bzw. BL21) beimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 0,4 - 0,6 inkubiert [68]. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt, die Zellen pelletiert (5000 x g, 10 min, 4 °C), in 50 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 5 ml 0,1 M CaCl₂ inkl. 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Aliquots (200 µl) wurden in N_{2,liq.} schockgefroren und bis zur Benutzung bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3 Hitzeschocktransformation

Zu 200 µl chemisch kompetenten Zellen wurden ca. 100 ng Plasmid-DNA zugegeben und die Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock (90 s, 42 °C). Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurde 1 ml 2YT-Medium zugegeben und der Transformationsansatz zur Expression der Antibiotikaresistenz 1 h bei 37 °C inkubiert. Vom Ansatz wurden 200 µl auf 2YT-Festmedium+Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini-Prep)

4 ml Flüssigkultur wurden mit Einzelkolonien von *E. coli* angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. 1,5 - 3 ml dieser Kultur wurden pelletiert (18000 x g, 1 min) und in 300 µl Puffer P1 (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 0,1 mg/ml RNase; 4 °C) resuspendiert. 300 µl Lysispuffer P2 (0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS; RT) wurden zugegeben und vorsichtig gemischt. 300 µl Puffer P3 (3 M K-Acetat; mit Eisessig auf pH 5,5 eingestellt; 4 °C) wurden zugegeben, vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (15500 x g, 10 min, 4 °C), und der Überstand in ein Reaktionsgefäß, in das

600 µl Isopropanol vorgelegt worden waren, überführt und sorgfältig gemischt. Die DNA wurde pelletiert (15500 x g, 30 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut pelletiert (15500 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in 30 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Überexpression rekombinanter Proteine

Die Überexpression von Proteinen wurde im Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) durchgeführt. Nach der Transformation der Zellen (siehe 2.2.1.3) wurden zunächst Vorkulturen (40 ml, 2YT+Amp.) durch Überimpfen von Einzelkolonien angelegt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Vorkulturen wurden dann in die Hauptkulturen (500 ml, 2YT+Amp.) überimpft und diese im Schüttler inkubiert (220 rpm, 37 °C). Nach Anwachsen der Kulturen auf eine OD₆₀₀ = 0,6 - 0,8 wurde die Expression der plasmidkodierten rekombinanten Proteine durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kulturen für 3 h bzw. über Nacht inkubiert (220 rpm, 37 °C). Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5000 x g, 10 min, 4 °C) geerntet, in N_{2,liq.} schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2 Aufreinigung von Hexahistidin-Fusionsproteinen über Ni-NTA

Proteine mit einem His₆-Tag wurden mittels Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Dafür wurde das Bakterienpellet aus Kap. 2.2.2.1 aufgetaut und auf Eis in 100 ml Resuspensionspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 200 mM NaCl; 10 mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Die Zellen wurden in der French Press (1200 psi) aufgeschlossen. Anschließend wurde zweimal 30 s sonifiziert (50 % Intensität, 50 % Zyklus) und die festen Bestandteile durch Zentrifugation (25000 x g, 30 min, 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde in 40 ml Aufschlusspuffer (8 M Harnstoff; 150 mM NaCl; 50 mM NaP_i, pH 7,0) über Nacht bei RT im Überkopfschüttler gelöst und inkubiert, um das überexprimierte, in Inclusion Bodies vorliegende Protein zu denaturieren und in Lösung zu bringen. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (25000 x g, 30 min, 4 °C) sedimentiert. Um das Protein an Ni-NTA zu binden, wurde der Überstand auf eine Säule gegeben, die mit 500 µl Ni-NTA-Agarose befüllt war. Die Säule war zuvor durch Zugabe von 10 ml Aufschlusspuffer äquilibriert worden. Das Säulenmaterial wurde in zwei Waschrufen mit

je 20 ml Waschpuffer 1 (8 M Harnstoff; 150 mM NaCl; 50 mM NaP_i, pH 7,0; 0,2 % (v/v) Triton X-100) und Waschpuffer 2 (8 M Harnstoff; 1 M NaCl; 50 mM NaP_i, pH 7,0; 15 mM Imidazol) von unspezifisch gebundenen Proteinen gereinigt. Anschließend wurde das gebundene Protein mit 3 ml Elutionspuffer (8 M Harnstoff; 150 mM NaCl; 50 mM NaP_i, pH 7,0; 500 mM Imidazol; Puffervolumen: 3 x 1 ml) von der Ni-NTA-Säule eluiert. Die Eluatfraktionen wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3 Protein-Konzentrationsbestimmung

Protein-Konzentrationsbestimmungen wurden nach Bradford [69] durchgeführt. Verwendet wurde hierfür das Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, München), die Absorption wurde bei 595 nm bestimmt. Eine Eichgerade wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standardprotein erstellt.

2.2.2.4 SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von denaturierten Proteinen in Abhängigkeit ihrer relativen Molekülmasse wurde nach Laemmli [70], die Anfärbung mit Coomassie nach Sambrook et al. [68] durchgeführt.

2.2.2.5 Western-Blot

Der Transfer von geelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen wurde nach Towbin et al. [71] im Semi-Dry-Verfahren durchgeführt, die Immundekoration erfolgte nach Sambrook et al. [68] mit den angegebenen Antikörpern.

2.2.2.6 Rekonstitution von Kanalproteinen in Proteoliposomen

Nach der Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Material lagen die rekombinant überexprimierten Kanalproteine denaturiert in 8 M Harnstoff vor. Diese wurden mithilfe des Detergens Mega-9 (80 mM) solubilisiert. Die Mega-9-Konzentration ergibt sich aus dem dreifachen Wert der kritischen Mizellarkonzentration ($CMC_{Mega-9} = 19 - 25$). Das Lipid (L- α -Phosphatidylcholin, Typ IV-S) wurde in 80 mM Mega-9; 10 mM MOPS/Tris, pH 7,0 gelöst. Das Verhältnis von Lipid- zu Proteinkonzentration wurde auf ca. 20:1 eingestellt, um die Anzahl der rekonstituierten Kanäle pro Liposom zu minimieren. Beide Lösungen wurden vereinigt und auf dem Whirlmix gut durchmischt. Die Probe wurde mindestens 10 min bei RT inkubiert, um die Inkorporierung der Proteine in die Mischmizellen zu ermöglichen, danach in einen Dialyseschlauch (Ausschlussgröße: 3500 Da, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) überführt

und gegen 2 l Dialysepuffer (10 mM KCl; 10 mM MOPS/Tris, pH 7,0) dialysiert. Zunächst wurde 2 h bei RT dialysiert, da bei einer sofortigen Dialyse bei 4 °C die Gefahr besteht, dass Mega-9 im Dialyseschlauch präzipitiert. Danach wurde die Dialyse über Nacht bei 4 °C fortgesetzt. Die Proteoliposomen wurden in Aliquots von ca. 50 µl abgefüllt, in N_{2,liq.} schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Vor der Verwendung wurden die Proteoliposomen aufgetaut und ca. 10 s im Ultraschallbad sonifiziert, um kleinere Vesikel zu erhalten. Während der Messungen wurden die Proben auf Eis gelagert.

2.2.3 Elektrophysiologische Methoden

2.2.3.1 Herstellung und Chlorierung der Messelektroden

Zur Herstellung der Messelektroden wurde Silberdraht (Ø 0,25 mm, Chempur, Karlsruhe) an den Stecker der Headstage bzw. den Erdungsstecker gelötet, an den Plus-Pol einer Spannungsquelle angeschlossen und etwa 10 min in 2 M KCl-Lösung chloriert.

2.2.3.2 Herstellung der Salzbrücke

Die Elektroden wurden in eine Glaskapillare (Innendurchmesser: ca. 1,2 mm) eingeführt, deren unteres Ende möglichst glatt sein sollte. Die Kapillare stand ca. 10 mm über das Ende der Messelektrode über. Sie wurde in erwärmten Salzbrückenpuffer (2M KCl; 10 mM MOPS/Tris, pH 7,0 inkl. 2 % (w/v) Agarose) getaucht, bis sich der Puffer ca. 2/3 in die Kapillare hochgezogen hatte. Nachdem sich die Salzbrücke verfestigt hatte, konnte die Elektrode verwendet werden.

2.2.3.3 Herstellung der Lipidlösung

Als Stammlösung wurde eine 100 mM Lipidlösung verwendet. Hierzu wurde das Lipid (L- α -Phosphatidylcholin, Typ IV-S) in MeOH/Chloroform (1:1) gelöst.

130 µl Lipidstammlösung wurde in ein entfettetes Reagenzglas überführt und zunächst ca. 10 min im Stickstoffstrom getrocknet. Letzte Lösungsmittelreste wurden 30 min im Vakuum evaporiert. Danach wurde das Lipid in 100 µl *n*-Dekan gelöst (Endkonzentration: ca. 130 mg/ml).

2.2.3.4 Zusammenbau der Messkammer

Die Teflonteile der Messkammer wurden 10 min im Ultraschallbad in Aceton gewaschen. Die Glasscheiben wurden im Ultraschallbad mit 70 % (v/v) EtOH 10 min gereinigt. Die

Einzelteile wurden daraufhin mit fusselfreiem Papier getrocknet. Die Glasscheiben wurden in die Kammern eingelegt, danach Parafilm aufgelegt und mit dem Teflonring fixiert. Der überstehende Parafilm an der Scheibe und am Rand wurde mit einem Skalpell entfernt. Die Innenseiten der Halbkammern wurden bis ca. 5 mm vor der zentralen Öffnung mit Vakuumfett (Wacker Chemie GmbH, München) eingefettet. Um die Teflonkammern in den Metallrahmen einführen zu können, wurden sie für 5 min bei -20 °C abgekühlt. Zur Herstellung des Teflonseptums wurde mit einer Nadel ein Loch in die Teflonfolie gestochen und dieses anschließend in einer Funkenstrecke (Elektronikwerkstatt der Universität Osnabrück) ca. 20-mal beschossen. Mit dem Binokular des Messstandes wurde das Loch auf seine Größe (\varnothing 100-300 μm) und Rundung kontrolliert. Das Teflonseptum wurde so auf eine Halbkammer aufgelegt, dass das Loch möglichst mittig platziert war. Danach wurde die Messkammer komplett zusammengebaut. Falls die Messkammer nicht sofort verwendet wurde, wurde sie in Parafilm eingewickelt, um Verunreinigungen zu vermeiden. Eine zusammengebaute Messkammer ist in Abb. 3.1B gezeigt.

2.2.3.5 Versuchsvorbereitung

Die Messkammer wurde mit Elektrolytpuffer (250 mM KCl; 10 mM MOPS/Tris, pH 7,0; *cis/trans*, Bezeichnung der Halbkammern vom Experimentator aus gesehen) befüllt. Planare Lipidbilayer wurden mit der sogenannten Paintingtechnik hergestellt [72]. Dazu wurde ein Tropfen der Lipidlösung mit einer 50 μl -Hamiltonspritze, deren Spitze zur besseren Handhabung im Winkel von ca. 45° abgeknickt worden war, auf das Loch im Teflonseptum der Messkammer platziert. Nach einer Inkubationszeit von 60 min (die sowohl zur Verringerung der Dekonzentration im Lipidtropfen, als auch zur Adaptation an das Teflon dient) wurde die Lipidschicht durch wiederholtes Absenken und Anheben des Flüssigkeitsniveaus in der *trans*-Halbkammer zu einem Bilayer ausgedünnt.

Nach Ausbildung eines stabilen Bilayers wurde die Lösung in der *trans*-Halbkammer gegen 20 mM KCl; 10 mM MOPS/Tris, pH 7,0 ausgetauscht. Hierdurch wurde ein Konzentrationsgradient zwischen den Halbkammern aufgebaut, der die Fusion der Proteoliposomen mit dem Lipidbilayer ermöglichte. Zudem wurde in die *cis*-Halbkammer CaCl_2 zugegeben (Endkonzentration: 10 mM), um die Fusion der Proteoliposomen mit dem Bilayer zu erleichtern (siehe Kap. 1.4 und Abb. 1.2). Die Proteoliposomen wurden mit einer 10 μl -Hamiltonspritze (ebenfalls mit abgeknickter Spitze) in die *cis*-Halbkammer direkt unterhalb des Bilayers zugegeben, um die Liposomen in engen Kontakt mit dem Bilayer zu bringen. Außerdem wurde die *cis*-Kammer über einen Magnetrührer durchmischt, um die

Liposomenfusion mit dem Bilayer weiter zu fördern. Nach erfolgter Fusion wurden die Salzlösungen in den Halbkammern sofort durch Perfusion gegen frische Salzlösungen ausgetauscht, um die Fusion weiterer Proteoliposomen zu verhindern.

2.2.3.6 Leitwertmessungen

Der Leitwert g des Kanalproteins kann durch Messungen unter symmetrischen Bedingungen (*cis/trans* = 250 mM/250 mM KCl) bestimmt werden (Protokoll: siehe 2.2.3.6.1). Die Stromstärkendifferenz ΔI bei Schaltereignissen wird dabei in Abhängigkeit zum angelegten Kommandopotential U_{com} bestimmt und in einem Strom-Spannungs-Diagramm (U-I-Diagramm) aufgetragen. Nach dem Ohm'schen Gesetz kann aus der Steigung der linearen Regression der Messpunkte der Leitwert des Kanalproteins aus der Gleichung

$$g = \frac{1}{R} = \frac{\Delta I}{U_{\text{com}}} \quad (1)$$

bestimmt werden.

2.2.3.6.1 Protokoll zur Bestimmung des Leitwerts und des Schaltverhaltens

Hierzu wurde das Protokoll "leitwert.pro" im Menüpunkt <Acquire> <New Protocol> erstellt:

Reiter "Mode/Rate": Acquisition Mode: Gap-free

Trial Length: Use available disk space

Sampling interval per signal [μs] 20 (= 50 kHz)

Allow automatic analysis in other programs:

Reiter "Inputs": Analog IN Channels: Channel #0: IN 0

Reiter "Outputs": Analog OUT Channels: Channel #0: Cmd 0, Channel #1: Cmd 1

Reiter "Trigger": Start trial with: Immediate

2.2.3.7 Spannungsrampen

Zur Bestimmung des Umkehrpotentials U_{rev} eines Kanalproteins wurden Spannungsrampen programmiert. Hiermit ist eine lineare Veränderung des Kommandopotentials U_{com} gemeint, bei der der resultierende Stromfluss gemessen wird. Dazu wurde mit der Software Clampex 9.2 (Axon Industries) ein Steuerprotokoll geschrieben, mit dem das Kommandopotential, ausgehend vom Startpotential $U_{\text{com}} = -50 \text{ mV}$, mit einer Rate von 10 mV/s bis auf ein Endpotential $U_{\text{com}} = +100 \text{ mV}$ angehoben wurde (Protokoll: siehe 2.2.3.7.1).

Für die Bestimmung des Umkehrpotentials U_{rev} wurden die Halbkammern mit unterschiedlich

konzentrierten Elektrolytlösungen befüllt (*cis/trans* = 250 mM/20 mM KCl). Danach wurden die oben beschriebenen Spannungsrampen angelegt. Die gemessene Stromstärke wurde aufgezeichnet und der Schnittpunkt der linearen Regression der Messwerte mit der Abszisse, d.h. der Punkt, an dem kein Nettostrom fließt, bestimmt.

2.2.3.7.1 Protokoll zur Bestimmung des Umkehrpotentials

Hierfür wurde das Protokoll "ramp 150mV 15 s.pro" im Menüpunkt <Acquire> <New Protocol> erstellt:

Reiter „Mode/Rate“: Acquisition mode: Episodic stimulation

Trial Hierarchy: Runs/trial 1, Sweeps/run 1, Samples/Sweep/signal 800000

Sampling Interval per Signal: Interval [μ s]: 20 (= 50 kHz)

Allow automatic analysis in other programs:

Reiter "Inputs": Analog IN Channels: Channel #0: IN 0

Reiter "Outputs": Analog OUT Channels: Channel #0: Cmd 0, Channel #1: Cmd 1

Reiter "Trigger": Start trial with: Immediate

Trigger source: Internal Timer

Reiter "Wave 0": Analog Waveform: , Epochs

Intersweep Holding level: Use Holding

Epoch description:

A: Type: Step; First Level: -50 mV; Delta Level: 0 mV; First Duration 20000 samples; Delta duration: 0 samples.

B: Type: Ramp; First Level: 100 mV; Delta Level: 0 mV; First Duration: 750000 samples; Delta duration: 0 samples

C: Type: Step; First Level: 100 mV; Delta Level: 0 mV; First duration: 5000 samples; Delta duration: 0 samples

2.2.3.8 Datenanalyse

Die Messdaten wurden mithilfe des Softwarepakets pCLAMP9.2 (Axon Industries) ausgewertet. Das Programm Clampex 9.2 wurde hierbei zur Aufnahme und Steuerung der Messungen eingesetzt, mit Clampfit 9.2 wurden die aufgenommenen Daten analysiert. Die Leitwertbestimmung wurde mit den Programmen AxoScope 9.2, Ephys5 (AG Biophysik der Universität Osnabrück) sowie Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmont, USA) durchgeführt. Umkehrpotentiale und Unterleitwerte wurden durch Datenaufbereitung mit SigmaPlot 2001 (SPSS Inc., Chicago, USA) bestimmt.

2.2.3.8.1 Berechnung des Kanaldurchmessers

Aus den gemessenen Kanalleitwerten konnte die Porengröße nach folgender Formel abgeschätzt werden [73, 74]:

$$d = \frac{\rho g}{\pi} \left(\frac{\pi}{2} + \sqrt{\left(\frac{\pi}{2}\right)^2 + \frac{4 \pi l}{\rho g}} \right) \quad (2),$$

mit d = Porendurchmesser, ρ = spezifischer elektrischer Widerstand des Elektrolyts, g = Kanalleitwert und l = Länge der Konstriktionszone des Kanals. Für l wird ein Wert von 5 Å angenommen, der elektrische spezifische Widerstand der eingesetzten 250 mM KCl-Lösung beträgt 49,5 Ωcm, unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors von Smart et al. [75] ergibt sich für die KCl-Lösung $\rho = 247,5$ Ωcm.

2.2.3.8.2 Berechnung der Ionenselektivität

Aus dem Umkehrpotential U_{rev} konnte die Ionenselektivität eines Kanalproteins (hier: bei Verwendung von KCl als Elektrolyt) mithilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Spannungsgleichung bestimmt werden [76]:

$$U_{rev} = \frac{R T}{F} \ln \frac{P_K [K]_{cis} + P_{Cl} [Cl]_{trans}}{P_K [K]_{trans} + P_{Cl} [Cl]_{cis}} \quad (3),$$

mit U_{rev} = Umkehrpotential des Kanalproteins, R = universelle Gaskonstante, T = absolute Temperatur, F = Faraday-Konstante, P_x = Permeabilität des Ions x und $[x]_{cis,trans}$ = Konzentration des Ions x in der *cis*- bzw. *trans*-Messhalbkammer.

Durch Umformung dieses Terms erhält man für die Selektivität (das Permeabilitätsverhältnis) eines Kanalproteins:

$$\frac{P_K}{P_{Cl}} = \frac{[Cl]_{trans} - [Cl]_{cis} e^{\frac{U_{rev} F}{R T}}}{[K]_{trans} e^{\frac{U_{rev} F}{R T}} - [K]_{cis}} \quad (4).$$

2.2.3.8.3 Ermittlung von Unterleitwerten

Zur Ermittlung von Unterleitwerten wurde die Verteilung der Stromstärkemessdaten eines Kanalproteins (Messzeitraum: mindestens 2 s) bei einem definierten Kommandopotential

U_{com} analysiert. Die Daten wurden in ein Histogramm übertragen und die Verteilung durch least square fit zu einer, zwei, drei oder vier Gauß-Funktionen nachvollzogen.

2.2.3.8.4 Ermittlung der Schaltfrequenz

Die Schaltfrequenz der Kanäle wurde ermittelt wie in Chen et al. beschrieben [77].

3. Ergebnisse

3.1 Montage des Elektrophysiologischen Messstandes

Da die gemessene Stromstärke lediglich in einer Größenordnung von 10^{-12} bis 10^{-9} A liegt, können elektromagnetische und mechanische Störungen das Messsignal stark beeinflussen. Daher wurde das Messsystem in einen schwingungsgedämpft konstruierten Faraday'schen Käfig eingebaut. Zunächst wurden die Gerüstkonstruktionen von Käfig (siehe Kap. 2.1.10.1, Abb. 2.2) und Messtisch (Kap. 2.1.10.2, Abb. 2.3) fertig gestellt. Im zweiten Schritt wurden die Schwingungsdämpfer (Abb. 2.6 rechts unten) am Messtischgerüst befestigt, danach die Käfigtischplatte und die Messtischplatte montiert (Kap. 2.1.10.5, Abb. 2.6).

Messtisch und Käfiggerüst wurden danach probeweise in ihrem späteren Aufbau zusammengebaut, um den korrekten Abstand der Abstandshalter zwischen Käfiggerüst und Messtisch (Kap. 2.1.10.1.2, Abb. 2.3) zu gewährleisten und die Tischplatten durch Höhenanpassung der verstellbaren Füße auf eine gemeinsame Höhe einzustellen. Gerüst und Messtisch wurden danach wieder voneinander getrennt, um die Innenaufbauten leichter montieren zu können. Zunächst wurden an der Käfigtischplatte die Streben der Stereomikroskophalterung mit der Armstütze (Kap. 2.1.10.7, Abb. 2.9A) und die Perfusion (samt Spritzenhalterungen, Kap. 2.1.10.9, Abb. 2.10) befestigt.

Die Montage der Messtischaufbauten begann zunächst mit der Befestigung der Messtischträger samt Deckplatte (Kap. 2.1.10.8, Abb. 2.9.B und C). Auf der Tischplatte des Messkammertischs wurden die Fixierstifte der Messkammer eingesetzt und der Messkammertisch wurde aus seinen Einzelteilen zusammengesetzt (Kap. 2.1.10.6, Abb. 2.7). Die Magnetrührerplatte samt Rührer wurde im Inneren des Messkammertischs montiert, das Magnetrührerkabel wurde an der linken Tischseite aus dem Messkammertisch geführt und die Kabelabschirmung für die spätere Erdung an den Messtisch geschraubt. Danach wurde der Messkammertisch an der Höhenverstellung fixiert und diese mit der Kammertischhalterung verbunden (Abb. 2.8 links). Über einen Reiter wurde die Kammertischhalterung, an der auch der Trichterhalter (Abb. 2.8 rechts) montiert worden war, an der horizontalen Trägerstrebe befestigt. Der Glastrichter wurde in den Halter gesteckt und sein Auslass mit einem Silikonschlauch verbunden. Rechts neben die Kammertischhalterung wurde die Halterung des Lichtwellenleiters montiert (Kap. 2.1.10.10, Abb. 2.12A-C, 2.13B und C). Danach wurde der Perfusionsarm komplett zusammengebaut, am Mikromanipulator montiert und mit einem Reiter am linken Messtischträger befestigt (Kap. 2.1.10.9, Abb. 2.11). Die Perfusionsschläuche wurden an die Adaptern gesteckt, durch den Perfusionsarm geführt und

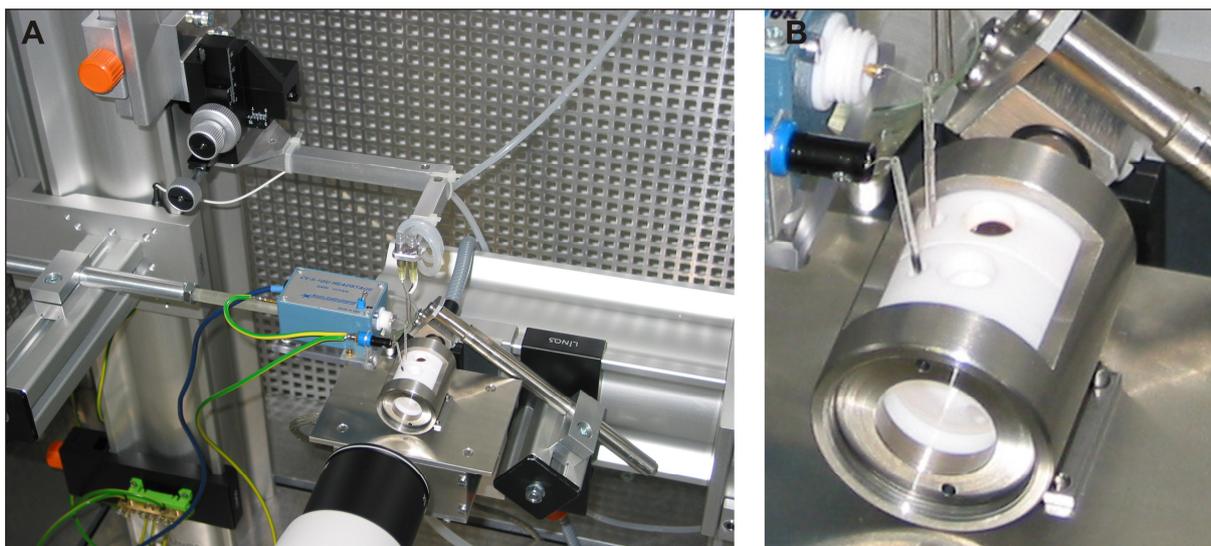


Abbildung 3.1: Innenansicht des Messtandes. (A) Innenansicht, (B) Detailansicht der Messkammer.

mit den in den Spritzenadaptern befestigten 60 ml-Spritzen am Perfusionsträger des Käfiggerüsts verbunden. Die Headstage wurde mit ihren Halterungsstangen verschraubt und über die Headstagehalterung und einen Reiter ebenfalls am linken Messtischträger unterhalb der Perfusion angebracht (Kap. 2.1.10.10, Abb. 2.12D und E, 2.13A). Der Aufbau der Messtischkomponenten ist in Abb. 3.1A dargestellt. Nun wurde der Messtisch in das Käfiggerüst eingebaut und über die Abstandshalter fixiert. Das Stereomikroskop wurde über die Trägerplatte (Abb. 2.9A Mitte) an den Halterungsstreben befestigt, außerdem der Erdungsadapter an der linken hinteren Gerüststrebe montiert (Kap. 2.1.10.13, Abb. 2.16B). Danach wurden die Erdungskabel, ausgehend von den in Kap. 2.1.10.13 beschriebenen Bauteilen, mit dem Erdungsblock verbunden, welcher über einen Reiter am linken Messtischträger befestigt wurde. Schließlich wurden die Käfiggitter (Kap. 2.1.10.3, Abb. 2.4) am Käfiggerüst angebracht. Die Käfigtürholme (Kap. 2.1.10.4, Abb. 2.5) wurden zusammengeschweißt, die Türgitter befestigt, und nach der Anbringung von Scharnieren, Türgriffen und Magnetschlössern wurden die Türen mit dem Käfiggerüst verbunden. In Abbildung 3.2 ist eine Vorderansicht des fertig zusammengebauten Messtandes zu sehen.

3.1.1 Komponenten des Elektrophysiologischen Messtandes

Der Elektrophysiologische Messtand besteht aus zwei Hauptkomponenten, dem Messtisch und dem Faraday'schen Käfig (Abb. 3.1 und 3.2). Zum schwingungsgedämpft gelagerten Messtisch gehören die folgenden Baugruppen (Abb. 3.1A): der Messkammertisch mit integriertem Magnetprüher, die Messkammer (Abb. 3.1B) und die Headstage (CV-5-1GU, Axon Industries) mitsamt der Messelektrode sowie der geerdeten Referenzelektrode.

3. Ergebnisse



Abbildung 3.2: Vorderansicht des Messstandes.

Außerdem ist hier der Lichtwellenleiter (Volpi, Schlieren, Schweiz) befestigt, mittels dessen die Messkammer beleuchtet wird. Auf der Tischplatte des Faraday'schen Käfigs ist das Binokular montiert (Abb. 3.2), das der optischen Kontrolle der Messkammer (bei der Auftragung des Lipids auf die Teflonmembran, der Injektion der Proteoliposomen und der Perfusion) dient. Die Perfusion, mittels derer die Elektrolytlösungen in den Halbkammern der Messkammer ausgetauscht werden, besteht aus zwei Baugruppen, die einerseits auf der Käfigtischplatte (zwei 60 ml-Spritzen zur Aufnahme der Elektrolytlösungen), andererseits auf der Messtischplatte (die Injektionskanülen, die mithilfe eines Mikromanipulator-gesteuerten Armes präzise in die Messkammer platziert werden können) montiert sind. Als Lichtquelle zur Beleuchtung der Messkammer über den Lichtwellenleiter wird eine Kaltlichtquelle Intralux 5000 (Volpi) verwendet.

Das Messsignal wird von der Headstage an einen Messverstärker (GeneClamp 500B, Axon Industries) weitergeleitet. Das nunmehr verstärkte Messsignal wird von einem Signalwandler

(AD/DA, Digidata 1322A, Axon Industries) digitalisiert und über einen Personal Computer (Fujitsu Siemens Computers, München) mit dem Softwarepaket pCLAMP9.2 (Axon Industries) visualisiert, gespeichert und ausgewertet. Mittels dieser Software können auch die elektrophysiologischen Messungen über die in Kap. 2.2.3.6 und 2.2.3.7 beschriebenen Protokolle gesteuert werden. Zur qualitativen Überprüfung des digitalisierten Messsignals wird ein Oszilloskop HM507 (HAMEG Instruments, Mainhausen) verwendet, das direkt mit dem Messverstärker verbunden ist.

3.1.2 Verbindungen der Messstandkomponenten

Das Datenkabel der Headstage CV-5-1GU wurde mit dem Anschluss „HEADSTAGE #3 (PATCH)“ an der Rückseite des Messverstärkers GeneClamp 500B verbunden. Der GeneClamp 500B wurde über BNC-Kabel mit dem Oszilloskop HM507 („SCALED OUTPUT“ nach „INPUT CHI (X)“) und dem Signalwandler Digidata 1322A („SCALED OUTPUT“ nach „ANALOG IN 0“ und "E #3 PATCH CLAMP COMMAND (20 mV/V)“ nach „ANALOG OUT 0“) verbunden, der Kippschalter „VOLTAGE CLAMP STEADY STATE RESTORE“ wurde auf „OFF“ belassen. Der Signalwandler Digidata 1322A wurde über ein SCSI-Kabel mit dem Personal Computer verbunden.

3.1.3 Inbetriebnahme des Elektrophysiologischen Messstandes

Nach der Montage der Einzelkomponenten wurden die pneumatischen Schwingungsdämpfer des Messtisches laut Herstellerangaben aufgepumpt, der Messtisch mithilfe einer Wasserwaage nivelliert und die Tischplatten auf gleiche Höhe eingestellt. Messkammertisch, Beleuchtung, Headstage, Perfusion und Stereomikroskop samt Armstütze wurden auf die Körpergröße des Experimentators eingestellt, was durch die sehr gute Erreichbarkeit und leichte Verstellbarkeit der Komponenten schnell und problemlos möglich war. Der Lichtwellenleiter wurde durch die ausgesparte Öffnung in der Tischplatte geführt und in seiner Halterung befestigt. Um den direkten Kontakt mit der Messtischplatte zu verhindern, wurde der Lichtwellenleiter mit einem Kabelbinder am Käfiggerüst fixiert. Die korrekte Ausrichtung des Lichtwellenleiters zur optimalen Beleuchtung der Messkammer wurde durch Justierung der Neigung des Trägerholms und Fixierung der Halterungsstange mit der Klemmvorrichtung vorgenommen.

Durch die einfache Höhenjustierung des Messkammertisches sowie die schnelle und unkomplizierte horizontale Justierung über die Reiterelemente war es problemlos möglich,

3. Ergebnisse

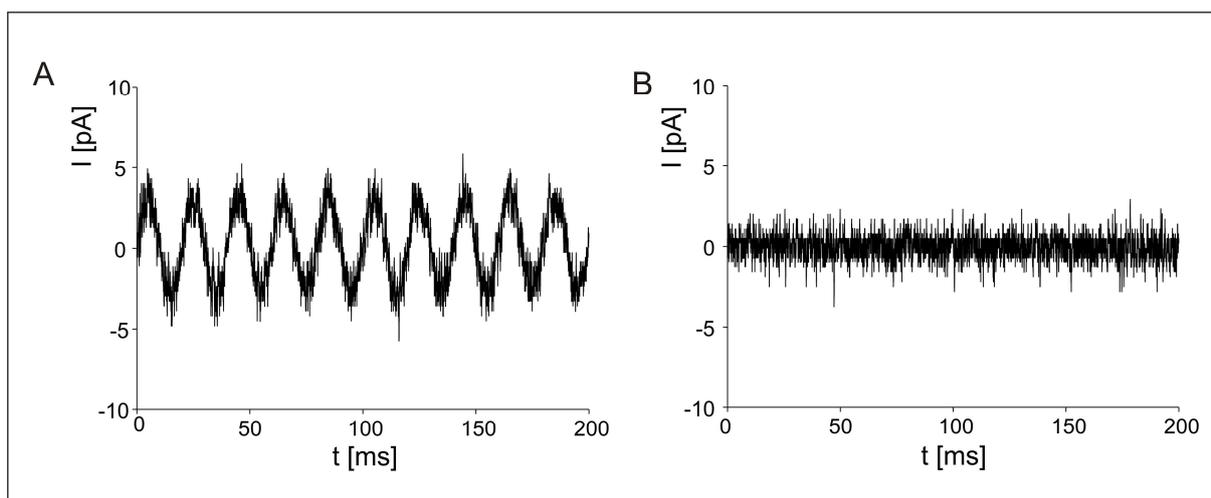


Abbildung 3.3: Abschirmung des Lichtwellenleiters. Aufnahme des Messsignals bei $U_{\text{com}} = 0$ mV in 250 mM KCl (*cis/trans*) (A) vor und (B) nach der Abschirmung des Lichtleiters mit Aluminiumfolie.

das Bilayerloch in der Teflonfolie im Stereomikroskop zu zentrieren und die optimale Ausleuchtung der Messkammer zu gewährleisten.

Die Headstage wurde durch Fixierung ihrer Halterungsstange mit der Klemmvorrichtung am Trägerholm optimal zur Messkammer ausgerichtet.

Bei der Perfusion wurden Höhe und Abstand der Spritzenhalter auf leichte Handhabung sowie die Größe der verwendeten 60 ml-Spritzen eingestellt. Zwischen Spritze und Silikonschlauch wurde ein Sterilfilter (Porendurchmesser: 0,45 μm , Celluloseacetat, Whatman GmbH, Dassel) gesetzt. Bei der Montage der Infusionskanülen wurde darauf geachtet, dass zwischen beiden mechanischer Kontakt besteht, um die korrekte Erdung der Perfusion zu gewährleisten. Erdungskabel und Silikonschläuche wurden durch Kabelbinder am Perfusionsarm fixiert.

Erste Versuche lieferten ein Messsignal, das von einer 50 Hz-Oszillation überlagert wurde (Abb. 3.3A). Dies rührte vom inneren Aufbau des Glasfaserkabels des Lichtwellenleiters her, das konstruktionsbedingt durch Metalldraht verstärkt war und daher vermutlich externe elektromagnetische Störungen in den Faraday'schen Käfig weiterleitete. Durch die Abschirmung des Glasfaserkabels mit Aluminiumfolie konnte diese Störung deutlich gedämpft werden (Abb. 3.3B).

3.2 Überexpression und Aufreinigung der verwendeten rekombinanten Proteine

Grundlage für die Durchführung elektrophysiologischer Messungen war die Überexpression der in dieser Arbeit verwendeten Proteine (siehe Tab. 1.1 und Kap. 2.2.2.1). Am Beispiel der Überexpression des Proteins Alr2269 ist deutlich die starke Induktion der Proteinexpression

3. Ergebnisse

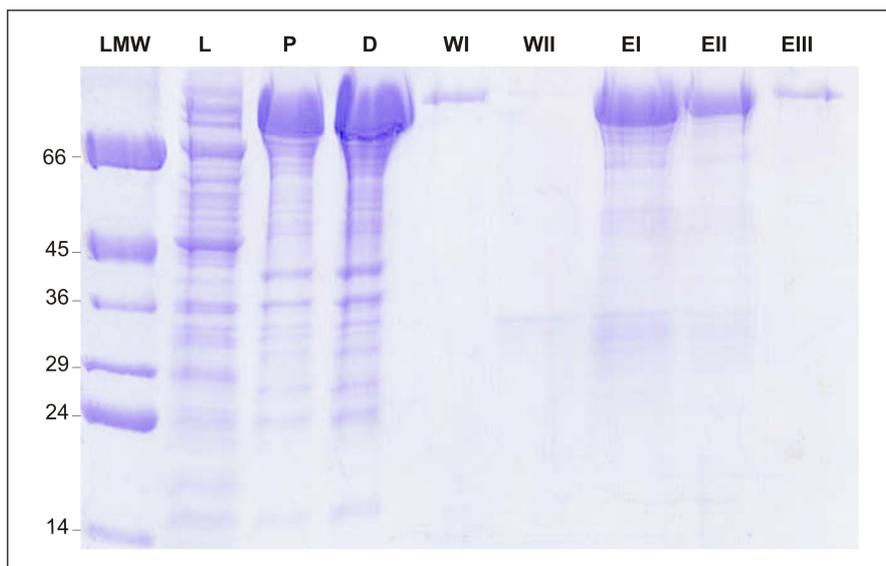


Abbildung 3.4: Überexpression des Proteins Alr2269. Dargestellt ist die elektrophoretische Auftrennung der Fraktionen der Alr2269-Überexpression in einem 12,5 %-igen Polyacrylamidgel. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie angefärbt. Die eingesetzten Fraktionen waren: LMW Größenstandard, L lösliche Fraktion nach Zellaufschluss, P Pelletfraktion nach Zellaufschluss, D Durchflussfraktion, WI, WII Waschfraktionen I und II, EI, EII, EIII Eluatfraktionen I, II und III. Links im Bild die Größenangaben der korrespondierenden Markerbanden (in kDa). Aufgetragen wurden je 5 μ l LMW, L, P und D und je 10 μ l WI, WII, EI, EII und EIII.

des transformierten Konstrukts anhand der Bande erkennbar, deren Höhe ca. 90 kDa entspricht (Abb. 3.4). Weiterhin fällt beim Vergleich des Pellets (Spur P) mit der löslichen Fraktion (Spur L) auf, dass sich das überexprimierte Protein fast vollständig in der Pelletfraktion wieder findet, es also wohl als unlösliches Aggregat (in Form von Inclusion Bodies) vorlag. Die in 8 M Harnstoff gelöste Pelletfraktion wurde über eine Ni-NTA-Säule gegeben, um das exprimierte Protein durch Bindung seines C-terminalen Hexahistidin-Tags an das Säulenmaterial aufzureinigen (siehe Kap. 2.2.2.2). Vergleicht man die eingesetzte Pelletfraktion (Abb. 3.4 Spur P) mit der Durchflussfraktion (Spur D), erkennt man, dass ein Großteil des überexprimierten Proteins nicht an das Säulenmaterial gebunden hat. Dies ist auf die für die Bindekapazität des Säulenmaterials zu hohe Proteinmenge in der Pelletfraktion zurückzuführen. Dieser Verlust wurde jedoch in Kauf genommen, um die Menge unspezifisch an das Säulenmaterial bindender Proteine durch die starke Konkurrenz mit dem hochkonzentrierten, spezifisch bindenden Alr2269-Protein in der Pelletfraktion zu verringern. Nach dem Waschen der Säule zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine (Spur WI mit Detergenswaschpuffer, Spur WII mit 1 M NaCl und 15 mM Imidazol) wurden die gebundenen Proteine mit 3 x 1 ml 500 mM Imidazol von der Säule eluiert (Spuren EI, EII und EIII). Beim Vergleich der drei Eluatfraktionen fällt auf, dass sowohl die EI-, als auch die EII-Fraktion noch deutliche Verunreinigungen mit weiteren Proteinen aufweisen. Kontaminationen durch Kanalproteine, die zusammen mit dem überexprimierten Protein

aufgereinigt werden, aber auch die Interaktion des überexprimierten Proteins mit Verunreinigungen können die Messungen beeinflussen. Beides würde zu falschen bzw. deutlich veränderten Resultaten führen. Daher wurde bei der Herstellung von Proteoliposomen eine saubere Eluatfraktion mit nur geringer Konzentration des exprimierten Proteins einer stärker konzentrierten, aber verunreinigten Fraktion vorgezogen.

Um darüber hinaus sicherzustellen, dass es sich bei dem aufgereinigten um das gewünschte Protein handelt, wurde es mittels Western-Blotting mit proteinspezifischen Antikörpern nachgewiesen (siehe Kap. 2.2.2.5 und beispielsweise Abb. 3.5D).

3.3 Vertreter der Omp85-Familie in *Anabaena* sp. PCC 7120

Wie in Kap. 1.3.1 beschrieben, enthält das Genom des Cyanobakteriums *Anabaena* sp. PCC 7120 drei Gene, die für Vertreter der Omp85-Familie kodieren, nämlich *alr2269*, *alr0075* und *alr4893*. Alle drei zugehörigen Proteine wurden, wie in Kap. 3.2 exemplarisch für *alr2269* gezeigt, überexprimiert und aufgereinigt, um sie elektrophysiologisch analysieren zu können. Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf der Analyse des Proteins Alr2269, das unter allen bekannten bakteriellen Omp85-Proteinen die höchste Ähnlichkeit zur Proteinfamilie der plastidären Importkanäle (Toc75) aufweist (siehe Kap. 1.3.1).

3.3.1 *Alr2269*, das cyanobakterielle Omp85-Protein mit der nächsten Verwandtschaft zum Proteinimportkanal der Chloroplasten

Alr2269 wurde bei massenspektrometrischen Analysen des äußeren Membranproteoms von *Anabaena* sp. PCC 7120 identifiziert [78]. Das Volllängenprotein besteht aus 833 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 89,6 kDa (siehe auch Abb. 3.5D). Eine Analyse des Proteins mit dem Programm SignalP [79] ergab die Vorhersage eines Signalpeptids mit einer Länge von 19 Aminosäuren. Aufgrund der bereits erwähnten hohen Ähnlichkeit zu Toc75 wurde untersucht, ob sich die strukturelle Ähnlichkeit in ähnlichen elektrophysiologischen Eigenschaften widerspiegelt.

Das zu diesem Zweck in den Lipid-Bilayer rekonstituierte Protein (siehe Kap. 2.2.3.5) zeigte ein sehr aktives Schaltverhalten bei $U_{\text{com}} = 100$ mV. Alr2269 wechselt offensichtlich mit hoher Frequenz zwischen den Schaltzuständen ($f = 396$ Hz, siehe Kap. 2.2.3.8.4 und Abb. 3.5A). Die Leitwertbestimmung (siehe Kap. 2.2.3.6) ergab einen Hauptleitwert von $g = 500 \pm 57$ pS (Abb. 3.5B), was einem theoretischen Porendurchmesser von $d = 1,7$ nm entspricht (siehe Kap. 2.2.3.8.1). Das Umkehrpotential von Alr2269 beträgt unter den verwendeten Elektrolytbedingungen (*cis/trans* = 250 mM/20 mM KCl, siehe Kap. 2.2.3.7)

3. Ergebnisse

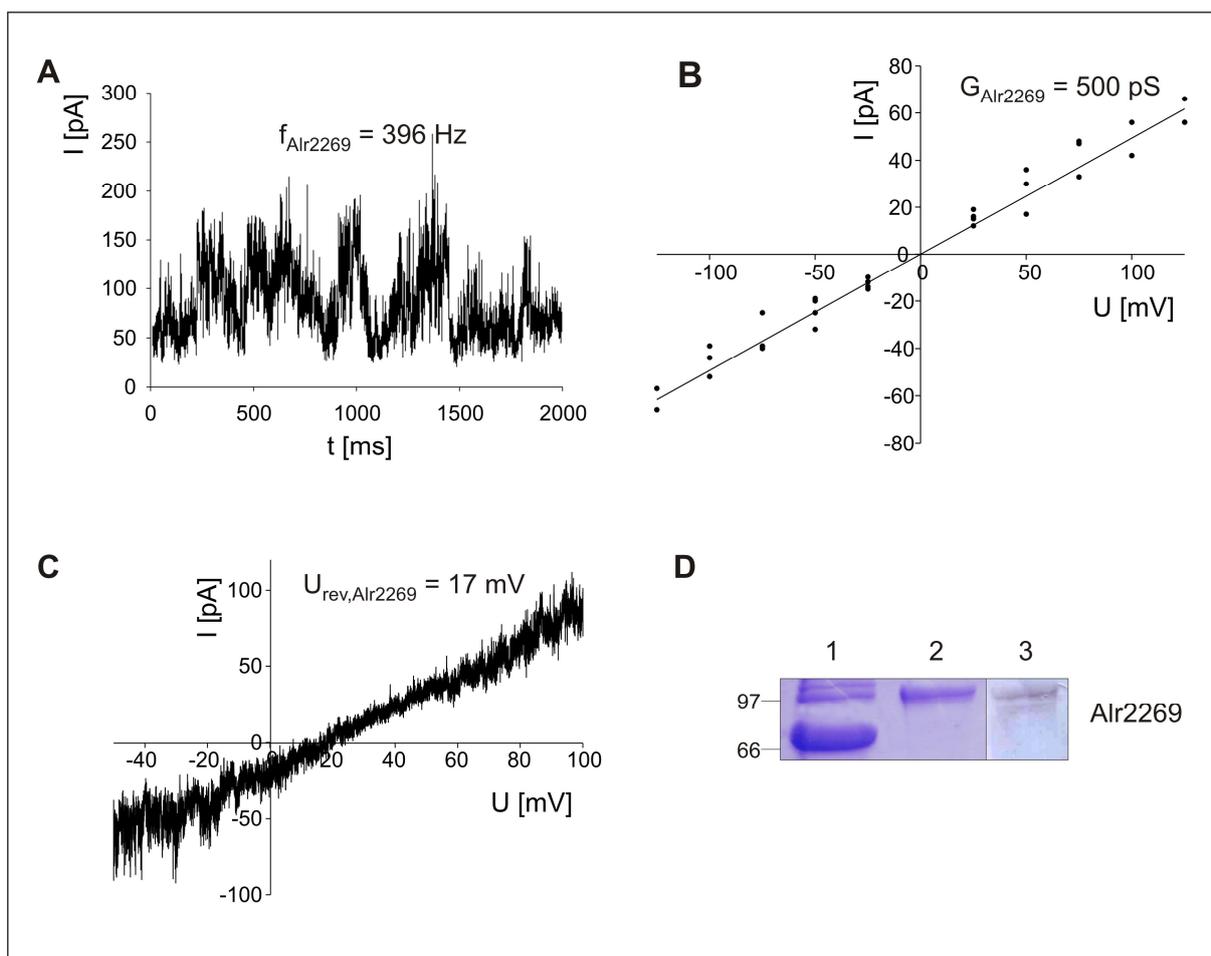


Abbildung 3.5: Elektrophysiologische Ergebnisse von Alr2269. (A) Schaltverhalten von Alr2269 bei $U_{\text{com}} = 100$ mV (Kopienanzahl von Alr2269: $n = 5$), die Schaltfrequenz f von Alr2269 ist angegeben. (B) U-I-Diagramm des Hauptleitwerts von Alr2269, dargestellt ist die lineare Regression der Messdaten, der Hauptleitwert von Alr2269 ist angegeben. (C) Aufnahme der Ergebnisse eines Spannungsrampenversuchs und Angabe des Umkehrpotentials U_{rev} von Alr2269 (vermutliche Kopienanzahl von Alr2269: $n = 3$). (D) Ergebnis der Überexpression von Alr2269. 10 μl der verwendeten Eluatfraktion wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (Spalte 2). Zum Größenvergleich wurden 5 μl eines Größenstandards aufgetragen (Spalte 1, links: Größenangaben der korrespondierenden Banden in kDa). Alr2269 wurde durch Immunodekoration mit $\alpha\text{Alr2269}$ -Antikörpern verifiziert (Spalte 3).

$U_{\text{rev}} = 17 \pm 1$ mV ($n = 21$, Abb. 3.5C), gleichbedeutend mit einer Kationenselektivität von $P_{\text{K}}:P_{\text{Cl}} = 2,2$ (s. Kap. 2.2.3.8.2).

Topologievorhersagen von Alr2269 ergaben eine Proteinstruktur aus zwei Hauptdomänen, einem hydrophilen N-terminalen Teil und einem hydrophoben C-terminalen Teil, der hauptsächlich aus membrandurchspannenden β -Faltblättern aufgebaut ist [31]. Basierend auf diesen Vorhersagen wurden Teilkonstrukte des Proteins erstellt (siehe Tab. 2.1 und Abb. 2.1). AnaC (aa 467-833, MW 39,6 kDa, siehe auch Abb. 3.6D) umfasst die gesamte vorhergesagte Porenregion des Proteins. Die elektrophysiologische Analyse von AnaC zeigte ein Schaltverhalten, das bei einem Kommandopotential $U_{\text{com}} = 100$ mV mit niedriger Frequenz zwischen geöffnetem und geschlossenem Zustand wechselt ($f = 3,5$ Hz, Abb. 3.6A). Diese

3. Ergebnisse

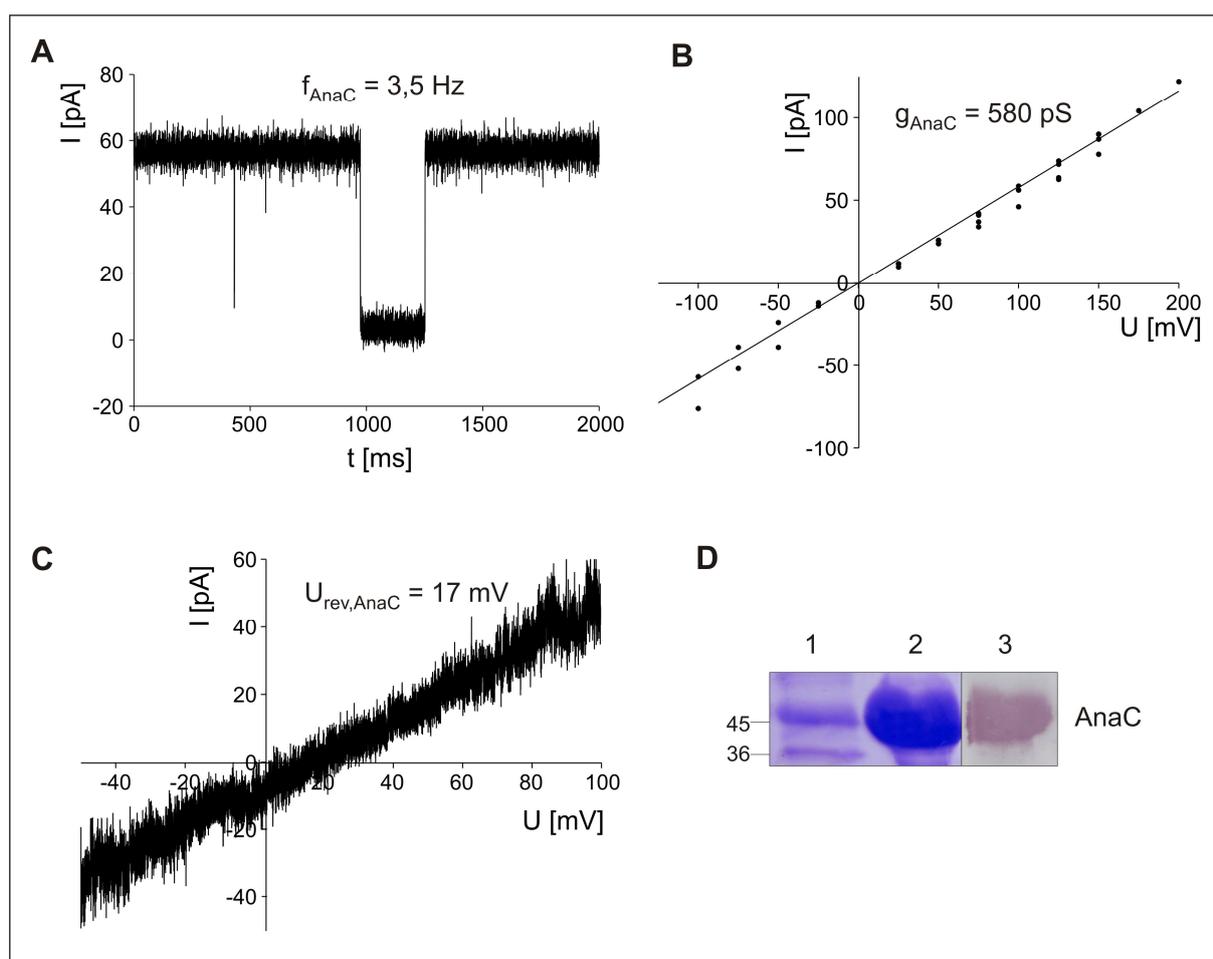


Abbildung 3.6: Elektrophysiologische Ergebnisse von AnaC. (A) Schaltverhalten von AnaC bei $U_{\text{com}} = 100 \text{ mV}$ (Kopienanzahl von AnaC: $n = 1$), die Schaltfrequenz f von AnaC ist angegeben. (B) U-I-Diagramm des Hauptleitwerts von AnaC, dargestellt ist die lineare Regression der Messdaten, der Hauptleitwert von AnaC ist angegeben. (C) Aufnahme der Ergebnisse eines Spannungsrampenversuchs und Angabe des Umkehrpotentials U_{rev} von AnaC (vermutliche Kopienanzahl von AnaC: $n = 2$). (D) Ergebnis der Überexpression von AnaC. Spalte 1: Proteinstandard ($5 \mu\text{l}$, Größenangaben in kDa), Spalte 2: $10 \mu\text{l}$ der eingesetzten Eluatfraktion, Spalte 3: Immunodekoration mit $\alpha\text{Alr2269}$ -Antikörpern.

Beobachtung steht in deutlichem Gegensatz zu den Ergebnissen für das Volllängenprotein. Der Hauptleitwert von AnaC konnte als $g = 580 \pm 55 \text{ pS}$, entsprechend einem theoretischen Porendurchmesser von $d = 1,9 \text{ nm}$, ermittelt werden (Abb. 3.6B). Auch dieses Ergebnis weicht von Alr2269 ab. Die beobachteten Differenzen in Schaltfrequenz und Hauptleitwert deuten darauf hin, dass die N-terminale Domäne Einfluss auf die Porendomäne hat. Das Umkehrpotential von AnaC beträgt $U_{\text{rev}} = 17 \pm 1 \text{ mV}$ ($n = 33$, $P_{\text{K}}:P_{\text{Cl}} = 2,2$, Abb. 3.6C) und ist somit identisch mit demjenigen des Volllängenproteins, die Ionenselektivität von Alr2269 scheint somit nicht vom N-Terminus des Proteins beeinflusst zu werden. Wegen der beobachteten Unterschiede in Schaltverhalten und Hauptleitwert von Volllängenprotein und isolierter Porenregion sollte der Einfluss des N-Terminus in einem weiteren Experiment näher untersucht werden.

3. Ergebnisse

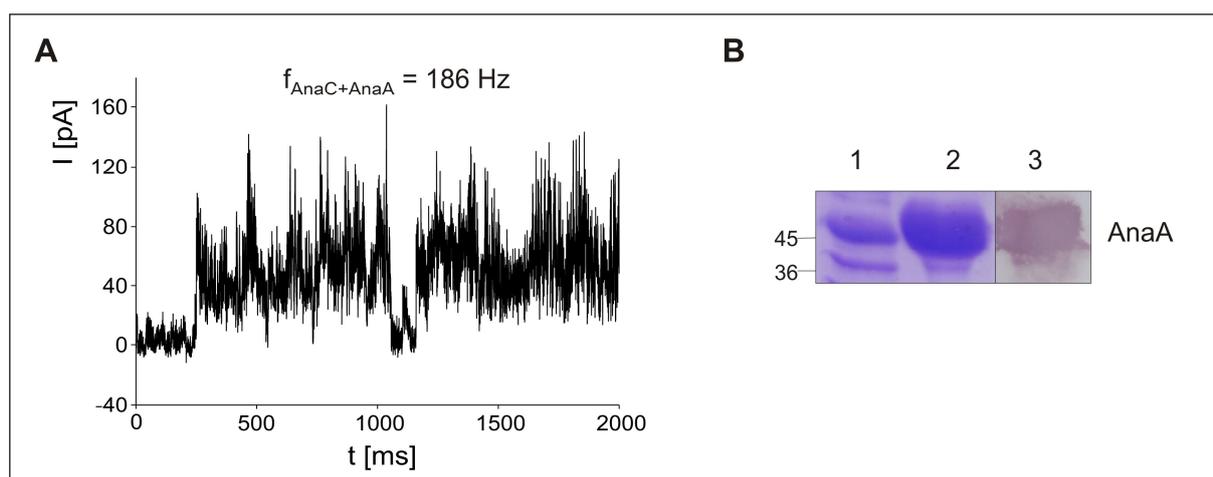


Abbildung 3.7: Einfluss von AnaA auf das Schaltverhalten von AnaC. (A) Schaltverhalten von AnaC nach Zugabe von 0,1 μM AnaA bei $U_{\text{com}} = 100 \text{ mV}$ (Kopienanzahl von AnaC: $n = 3$), die Schaltfrequenz f von AnaC nach AnaA-Zugabe ist angegeben. (B) Ergebnisse der Überexpression von AnaA. Spalte 1: Proteinstandard (5 μl , Größenangaben in kDa), Spalte 2: 10 μl der eingesetzten Eluatfraktion, Spalte 3: Immunodekoration mit $\alpha\text{Alr2269}$ -Antikörpern.

Hierfür wurde das Konstrukt AnaA hergestellt (aa 161-470, MW 33,7 kDa, siehe auch Abb. 2.1 und 3.7B sowie Tab. 2.1), welches aus dem Teil des hydrophilen N-Terminus besteht, der die POTRA-Domäne beinhaltet [27]. Zunächst wurde AnaC mit dem Bilayer fusioniert, danach wurde AnaA in einer Endkonzentration von 0,1 μM (*cis/trans*) in die Messkammer zugegeben. Dadurch konnte eine deutliche Erhöhung der Schaltfrequenz zwischen geöffnetem und geschlossenem Zustand erzielt werden ($f = 186 \text{ Hz}$, Abb. 3.7A). Die Analyse der Messdaten bei $U_{\text{com}} = 100 \text{ mV}$ ergab außerdem, dass sich der Hauptleitwert nach Zugabe von AnaA auf 520 pS verringerte ($d = 1,8 \text{ nm}$) und damit in der Größenordnung des Hauptleitwerts des kompletten Alr2269-Proteins (500 pS) lag.

Daraufhin wurden die Messdaten der elektrophysiologischen Experimente mit Alr2269, AnaC und AnaC + AnaA detaillierter analysiert, indem die Häufigkeitsverteilungen der gemessenen Stromstärken miteinander verglichen wurden (siehe. Kap. 2.2.3.8.3). Hierbei zeigte sich, dass der Hauptleitwert des Volllängenproteins aus drei Unterleitwerten zusammengesetzt ist (Abb. 3.8A); diese Aufteilung ist unabhängig von der angelegten Spannung U_{com} . Die drei Unterleitwerte von Alr2269 betragen 430, 520 und 600 pS (Abb. 3.8B). Der für das Volllängenprotein ermittelte Hauptleitwert ($g = 500 \text{ pS}$) lässt sich darauf zurückführen, dass der mit dem mittleren Unterleitwert korrespondierende Schaltzustand mit der größten Häufigkeit eingenommen wurde (Abb. 3.8A). Die Häufigkeitsanalyse der im Versuch mit AnaC gewonnenen Messdaten ergab dagegen neben dem geschlossenen Zustand (Abb. 3.8C links) nur einen einzigen geöffneten Zustand (Abb. 3.8C rechts), entsprechend einem Hauptleitwert von 580 pS. Dieser Wert liegt in der Größenordnung des höchsten Unterleitwerts des Volllängenproteins, bei dem dieser Schaltzustand jedoch nur mit

3. Ergebnisse

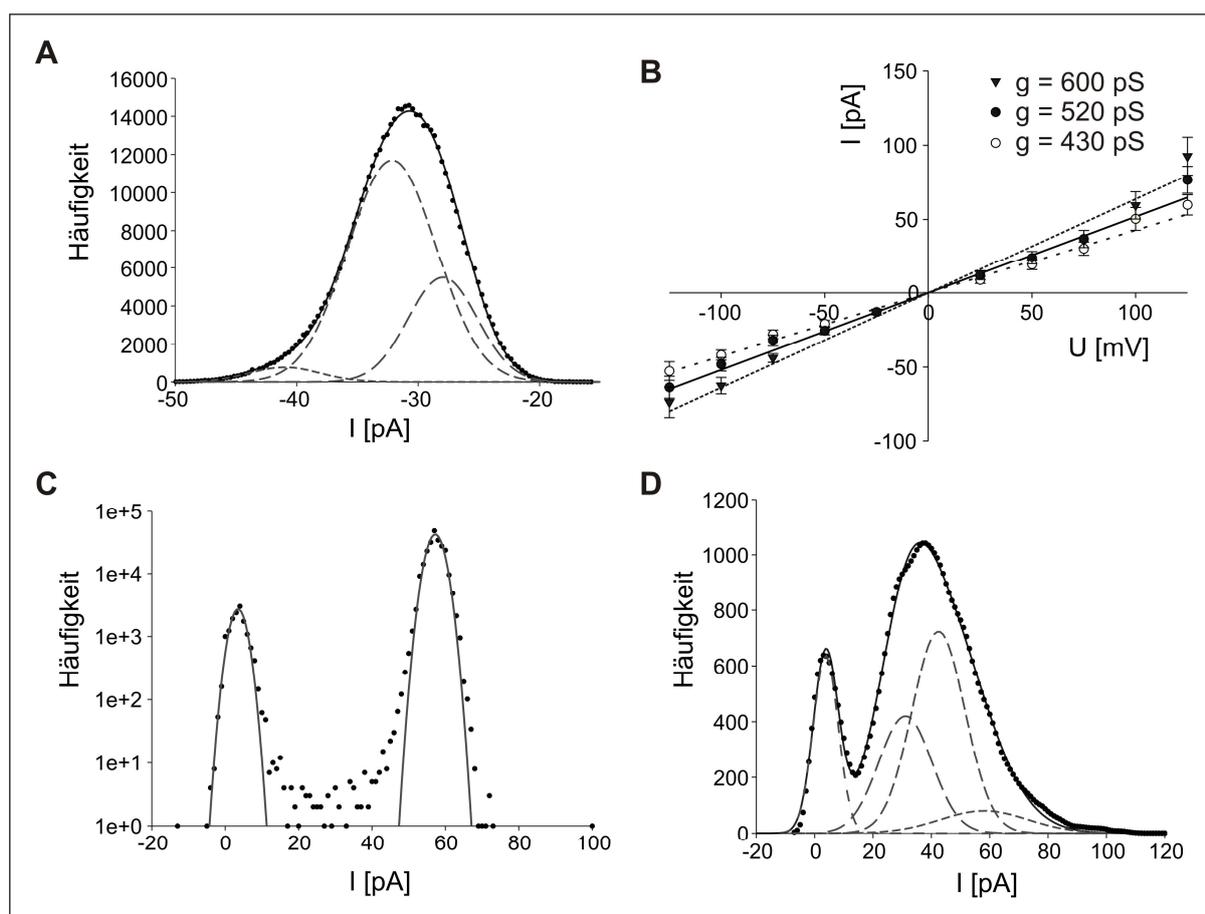


Abbildung 3.8: Analyse der Unterleitwerte von Alr2269. (A) Häufigkeitsverteilung der Stromstärke bei $U_{\text{com}} = -75$ mV. Punkte geben die Anzahl der Messpunkte der jeweiligen Stromstärke an, die durchgezogene Linie zeigt die Funktion, die der Häufigkeitsverteilung durch least square fit mit den drei gestrichelt dargestellten Gaußfunktionen angepasst wurde. (B) U-I-Diagramm der aus der Analyse der Häufigkeitsverteilung ermittelten Stromstärken, die jeweils aus den Maxima der niedrigsten (\circ), mittleren (\bullet) und höchsten (\blacktriangledown) Gaußfunktionen ermittelt wurden. Dargestellt sind weiterhin die linearen Regressionen der jeweiligen Stromstärken. (C) Häufigkeitsverteilung der Stromstärke bei $U_{\text{com}} = 100$ mV. Punkte geben die Anzahl der Messpunkte der Stromstärke an, die Linien geben das least square fit mit zwei Gaußfunktionen wieder. (D) Häufigkeitsverteilung der Stromstärke bei $U_{\text{com}} = 100$ mV. Punkte geben die Anzahl der Messpunkte der jeweiligen Stromstärke an, die durchgezogene Linie zeigt die Funktion, die der Häufigkeitsverteilung durch least square fit mit den vier gestrichelt dargestellten Gaußfunktionen angepasst wurde. Die mit den Maxima der vier Gaußfunktionen korrespondierenden Stromstärken wurden ermittelt. Aus den Stromstärkedifferenzen zwischen geschlossenem Kanal und dessen Öffnungszuständen wurden die im Text angegebenen Unterleitwerte (310, 420 und 580 pS) berechnet (siehe Kap. 2.2.3.6).

vergleichsweise geringer Häufigkeit eingenommen wurde (Abb. 3.8A). Die Auswertung der Messdaten von AnaC + AnaA zeigte hingegen zusätzlich zum geschlossenen Zustand (Abb. 3.8D links) eine Aufteilung in drei Unterleitwerte (310, 420 und 580 pS, Abb. 3.8D rechts), ähnlich zu den für das Volllängenprotein ermittelten Ergebnissen. Auch die Häufigkeitsverteilung der drei Unterleitwerte von AnaC + AnaA gleicht derjenigen des Volllängenproteins Alr2269, wiederum wird der mittlere Schaltzustand am häufigsten und der obere Schaltzustand, dessen Wert dem für AnaC ermittelten Hauptleitwert entspricht, relativ selten eingenommen. Der N-Terminus scheint somit das Schaltverhalten sowie die

Porengröße des Volllängenproteins zu beeinflussen. Zudem zeigen diese Ergebnisse, dass die N-terminale Domäne offensichtlich eine hohe Affinität zur C-terminalen Porenregion besitzt, da eine vergleichbare Interaktion zwischen diesen beiden Proteindomänen nicht nur im Volllängenprotein, sondern auch zwischen den Teilkonstrukten zu bestehen scheint. Diese starke Affinität der N-terminalen Domäne zur C-terminalen Porenregion wurde auch in Interaktionsanalysen *in vitro* beobachtet [36].

3.3.2 Der distale C-Terminus von Omp85 als evolutionäre Keimzelle?

Vergleichende Strukturanalysen der Proteine der Omp85-Familie zeigten eine hohe Ähnlichkeit des distalen C-terminalen Bereichs [28]. Daher stellte sich die Frage, ob der distale C-Terminus, bestehend aus den letzten acht β -Faltblättern der Porenregion,

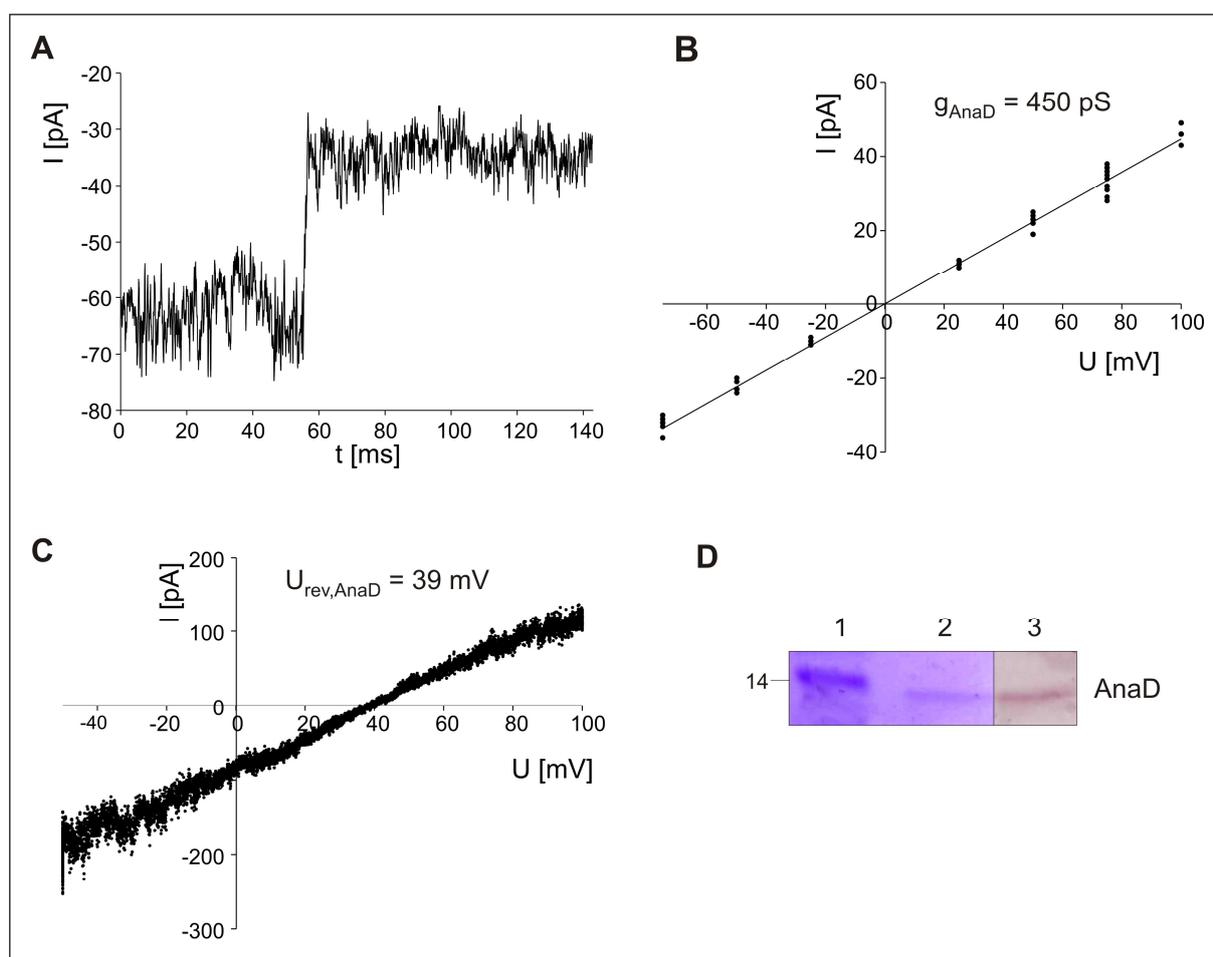


Abbildung 3.9: Elektrophysiologische Ergebnisse von AnaD. (A) Aufnahme eines Schaltvorgangs bei Messungen mit AnaD bei $U_{\text{com}} = -50$ mV (Kopienanzahl der durch AnaD gebildeten Kanäle: $n = 2$). (B) U-I-Diagramm des Hauptleitwerts von AnaD, dargestellt ist die lineare Regression der Messdaten, der Hauptleitwert von AnaD ist angegeben. (C) Aufnahme der Ergebnisse eines Spannungsrampenversuchs und Angabe des Umkehrpotentials U_{rev} von AnaD (vermutliche Kanalanzahl: $n = 3$). (D) Ergebnis der Überexpression von AnaD. Spalte 1: Proteinstandard ($5 \mu\text{l}$, Größenangabe in kDa), Spalte 2: $10 \mu\text{l}$ der eingesetzten Eluatfraktion, Spalte 3: Immunodekoration mit $\alpha\text{Alr2269}$ -Antikörpern.

3. Ergebnisse

möglicherweise den Grundstein in der Entwicklung der Proteine der Omp85-Familie darstellt. Aus diesem Grund wurde das Konstrukt AnaD (aa 702-833, MW 13,8 kDa, siehe auch Abb. 2.1 und 3.9D sowie Tab. 2.1), welches lediglich diesen konservierten Bereich umfasst, elektrophysiologisch analysiert. Durch transportspezifische Fraktionierung sowie aus Liposome Swelling Assays ergaben sich bereits Hinweise darauf, dass AnaD wahrscheinlich Poren bildet, wenn es in Liposomen rekonstituiert wird [31]. Elektrophysiologische Untersuchungen erwiesen sich hingegen zunächst als schwierig. Messungen konnten erst durchgeführt werden, nachdem die Proteinkonzentration bei der Rekonstitution von AnaD in Proteoliposomen von 20:1 auf 4:1 (Lipid:Protein-Verhältnis) erhöht worden war.

Die an AnaD durchgeführten elektrophysiologischen Versuche verifizierten nicht nur die in den Liposome Swelling Assays gewonnenen Erkenntnisse, sondern brachten zusätzliche Informationen: die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten nämlich darüber hinaus, dass AnaD nicht lediglich eine geöffnete Pore formt, sondern einen Kanal mit eindeutigem Schaltverhalten ausbildet (Abb. 3.9A). Die Analyse der experimentellen Daten ergab einen Hauptleitwert von $g = 450 \pm 35$ pS (Abb. 3.9B), entsprechend einem Porendurchmesser von $d = 1,6$ nm. Dieser Wert liegt in der Größenordnung des unteren Leitwerts des Volllängenproteins ($g = 430$ pS, siehe Abb. 3.8A) und beispielsweise deutlich über den publizierten Leitwerten der Proteine OmpA ($g \leq 180$ pS [80]) und OmpX ($g = 120$ pS [81]), deren β -Barrel ebenfalls aus acht β -Faltblättern bestehen. Die Beobachtung, dass die Leitwerte anderer aus acht β -Faltblättern aufgebauter Kanalproteine weitaus geringer sind, sowie die Tatsache, dass zur Versuchsdurchführung die Proteinkonzentration in den Proteoliposomen erhöht werden musste, legen die Vermutung nahe, dass der Kanal von einem AnaD-Multimer, aufgrund der Größe des Leitwerts vermutlich von einem Dimer gebildet wird. Für das Umkehrpotential des von AnaD gebildeten Kanals wurde ein Wert von $U_{rev} = 39 \pm 1$ mV ($n = 31$) ermittelt (Abb. 3.9C), was einer Kationenselektivität von $P_K:P_{Cl} = 7,4$ entspricht. Die Kationenselektivität des von AnaD gebildeten Kanals liegt somit deutlich über den für das Volllängenprotein sowie die Porenregion bestimmten Werten ($P_K:P_{Cl} = 2,2$). Hieraus lässt sich folgern, dass scheinbar auch der proximale Teil des C-Terminus, der ebenfalls acht β -Faltblätter der Pore bildet, einen Einfluss auf die Selektivität des Proteins haben muss.

3.3.3 Charakterisierung der Omp85-Proteine Alr0075 und Alr4893

3.3.3.1 Alr0075

Alr0075, das kürzeste der drei Omp85-Proteine von *Anabaena* sp. PCC 7120, besteht aus 491 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 54,0 kDa (siehe auch Abb. 3.10D). Das Protein besitzt ein N-terminales Signalpeptid (bestehend aus 24 Aminosäuren), wie eine Analyse des Proteins mit dem Programm SignalP [79] ergab. Während die C-terminale Porenregion von Alr0075 (342 Aminosäuren, aa 150-491, persönliche Mitteilung, O. Mirus) eine ähnliche Größe besitzt wie diejenige von Alr2269 (363 Aminosäuren), ist die N-terminale Domäne von Alr0075 deutlich kürzer (Alr0075: 127 Aminosäuren, Alr2269: 451 Aminosäuren).

Die elektrophysiologischen Untersuchungen von Alr0075 zeigten ein Schaltverhalten, das mit

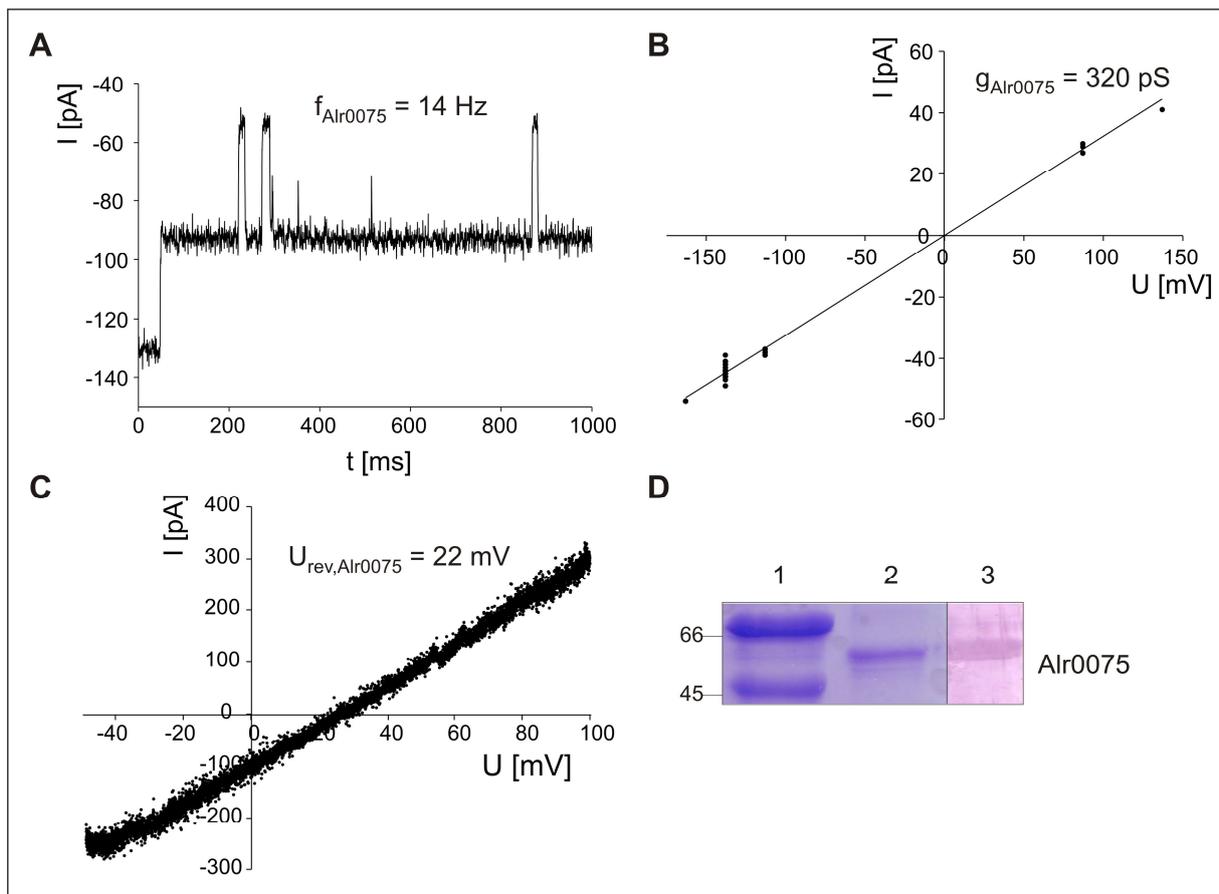


Abbildung 3.10: Elektrophysiologische Ergebnisse von Alr0075. (A) Schaltverhalten von Alr0075 bei $U_{\text{com}} = -113 \text{ mV}$ (Kopienanzahl von Alr0075: $n = 3$), die Schaltfrequenz f von Alr0075 ist angegeben. (B) U-I-Diagramm des Hauptleitwerts von Alr0075, dargestellt ist die lineare Regression der Messdaten, der Hauptleitwert von Alr0075 ist angegeben. (C) Aufnahme der Ergebnisse eines Spannungsrampenversuchs und Angabe des Umkehrpotentials U_{rev} von Alr0075 (vermutliche Kopienanzahl: $n = 3$). (D) Ergebnis der Überexpression von Alr0075. Spalte 1: Proteinstandard (5 μl , Größenangaben in kDa), Spalte 2: 10 μl der eingesetzten Eluatfraktion, Spalte 3: Immunodekoration mit $\alpha\text{Alr0075}$ -Antikörpern.

niedriger Frequenz zwischen offenem und geschlossenem Zustand wechselt ($f = 14$ Hz, Abb. 3.10A). Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied zum Schaltverhalten von Alr2269 (siehe Kap. 3.3.1). Da im Falle von Alr2269 das Schaltverhalten offensichtlich stark von der N-terminalen Domäne des Proteins beeinflusst wird, könnte diese Beobachtung mit dem deutlich kürzeren N-Terminus von Alr0075 zusammenhängen. Zudem konnte bei Alr0075 ein Schaltverhalten erst bei höheren Kommandopotentialen ab $U_{\text{com}} \sim \pm 100$ mV festgestellt werden, wie anhand des U-I-Diagramms in Abb. 3.10B ersichtlich ist.

Aus den gewonnenen Messdaten konnte für Alr0075 ein Hauptleitwert von $g = 320 \pm 16$ pS bestimmt werden (Abb. 3.10B), was einem theoretischen Porendurchmesser von $d = 1,2$ nm entspricht. Der von Alr0075 gebildete Kanal ist somit deutlich kleiner als derjenige von Alr2269 ($d = 1,7$ nm). Das Umkehrpotential von Alr0075 beträgt $U_{\text{rev}} = 22 \pm 2$ mV ($n = 14$, $P_{\text{K}}:P_{\text{Cl}} = 2,9$, Abb. 3.10C), die Kationenselektivität des Kanals ist also etwas größer als bei Alr2269 ($P_{\text{K}}:P_{\text{Cl}} = 2,2$).

3.3.3.2 Alr4893

Der dritte Vertreter der Omp85-Familie in *Anabaena* sp. PCC 7120, Alr4893, besteht aus 676 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 72,4 kDa (siehe auch Abb. 3.11D). Das mit SignalP [79] vorhergesagte Signalpeptid hat eine Länge von 25 Aminosäuren. Die Porenregion besteht aus 338 Aminosäuren (aa 339-676, persönliche Mitteilung, O. Mirus), diese Domäne ist somit nur geringfügig kleiner als die entsprechenden Domänen von Alr0075 (342 Aminosäuren) und Alr2269 (363 Aminosäuren). Die Größe des N-Terminus, der ohne Signalpeptid aus 313 Aminosäuren besteht (aa 26-338), liegt zwischen den aus den Strukturanalysen vorhergesagten Größen von Alr0075 (127 Aminosäuren) und Alr2269 (451 Aminosäuren). Die Aufnahme in Abb. 3.11A zeigt ein Schaltverhalten, das mit hoher Frequenz zwischen geöffnetem und geschlossenem Zustand wechselt ($f = 207$ Hz) und somit eher dem Schaltverhalten von Alr2269 ($f = 396$, siehe Abb. 3.5A) ähnelt. Ursächlich für die in Abb. 3.11A erkennbare Differenz von ~ 8 pA zwischen geschlossenem Kanalzustand und Nullwert ist eine unvollständige Kalibrierung des Nullwerts bei dieser Messung; dies wurde bei der Auswertung der Messdaten berücksichtigt. Der Hauptleitwert von Alr4893 beträgt $g = 370 \pm 34$ pS (Abb. 3.11B), dies entspricht einem theoretischen Porendurchmesser von $d = 1,3$ nm. Während das Schaltverhalten von Alr4893 also eher demjenigen des längeren Omp85-Homologen Alr2269 ähnelt (siehe Abb. 3.5A), gleicht die Porengröße dem Wert, der für das kürzere Alr0075 ermittelt wurde ($d = 1,2$ nm, siehe Kap. 3.3.3.1). Das Umkehrpotential von Alr4893, $U_{\text{rev}} = 26 \pm 2$ mV ($n = 20$, Abb. 3.11C), ergibt eine

3. Ergebnisse

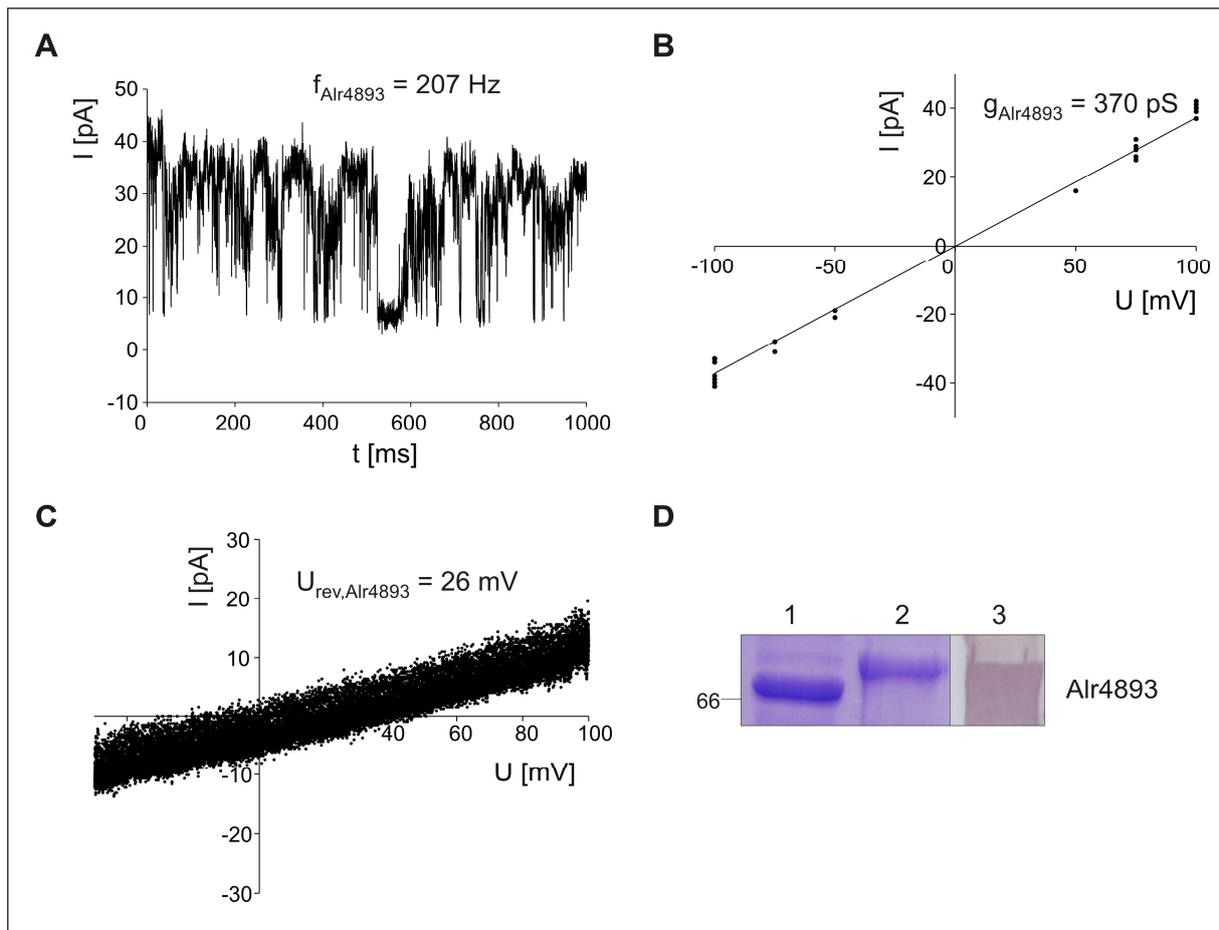


Abbildung 3.11: Elektrophysiologische Ergebnisse von Alr4893. (A) Schaltverhalten von Alr4893 bei $U_{\text{com}} = 75$ mV (Kopienanzahl von Alr4893: $n = 1$), die Schaltfrequenz f von Alr4893 ist angegeben. (B) U - I -Diagramm des Hauptleitwerts von Alr4893, dargestellt ist die lineare Regression der Messdaten, der Hauptleitwert von Alr4893 ist angegeben. (C) Aufnahme der Ergebnisse eines Spannungsrampenversuchs und Angabe des Umkehrpotentials U_{rev} von Alr4893 (vermutliche Kopienanzahl: $n = 1$). (D) Ergebnis der Überexpression von Alr4893. Spalte 1: Proteinstandard (5 μ l, Größenangabe in kDa), Spalte 2: 10 μ l der eingesetzten Eluatfraktion, Spalte 3: Immunodekoration mit α Alr4893-Antikörpern.

Kationenselektivität von $P_{\text{K}}:P_{\text{Cl}} = 3,5$. Dieser Wert ist der höchste aller drei Omp85-Vertreter von *Anabaena* sp. PCC 7120, die Kationenselektivität ist damit mehr als doppelt so hoch wie die für Alr2269 bestimmte ($P_{\text{K}}:P_{\text{Cl}} = 1,7$).

3.4 psToc75, der Translokationskanal der äußeren Chloroplasten-Hüllmembran von *Pisum sativum*

Nach der Charakterisierung der Omp85-Vertreter von *Anabaena* sp. PCC 7120, des nächsten Verwandten der Chloroplasten, rückte nunmehr die Frage in den Mittelpunkt, inwiefern sich die elektrophysiologischen Eigenschaften von Alr2269 mit denen des plastidären Translokationskanals Toc75 decken. Wie bereits erwähnt, ist Alr2269 das Omp85-Protein aus *Anabaena*, das die höchste Ähnlichkeit zu Toc75 aufweist (siehe Kap. 1.3.1). Der Translokationskanal von *Pisum sativum* (psToc75) hat mit einer Länge von 809 Aminosäuren

3. Ergebnisse

und einem Molekulargewicht von 88,3 kDa eine vergleichbare Größe wie Alr2269. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von psToc75 und Alr2269 ergab eine Identität von 19,4 % und eine Ähnlichkeit von 29,3 % [31]. Importversuche und die Sequenzierung von endogenem psToc75 wiesen jedoch eine vergleichsweise deutlich längere Signalsequenz von 131 Aminosäuren (Alr2269: 19 Aminosäuren) nach [82]. Bereits publizierte Ergebnisse elektrophysiologischer Untersuchungen von psToc75 zeigten ein Schaltverhalten, das mit einer niedrigen Frequenz zwischen geöffnetem und geschlossenem Zustand wechselte [73, 83]. Aus diesen Messungen konnte ein Hauptleitwert von 1,3 nS bei 1 M KCl (*cis/trans*) ermittelt werden. Dieser hohe Hauptleitwert erklärt sich aus der hohen eingesetzten KCl-Konzentration. Die Umrechnung dieses Leitwerts in einen Kanaldurchmesser ergab einen theoretischen Wert von $d = 1,54$ nm (dieser Durchmesser entspräche in Versuchen, die wie in

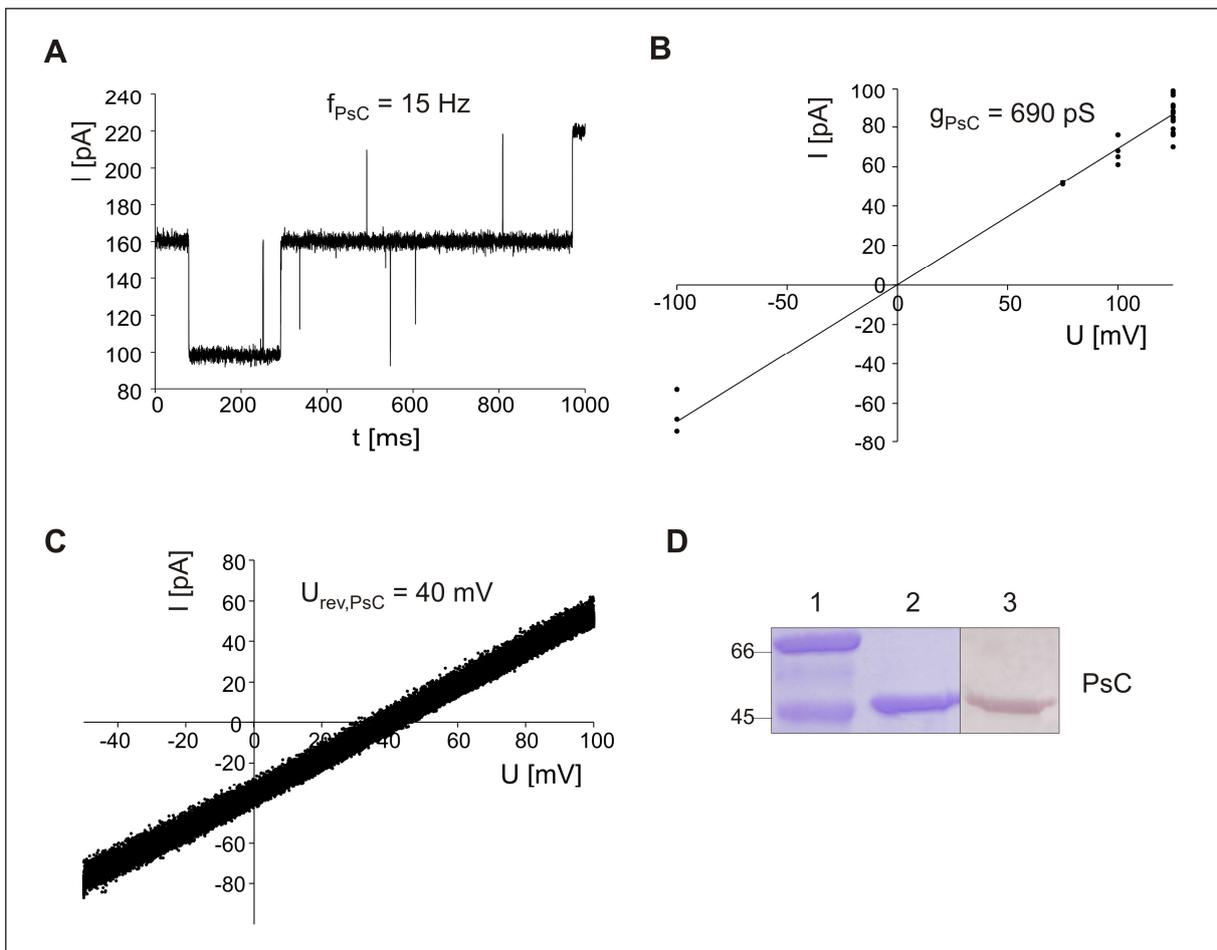


Abbildung 3.12: Elektrophysiologische Ergebnisse von PsC. (A) Schaltverhalten von PsC bei $U_{\text{com}} = 125$ mV (Kopienanzahl von PsC: $n = 4$), die Schaltfrequenz f von PsC ist angegeben. (B) U-I-Diagramm des Hauptleitwerts von PsC, dargestellt ist die lineare Regression der Messdaten, der Hauptleitwert von PsC ist angegeben. (C) Aufnahme der Ergebnisse eines Spannungsrampenversuchs und Angabe des Umkehrpotentials U_{rev} von PsC (vermutliche Kopienanzahl: $n = 1$). (D) Ergebnis der Überexpression von PsC. Spalte 1: Proteinstandard (5 μl , Größenangaben in kDa), Spalte 2: 10 μl der eingesetzten Eluatfraktion, Spalte 3: Immunodekoration mit $\alpha\text{psToc75}$ -Antikörpern.

3. Ergebnisse

der vorliegenden Arbeit bei einer Elektrolytkonzentration von 250 mM KCl durchgeführt worden wären, einem Leitwert von ca. 440 pS). Das Umkehrpotential von psToc75 wurde als $U_{rev} = 48 \text{ mV}$ ($P_K:P_{Cl} = 14,3$) ermittelt [73]. Damit zeigen die aus der Literatur zugänglichen Daten deutliche Unterschiede zu den in dieser Arbeit für Alr2269 ermittelten Ergebnissen. Das Schaltverhalten beider Proteine differiert deutlich (Alr2269: 396 Hz, siehe Abb. 3.5A, psToc75: niederfrequent), der Porendurchmesser von psToc75 ist geringer (Alr2269: 1,7 nm, siehe Kap. 3.3.1), die Kationenselektivität des plastidären Omp85-Proteins hingegen ist sehr viel stärker ausgeprägt (Alr2269: $P_K:P_{Cl} = 2,2$, siehe Kap. 3.3.1).

Um zu untersuchen, inwiefern die C-terminale Porendomäne alleine für diese Unterschiede verantwortlich ist und ob, wie bei Alr2269, auch bei psToc75 die N-terminale Domäne die elektrophysiologischen Eigenschaften des Proteins beeinflusst, wurden, analog zu den Versuchen mit Alr2269, anhand des Topologiemodells [34] die in Tab. 2.1 erwähnten und in Abb. 2.1 dargestellten Teilkonstrukte der beiden Hauptdomänen von psToc75 hergestellt und elektrophysiologisch charakterisiert. Das C-terminale Konstrukt PsC besteht aus 371 Aminosäuren (aa 439-809, MW 40,2 kDa, siehe auch Abb. 3.12D) und besitzt damit eine fast identische Länge zum Alr2269-Porenkonstrukt AnaC (367 Aminosäuren). Das Schaltverhalten von PsC wechselt mit niedriger Frequenz zwischen geöffnetem und geschlossenem Zustand ($f = 15 \text{ Hz}$, Abb. 3.12A). Die Auswertung der Messdaten ergab einen Hauptleitwert von $g = 690 \pm 80 \text{ pS}$ (Abb. 3.12B), entsprechend einem theoretischen Porendurchmesser von $d = 2,2 \text{ nm}$. Wie im Falle von Alr0075 (siehe Kap. 3.3.3.1 und Abb. 3.10B) konnten bei PsC Schaltereignisse erst bei höherem Kommandopotential U_{com} festgestellt werden (Abb. 3.12B). Für das Umkehrpotential von PsC wurde ein Wert von $U_{rev} = 40 \pm 1 \text{ mV}$ ($n = 15$, $P_K:P_{Cl} = 7,9$, Abb. 3.12C) ermittelt. Hinsichtlich des Schaltverhaltens unterscheiden sich Vollängenprotein und Porendomäne wenig (psToc75: niederfrequent [73], psC: $f = 15 \text{ Hz}$). Was die Porengröße betrifft, zeigen sich hingegen gravierende Unterschiede (psToc75: $d = 1,5 \text{ nm}$ [73], PsC: $d = 2,2 \text{ nm}$). Die für PsC bestimmte Porengröße entspricht damit fast dem 1,5-fachen des für psToc75 ermittelten Werts. Eine ähnliche Beobachtung konnte, allerdings in geringerem Ausmaß, beim C-terminalen und kompletten Alr2269-Protein festgestellt werden (Alr2269: $d = 1,7 \text{ nm}$, AnaC: $d = 1,9 \text{ nm}$, siehe Kap. 3.3.1). Auch die Kationenselektivitäten von psToc75 und PsC weisen deutliche Unterschiede auf (psToc75: $P_K:P_{Cl} = 14,3$ [73], PsC: $P_K:P_{Cl} = 7,9$). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei psToc75 die N-terminale Domäne scheinbar vor allem Porengröße und Selektivität beeinflusst, während beim cyanobakteriellen Verwandten Alr2269 durch den N-Terminus ein stark verändertes Schaltverhalten und die Bildung von Unterleitwerten hervorgerufen werden.

3. Ergebnisse

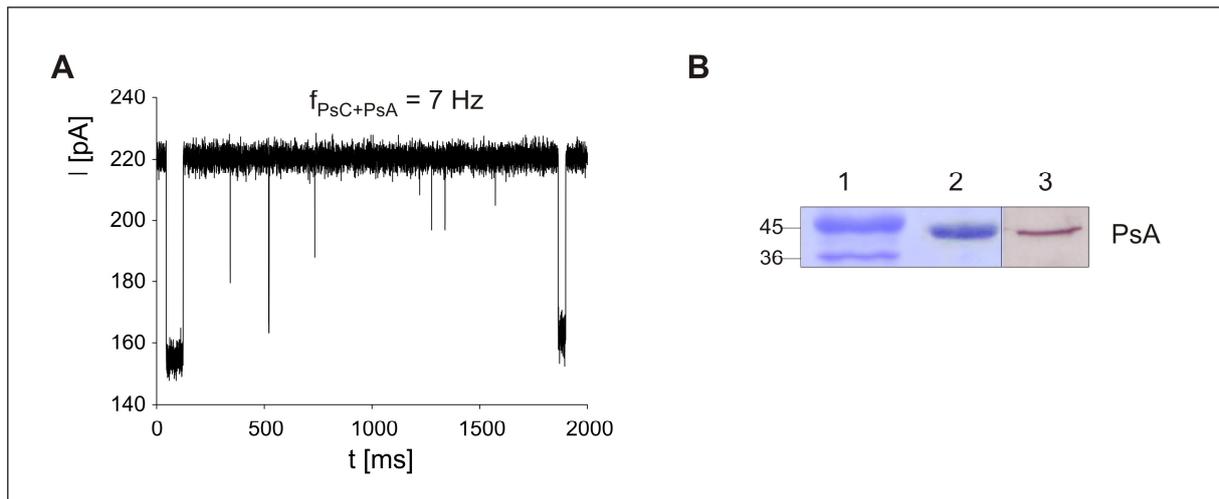


Abbildung 3.13: Effekt von PsA auf das Schaltverhalten von PsC. (A) Schaltverhalten von PsC nach Zugabe von 0,1 μM PsA bei $U_{\text{com}} = 125 \text{ mV}$ (Kopienanzahl von PsC: $n = 4$), die Schaltfrequenz f von PsC nach PsA-Zugabe ist angegeben. (B) Ergebnisse der Überexpression von PsA. Spalte 1: Proteinstandard (5 μl , Größenangaben in kDa), Spalte 2: 10 μl der eingesetzten Eluatfraktion, Spalte 3: Immunodekoration mit $\alpha\text{psToc75}$ -Antikörpern.

Bei Alr2269 konnte eine hohe Affinität der N-terminalen Domäne zur Porenregion gezeigt werden (siehe Kap. 3.3.1). Daher stellte sich die Frage, ob es auch bei psToc75 Hinweise auf eine solche Affinität gibt. Außerdem war von Interesse, ob sich bei psToc75 die elektrophysiologischen Eigenschaften der Porenregion nach Zugabe des N-Terminus möglicherweise so verändern, dass sie, wie bei Alr2269 beobachtet, denen des Vollängenproteins ähneln. Aus diesen Gründen wurde das Konstrukt PsA hergestellt. PsA besteht aus 291 Aminosäuren (aa 149-439, MW 33,1 kDa, siehe auch Abb. 2.1, Abb. 3.13B und Tab. 2.1) und umfasst den Bereich des N-Terminus, der die POTRA-Domäne beinhaltet. Wiederum wurde zunächst das Porenkonstrukt PsC mit dem Bilayer fusioniert, danach wurde PsA in einer Endkonzentration von 0,1 μM (*cis/trans*) in die Messkammer zugegeben. Im Gegensatz zu den bei Alr2269 beobachteten Veränderungen (vgl. Abb. 3.6A und 3.7A) zeigten sich bei diesem Versuch allerdings keinerlei Effekt auf die elektrophysiologischen Eigenschaften (vgl. 3.12A und 3.13A). Auch 10 min nach Zugabe von PsA sowie nach einer weiteren Erhöhung der PsA-Konzentration auf 1 μM betrug der aus den Messdaten bestimmte Hauptleitwert unverändert $g = 690 \text{ pS}$. Die Schaltfrequenz betrug 7 Hz (Abb. 3.13A) und lag somit in derselben Größenordnung wie der für PsC ermittelte Wert ($f = 15 \text{ Hz}$, Abb. 3.12A). Die Affinität der N-terminalen Domäne zur Porenregion scheint somit beim plastidären Importkanal nicht vorhanden oder zumindest deutlich reduziert zu sein, eine Beobachtung, die auch durch Ergebnisse von *in vitro*-Interaktionsanalysen gestützt wird [36].

Zum Abschluss der Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften des plastidären Importkanals Toc75 sollte die Frage beantwortet werden, ob die Eigenschaften des am

3. Ergebnisse

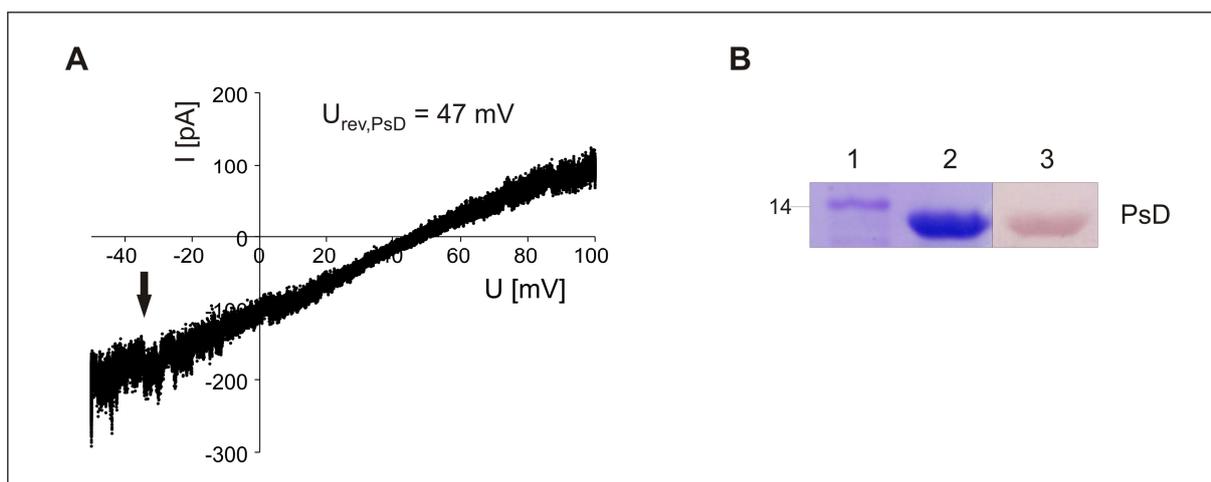


Abbildung 3.14: Elektrophysiologische Ergebnisse von PsD. (A) Aufnahme der Ergebnisse eines Spannungsrampenversuchs und Angabe des Umkehrpotentials U_{rev} von PsD (vermutliche Kanalanzahl von PsD: $n = 3$). Ein Schaltereignis des Kanals ist durch einen Pfeil markiert. (B) Ergebnis der Überexpression von PsD. Spalte 1: Proteinstandard (5 μl , Größenangabe in kDa), Spalte 2: 10 μl der eingesetzten Eluatfraktion, Spalte 3: Immunodekoration mit $\alpha\text{psToc75}$ -Antikörpern.

stärksten konservierten, distalen C-Terminus von Alr2269 und psToc75 vergleichbar wären. Hierzu wurde das Konstrukt PsD (aa 679-809, MW 13,9 kDa, siehe auch Abb. 2.1, 3.14B und Tab. 2.1) erstellt, das wie das in Kap. 3.3.2 beschriebene AnaD-Konstrukt die letzten acht β -Faltblätter der Porenregion umfasst. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von AnaD und PsD mit dem Programm ClustalW [84] ergab eine Identität von 34,1 % und eine Ähnlichkeit von 51,5 %, beide Werte liegen deutlich über den Werten, die beim Sequenzvergleich von Alr2269 und psToc75 ermittelt wurden (siehe oben). Die mit PsD durchgeführten Experimente zeigen, dass der distale C-Terminus von psToc75 (ebenso wie derjenige von Alr2269) in der Lage ist, eine Kanalpore auszubilden. Wie bei AnaD konnten mit PsD erst Messungen durchgeführt werden, nachdem bei der Rekonstitution in Proteoliposomen der Proteinanteil von 20:1 auf 4:1 (Lipid:Protein-Verhältnis) erhöht worden war. Das Umkehrpotential des durch PsD gebildeten Kanals beträgt $U_{\text{rev}} = 47 \pm 1$ mV ($n = 13$, Abb. 3.14A), was einer Kationenselektivität von $P_{\text{K}}:P_{\text{Cl}} = 13,1$ entspricht. Leider war es lediglich möglich, das Umkehrpotential von PsD zu bestimmen, Messungen zur Bestimmung des Hauptleitwerts gelangen nicht. Weder eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in der *cis*-Halbkammer auf 30 mM, um die Fusion der Proteoliposomen mit dem Bilayer zu fördern, noch die 10-fache Erhöhung der Konzentration der AnaD-Proteoliposomen ermöglichte Messungen zur Leitwertbestimmung. Die in Abb. 3.14A dargestellte Aufnahme eines Spannungsrampenversuchs mit PsD ist allerdings insofern aufschlussreich, dass hier mehrmals Schaltvorgänge zu beobachten sind (z.B. bei einem Kommandopotential von $U_{\text{rev}} \sim -35$ mV (durch Pfeil markiert)). Offensichtlich ist also auch der von PsD gebildete

Kanal in der Lage, seinen Öffnungszustand zu ändern. Weiterhin zeigt sich, dass trotz der hohen Ähnlichkeit des extremen C-Terminus einzelner Vertreter der Omp85-Familie deutliche Unterschiede in der Ionenselektivität feststellbar sind, selbst bei nah verwandten Vertretern wie Alr2269 und psToc75 (AnaD: $P_K:P_{Cl} = 7,4$; PsD: $P_K:P_{Cl} = 13,1$).

3.5 YaeT, das Omp85-Protein des Proteinintegrationskomplexes der äußeren Membran von *Escherichia coli*

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln Ergebnisse zu Proteinen aus dem Toc75-Zweig der Omp85-Familie beschrieben wurden, stellte sich nunmehr die Frage, ob sich Unterschiede zu den elektrophysiologischen Eigenschaften von Vertretern der Sam50-Unterfamilie (siehe Abb. 1.1) feststellen lassen. Zur elektrophysiologischen Charakterisierung wurde das

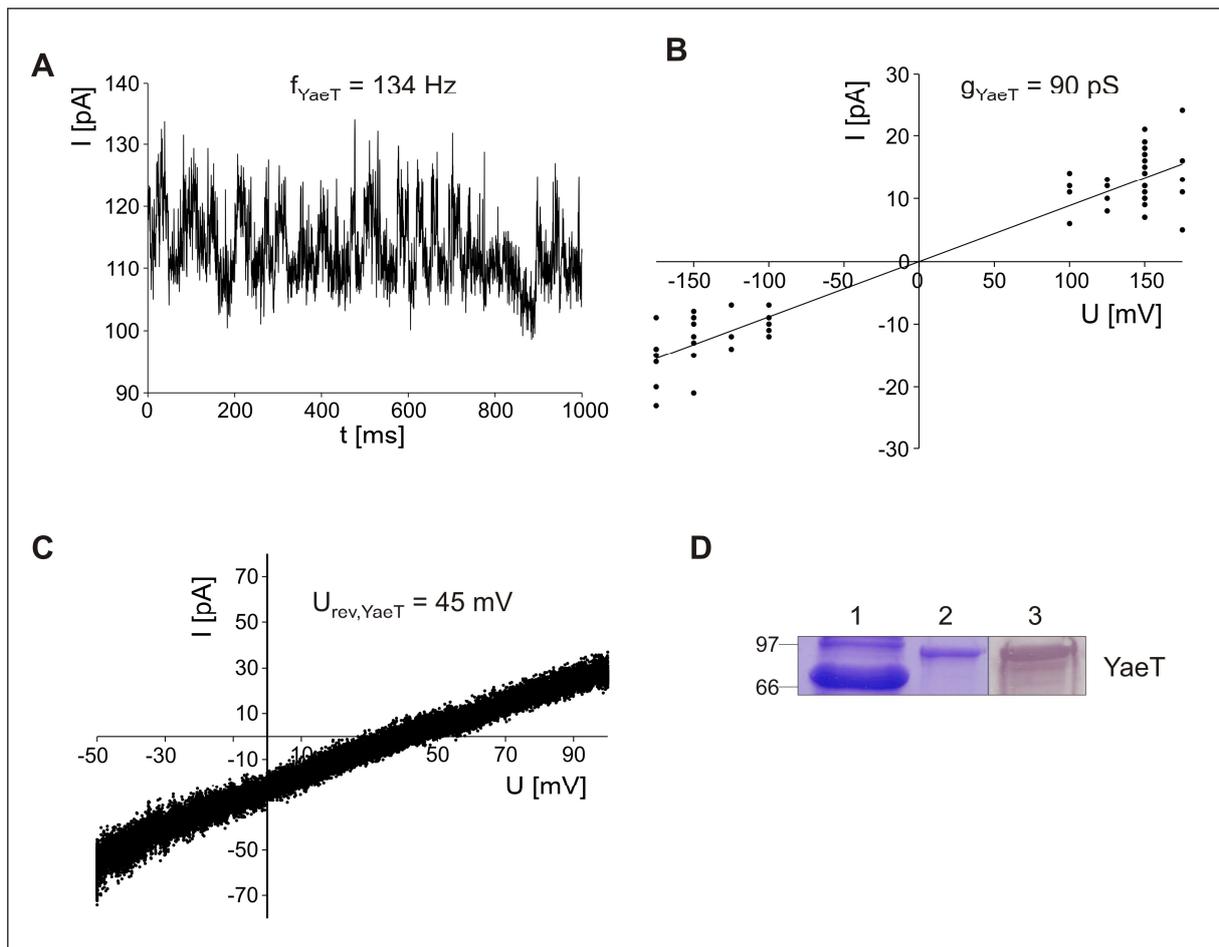


Abbildung 3.15: Elektrophysiologische Ergebnisse von YaeT. (A) Schaltverhalten von YaeT bei $U_{com} = 125$ mV (Kopienanzahl von YaeT: $n = 13$), die Schaltfrequenz f von YaeT ist angegeben. (B) U-I-Diagramm des Hauptleitwerts von YaeT, dargestellt ist die lineare Regression der Messdaten, der Hauptleitwert von YaeT ist angegeben. (C) Aufnahme der Ergebnisse eines Spannungsrampenversuchs und Angabe des Umkehrpotentials U_{rev} von YaeT (vermutliche Kopienanzahl: $n = 2$). (D) Ergebnis der Überexpression von YaeT. Spalte 1: Proteinstandard (5 μ l, Größenangaben in kDa), Spalte 2: 10 μ l der eingesetzten Eluatfraktion, Spalte 3: Immunodekoration mit α YaeT-Antikörpern.

3. Ergebnisse

prokaryotische Omp85-Protein YaeT aus *E. coli* ausgewählt. YaeT besteht aus 810 Aminosäuren (MW 90,6 kDa, siehe auch Abb. 3.15D), von denen allerdings die ersten 20 Aminosäuren mittels SignalP [79] als Signalpeptid vorhergesagt wurden. Die in Abb. 3.15A dargestellte Aufnahme zeigt ein hochfrequentes Schaltverhalten ($f = 134$ Hz). Die Auswertung der Messdaten ergab einen Hauptleitwert von $g = 90 \pm 27$ pS (Abb. 3.15B), was einem theoretischen Porendurchmesser von $d = 0,5$ nm entspricht. Stegmeier et al. publizierten kürzlich für YaeT einen Hauptleitwert von $g = 125$ pS [85]. Hierbei ist anzumerken, dass dieser Wert bei einer etwas höheren Elektrolytkonzentration von 300 mM KCl bestimmt wurde, somit decken sich deren Ergebnisse weitgehend mit den in dieser Arbeit erzielten Werten. Das Umkehrpotential von YaeT beträgt $U_{\text{rev}} = 45 \pm 3$ mV ($n = 26$, Abb. 3.15C, $P_{\text{K}}:P_{\text{Cl}} = 11,2$). Der deutlichste Unterschied im elektrophysiologischen

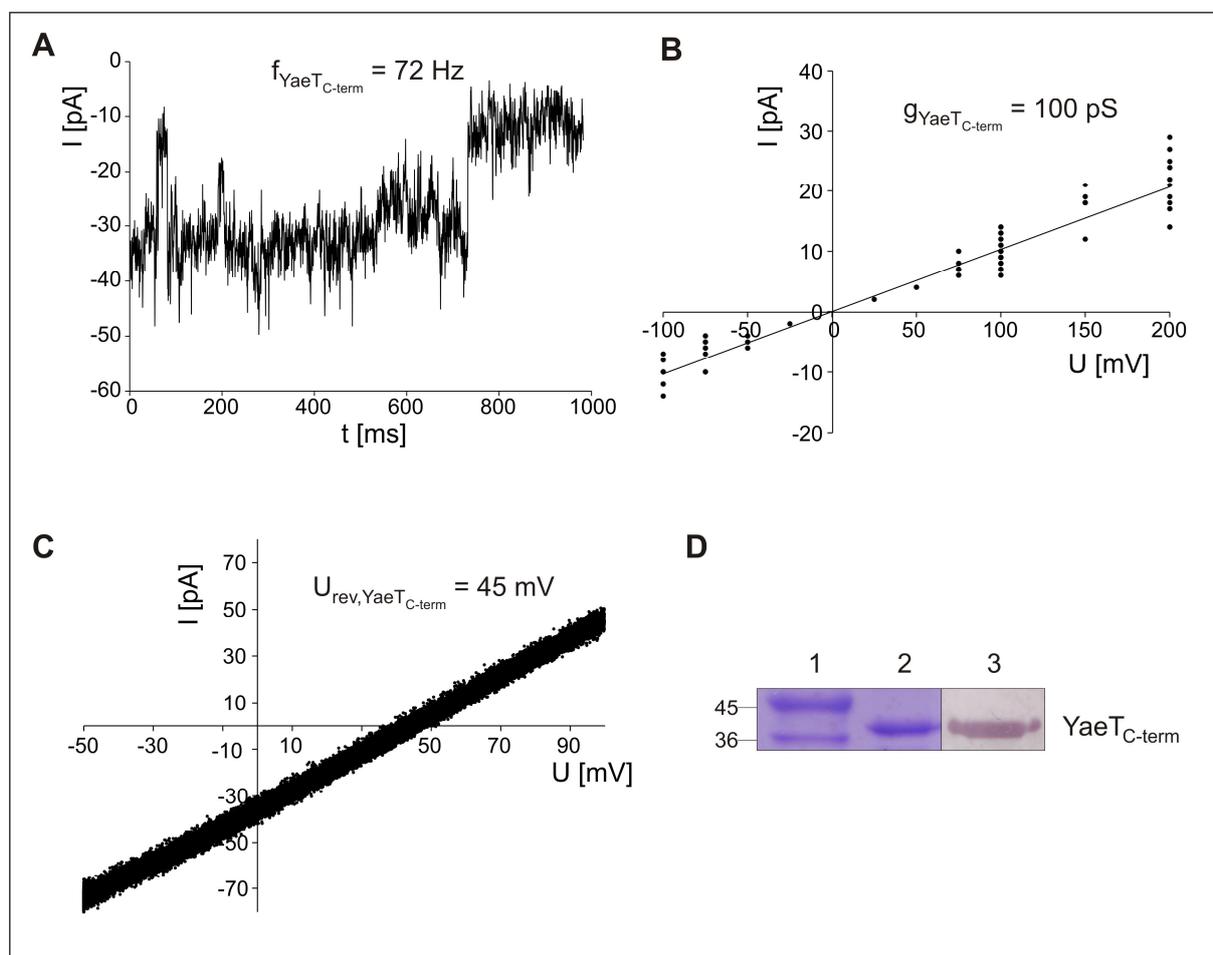


Abbildung 3.16: Elektrophysiologische Ergebnisse von YaeT_{C-term}. (A) Schaltverhalten von YaeT_{C-term} bei $U_{\text{com}} = -100$ mV (Kopienanzahl von YaeT_{C-term}: $n = 4$), die Schaltfrequenz f von YaeT_{C-term} ist angegeben. (B) U-I-Diagramm des Hauptleitwerts von YaeT_{C-term}, dargestellt ist die lineare Regression der Messdaten, der Hauptleitwert von YaeT_{C-term} ist angegeben. (C) Aufnahme der Ergebnisse eines Spannungsrampenversuchs und Angabe des Umkehrpotentials U_{rev} von YaeT_{C-term} (vermutliche Kopienanzahl: $n = 3$). (D) Ergebnis der Überexpression von YaeT_{C-term}. Spalte 1: Proteinstandard (5 µl, Größenangaben in kDa), Spalte 2: 10 µl der eingesetzten Eluatfraktion, Spalte 3: Immunodekoration mit α YaeT-Antikörpern.

Verhalten von YaeT und den Omp85-Vertretern des Toc75-Zweigs findet sich beim Vergleich der Hauptleitwerte: diese sind bei den untersuchten Proteinen der Toc75-Unterfamilie 4- bis 5-mal größer als bei YaeT. Das Schaltverhalten des Proteins der Sam50-Unterfamilie ähnelt hingegen demjenigen von Alr2269 und Alr4893; bei diesen Proteinen war ebenfalls ein häufiges Wechseln zwischen den Öffnungszuständen zu beobachten (siehe Kap. 3.3.1 und 3.3.3.2). Die hohe Kationenselektivität hingegen ähnelt eher derjenigen des plastidären Importkanals psToc75. Um zu untersuchen, ob auch bei einem Vertreter der Sam50-Familie die N-terminale Domäne einen Einfluss auf das Schaltverhalten (wie im Falle von Alr2269, siehe Kap. 3.3.1) und den Leitwert (wie im Falle von Alr2269 und psToc75, siehe Kap. 3.3.1 und 3.4) hat, wurde ein C-terminales Konstrukt von YaeT erstellt, das nur die Porenregion dieses Proteins umfasst. Das Teilkonstrukt YaeT_{C-term} besteht aus 338 Aminosäuren (aa 473-810) und hat ein Molekulargewicht von 38,0 kDa (siehe auch Abb. 2.1, Abb. 3.16D und Tab. 2.1).

YaeT_{C-term} zeigt ein hochfrequentes Schaltverhalten, das allerdings im Vergleich zum Volllängenprotein YaeT ($f = 134$ Hz) deutlich seltener zwischen geöffnetem und geschlossenem Zustand wechselt ($f = 72$ Hz, vgl. Abb. 3.15A und Abb. 3.16A). Die Leitwertbestimmung (Abb. 3.16B) ergab einen Hauptleitwert von $g = 100 \pm 23$ pS, entsprechend einem theoretischen Porendurchmesser von $d = 0,5$ nm. Das Umkehrpotential von YaeT_{C-term} beträgt $U_{rev} = 45 \pm 3$ mV ($n = 31$, Abb. 3.16C), was einer Kationenselektivität von $P_K:P_{Cl} = 11,2$ entspricht. Ein Vergleich des Schaltverhaltens von YaeT und seiner isolierten Porenregion zeigt, dass der N-Terminus zwar einen eindeutigen Einfluss auf das Schaltverhalten des Proteins zu haben scheint, da das Schaltverhalten der Porenregion mit niedrigerer Frequenz zwischen den Öffnungszuständen wechselt als beim Volllängenprotein YaeT, dass dieser Einfluss allerdings nicht so ausgeprägt ist wie im Falle des cyanobakteriellen Proteins Alr2269 (siehe Kap. 3.3.1). Darüber hinaus kann kein signifikanter Einfluss des N-Terminus auf den Leitwert und die Ionenselektivität des YaeT-Kanals festgestellt werden, da diese Parameter beim Volllängenprotein und der Porenregion weitgehend identisch sind.

3.6 Das mitochondrielle Omp85-Protein dmSam50 von *Drosophila melanogaster*

Abschließend wurde ein Protein aus der Sam50-Unterfamilie der Omp85-Proteine untersucht, das, analog zum plastidären Importkanal Toc75, ein Vertreter dieses Zweigs ist, welcher eine Funktion in einem eukaryotischen, endosymbiotisch entstandenen Organell besitzt. Hierfür

3. Ergebnisse

wurde das mitochondrielle Protein dmSam50 aus *Drosophila melanogaster* ausgewählt. Im Unterschied zum Verhältnis vom prokaryotischen Alr2269 zum eukaryotischen Toc75 stellt YaeT zwar nicht den nächsten bekannten Verwandten des mitochondrialen Sam50-Proteins dar, funktionell ergeben sich aber eindeutige Parallelen, da beide Proteine die zentralen Komponenten von Proteinkomplexen bilden, die die Integration von β -Barrel-Proteinen in die äußere Membran ermöglichen (siehe Kap. 1.3.2).

Das Omp85-Protein dmSam50 besteht aus 464 Aminosäuren (MW 51,4 kDa, siehe auch Abb. 3.17D). Im Unterschied zu allen anderen in dieser Arbeit untersuchten Proteinen konnte mittels SignalP [79] kein Signalpeptid vorhergesagt werden. Die N-terminale Domäne besteht aus 128 Aminosäuren, der C-terminale Teil besitzt mit 336 Aminosäuren eine zum C-Terminus von YaeT vergleichbare Länge (aa 129-464, persönliche Mitteilung, O. Mirus).

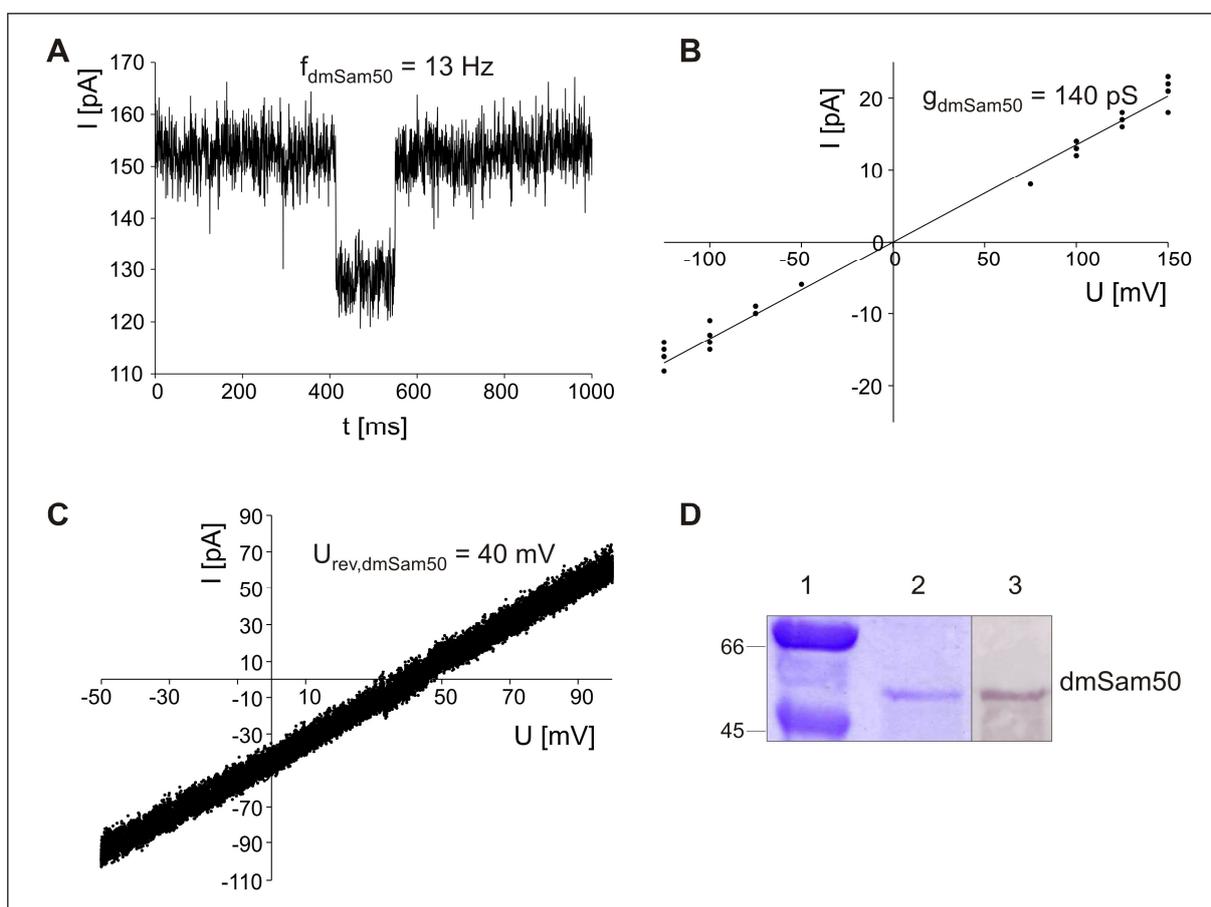


Abbildung 3.17: Elektrophysiologische Ergebnisse von dmSam50. (A) Schaltverhalten von dmSam50 bei $U_{com} = 150$ mV (Kopienanzahl von dmSam50: $n = 6$), die Schaltfrequenz f von dmSam50 ist angegeben. (B) U-I-Diagramm des Hauptleitwerts von dmSam50, dargestellt ist die lineare Regression der Messdaten, der Hauptleitwert von dmSam50 ist angegeben. (C) Aufnahme der Ergebnisse eines Spannungsrampenversuchs und Angabe des Umkehrpotentials U_{rev} von dmSam50 (vermutliche Kopienanzahl: $n = 3$). (D) Ergebnis der Überexpression von dmSam50. Spalte 1: Proteinstandard (5 μ l, Größenangaben in kDa), Spalte 2: 10 μ l der eingesetzten Eluatfraktion, Spalte 3: Immunodekoration mit α dmSam50-Antikörpern.

3. Ergebnisse

dmSam50 zeigt eine niedrige Schaltfrequenz zwischen den Öffnungszuständen des Kanals ($f = 13$ Hz, Abb. 3.17A). Die Analyse der Messdaten ergab einen Hauptleitwert von $g = 140 \pm 11$ pS (theoretischer Porendurchmesser $d = 0,7$ nm, Abb. 3.17B). Das Umkehrpotential von dmSam50 beträgt $U_{\text{rev}} = 40 \pm 2$ mV ($n = 35$, $P_K : P_{Cl} = 7,9$, Abb. 3.17C).

Das Schaltverhalten von dmSam50 unterscheidet sich ähnlich stark von demjenigen des prokaryotischen Verwandten YaeT wie dasjenige von psToc75 von seinem cyanobakteriellen Verwandten Alr2269. Dagegen liegt der niedrige Hauptleitwert von dmSam50 in derselben Größenordnung wie derjenige von YaeT, was eine gemeinsame Eigenschaft dieses Zweigs der Omp85-Familie darstellen könnte. Die Selektivität befindet sich bei YaeT und dmSam50 in einem vergleichbaren Bereich. Dies steht im Gegensatz zu den deutlichen Selektivitätsunterschieden zwischen den cyanobakteriellen Vertretern und psToc75 (siehe Kap. 3.3 und 3.4).

4. Diskussion

4.1 Zusammenhang zwischen der Phylogenie der Omp85-Familie und ihren elektrophysiologischen Eigenschaften

In Tab. 4.1 sind die Ergebnisse der elektrophysiologischen Versuche mit den in dieser Arbeit behandelten Proteinen bzw. deren Teilkonstrukten zusammengefasst, Abb. 4.1 zeigt eine Zusammenfassung der wichtigsten Eigenschaften verschiedener Vertreter der beiden Untergruppen der Omp85-Familie. Gemeinsames Merkmal aller untersuchten Proteine der Omp85-Familie ist ihre Kationenselektivität, deren Stärke allerdings zwischen den untersuchten Proteinen variiert (von $P_K:P_{Cl}=2,2$ (Alr2269) bis $P_K:P_{Cl}=14,3$ (psToc75), Tab 4.1). Viele, aber nicht alle β -Barrel-Proteine sind kationenselektiv. Diese Eigenschaft ist allerdings unabhängig von der Anzahl der membrandurchspannenden β -Faltblätter, aus denen das β -Barrel gebildet wird. So wurden Proteine, deren β -Barrel aus acht (z.B. OmpA [80]) bzw. 16 β -Faltblättern aufgebaut ist (z.B. PhoE [86] und NmpC [87]), als anionenselektiv identifiziert, während kationenselektive β -Barrel-Proteine mit acht (z.B. OmpX [88]), zehn (z.B. OmpT [89]), 16 (z.B. OmpF [90]), 18 (z.B. LamB [87, 91]) und 22 β -Faltblättern (z.B. FhuA [92]) gefunden werden konnten. Darüber hinaus nimmt das mitochondrielle β -Barrel-Protein VDAC verschiedene Schaltzustände ein, die teils Anionen-, teils Kationenselektivität

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der elektrophysiologischen Versuche. Aufgeführt sind die untersuchten Omp85-Proteine sowie deren Teilkonstrukte, die Schaltfrequenz, der Hauptleitwert und das Umkehrpotential. Weiterhin ist der aus dem Hauptleitwert berechnete Porendurchmesser sowie die aus dem Umkehrpotential abgeleitete Ionenselektivität angegeben. Die Vertreter der Toc75-Unterfamilie sind oberhalb, die der Sam50-Unterfamilie unterhalb des Doppelstrichs aufgeführt. ^aDaten übernommen aus [73], n.d. = nicht detektiert

Protein	Schaltfrequenz f [Hz]	Hauptleitwert g [pS]	Umkehrpotential U_{rev} [mV]	Porendurchmesser d [nm]	Selektivität [$P_K:P_{Cl}$]
Alr2269	396	500	17	1,7	2,2
AnaC	3,5	580	17	1,9	2,2
AnaD	niederfrequent	450	39	1,6	7,4
AnaC+AnaA	186	520	n.d.	1,8	n.d.
Alr0075	14	320	22	1,2	2,9
Alr4893	207	370	26	1,3	3,5
psToc75 ^a	niederfrequent	440	48	1,5	14,3
PsC	15	690	40	2,2	7,9
PsD	n.d.	n.d.	47	n.d.	13,1
PsC+PsA	7	690	n.d.	2,2	n.d.
YaeT	134	90	45	0,5	11,2
YaeT _{C-term}	72	100	45	0,5	11,2
dmSam50	13	140	40	0,7	7,9

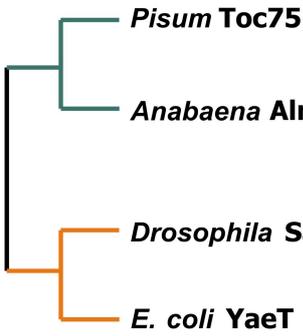
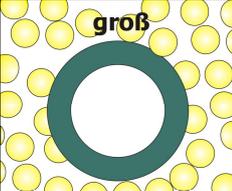
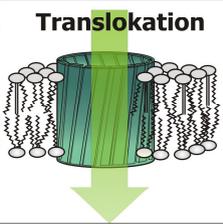
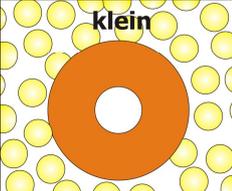
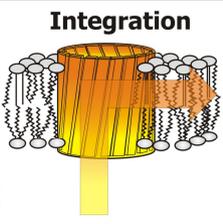
	Eigenschaften		Porengröße	Funktion
	$P_K:P_{Cl}$	\emptyset		
	14,3	1,5 nm	 groß	 Translokation
	2,2	1,7 nm	 klein	 Integration
	7,9	0,7 nm		
	11,2	0,5 nm		

Abbildung 4.1: Vermuteter Zusammenhang zwischen Porendurchmesser und Funktion innerhalb der Unterfamilien der Omp85-Familie. Links ist ein vereinfachter Stammbaum der Omp85-Familie mit den ermittelten Selektivitäten und Porendurchmessern dargestellt, in der Mitte ist der ermittelte Unterschied in der Porengröße innerhalb der beiden Zweige der Omp85-Familie qualitativ skizziert und rechts ist ein Modell der funktionellen Unterschiede der beiden Unterfamilien gezeigt. Verändert nach [94].

aufweisen [93]. Auch bei strukturell sehr ähnlichen β -Barrel-Proteinen kann sich die Selektivität deutlich unterscheiden. So weisen das kationenselektive Protein OmpF und das anionenselektive Protein PhoE eine Sequenzidentität von 72 % auf [30]. Insofern weist das in dieser Arbeit erzielte Ergebnis, dass alle untersuchten Vertreter kationenselektiv sind, auf eine innerhalb der Omp85-Familie ähnliche Ladungsverteilung im Inneren der Kanalpore hin. Diese scheint in der Sam50-Unterfamilie stärker konserviert zu sein, da die hier berechneten Kationenselektivitäten in derselben Größenordnung liegen, während sie bei den untersuchten Vertretern der Toc75-Unterfamilie hinsichtlich ihrer Stärke deutliche Unterschiede zueinander aufweisen (Tab 4.1).

Eindeutig unterscheiden sich die untersuchten Vertreter des Toc75- und des Sam50-Zweigs der Omp85-Familie hinsichtlich der aus den Hauptleitwerten abgeleiteten Porengrößen der Kanäle (Toc75-Zweig: 1,3 - 1,7 nm, Sam50-Zweig: 0,5 - 0,7 nm, Tab. 4.1). Dieser deutliche Unterschied könnte mit der unterschiedlichen Funktion der Omp85-Proteine der beiden Unterfamilien korrelieren (Abb. 4.1). Zumindest beim plastidären Importkanal Toc75 wird für die Proteintranslokation durch die Membran eine Porengröße benötigt, die die Durchschleusung einer entfalteten Polypeptidkette ermöglicht. Diese Voraussetzung trifft für die ermittelten Porengrößen der untersuchten Vertreter der Toc75-Unterfamilie zu, deren Durchmesser ausreichend für den Transport von Polypeptidketten durch die Membran sind [95]. Die Omp85-Proteine YaeT und Sam50 hingegen sind Komponenten von Translokationsapparaten, mit deren Hilfe Proteine in die Membran integriert, nicht aber durch die Membran geschleust werden müssen. Da die exakte Funktion der Omp85-Proteine in

Anabaena noch nicht geklärt ist, stellt sich die Frage, ob deren Porengröße einen Hinweis auf ihre Funktion liefern könnte (siehe auch Kap. 4.3). Wie bereits erwähnt, scheint sich der Toc75-Importkanal aus dem Vorfahren von Alr2269 entwickelt zu haben (siehe Kap. 1.3.1), vermutlich weil dieses Protein eine ausreichend große Pore zur Durchschleusung einer Polypeptidkette bereitstellte. Zusätzlich könnte die Tatsache, dass Alr2269 bestimmte Signalsequenzen erkennen kann [31], dessen Vorfahren als Kandidaten für den Importkanal der plastidären äußeren Hüllmembran prädestiniert haben.

Zwischen Schaltverhalten und Phylogenie der Omp85-Familie lässt sich anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse kein klarer Zusammenhang erkennen. In beiden Unterfamilien finden sich sowohl Vertreter, die ein hochfrequentes Schaltverhalten zeigen (Alr2269, Alr4893 und YaeT, Tab. 4.1), als auch solche mit niedriger Schaltfrequenz zwischen den Öffnungszuständen (Alr0075, psToc75 und dmSam50, Tab. 4.1). Die eukaryotischen Omp85-Proteine psToc75 und dmSam50 zeigten allerdings beide niederfrequentes Schaltverhalten, während sich aus den elektrophysiologischen Analysen der prokaryotischen Vertreter andeutet, dass hier die Größe der N-terminalen Domäne das Schaltverhalten beeinflussen könnte (siehe Kap. 4.2).

4.2 Einfluss der N-terminalen Domäne auf die Funktion und Eigenschaften der Proteine der Omp85-Familie

Die N-terminale Domäne der Omp85-Proteine übernimmt wichtige Funktionen in der Homointeraktion bzw. in der Heterointeraktion mit anderen Proteinen. So konnte ein Einfluss dieser Domäne auf die Komplexbildung von Alr2269 festgestellt werden: einerseits zeigten die Ergebnisse von Interaktionsstudien, dass die N-terminale Domäne *in vitro* Homodimere ausbildet [31], andererseits bildet Alr2269 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* homotrimere Komplexe aus, während in *in vitro*-Interaktionsanalysen der C-terminalen Porenregion lediglich Dimere nachweisbar waren [36]. Darüber hinaus wurde in der N-terminalen Domäne das POTRA-Motiv identifiziert, das eine vermittelnde Rolle bei der Interaktion des Proteins mit seinen Substraten auszuüben scheint [16, 31, 96]. Eine katalytische Funktion bei der Integration von Membranproteinen ist, wie für YaeT beschrieben wurde [33, 39], vermutlich am ehesten auf die N-terminale Domäne zurückzuführen, da diese in das Periplasma ragt und so als Rezeptor für die aus dem Cytoplasma über die innere Membran in das Periplasma geschleusten Proteine dienen könnte. Es kann also vermutet werden, dass die N-terminale Domäne der Omp85-Proteine zusätzlich zu ihrer Rolle bei der Komplexbildung eine Funktion

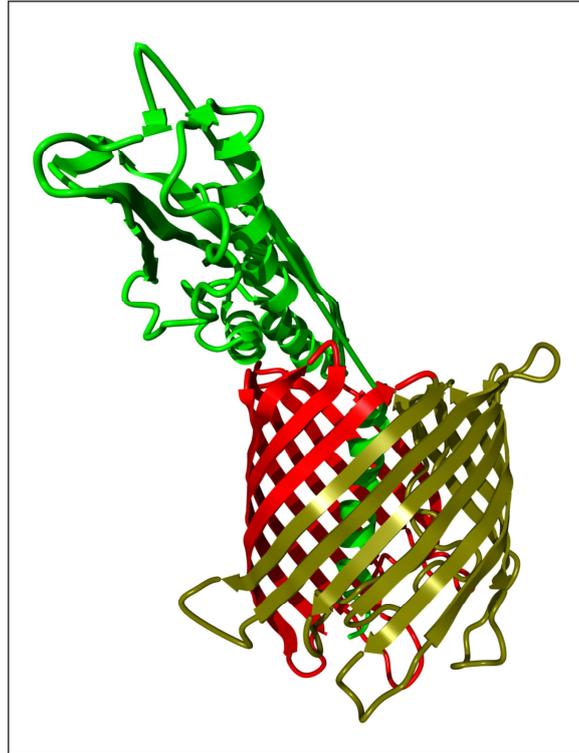


Abbildung 4.2: Kristallstruktur von FhaC. Gold: distaler Teil der C-terminalen Kanaldomäne, rot: proximaler Teil der C-terminalen Kanaldomäne, grün: N-terminale Domäne (Auflösung: 3,15 Å [16], PDB-ID 2QDZ). Die Abbildung wurde mit Yasara (www.yasara.org) und PovRay (www.povray.org) generiert.

wahrnimmt, wie sie für VDAC bereits hinsichtlich einer in diesem Falle autokatalytisch verlaufenden Insertion postuliert wurde [97].

Darüber hinaus weisen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse auf eine Funktion des N-Terminus bei der Regulation der Kanaleigenschaften dieser Proteinfamilie hin. Die N-terminale Domäne kann sowohl das Schaltverhalten, als auch den Leitwert, und im Falle von psToc75 sogar die Selektivität der Porendomäne beeinflussen (siehe Tab. 4.1). Weiterhin konnte für Alr2269 gezeigt werden, dass der N-Terminus nicht nur weitere Unterleitwerte induziert, sondern auch die Häufigkeit, mit der die verschiedenen Schaltzustände eingenommen werden, moduliert (siehe Kap. 3.1 und Abb. 3.8). Die Röntgenstrukturanalyse von FhaC [16] zeigte, dass bei diesem zur TpsB-Omp85-Superfamilie gehörenden Protein ein Loop der N-terminalen Domäne die Kanalpore durchspannt (Abb. 4.2). Somit ist es denkbar, dass der beobachtete Einfluss der N-terminalen Domäne auf die Porenregion der Omp85-Proteine auf eine vergleichbare N-terminale Struktur zurückzuführen sein könnte. Während Untersuchungen an dem ebenfalls aus 16 β -Faltblättern aufgebauten mitochondrialen Porin von *Neurospora crassa* zeigten, dass dessen lösliche Proteindomäne lediglich eine stabilisierende Wirkung auf das Protein ausübt, nicht aber die elektrophysiologischen Eigenschaften der Porendomäne beeinflusst [98], wurde für die in dieser Arbeit analysierten

Omp85-Proteine ein deutlicher regulatorischer Einfluss der hydrophilen N-terminalen Domäne auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanalregion festgestellt.

4.3 Funktion der Omp85-Proteine von *Anabaena* sp. PCC 7120

Ein Vergleich der Ergebnisse der drei Vertreter der Omp85-Familie in *Anabaena* sp. PCC 7120 zeigt vor allem deutliche Unterschiede beim Schaltverhalten und den ermittelten Hauptleitwerten (siehe Kap. 3.3). Aus den hier durchgeführten Messungen lässt sich ableiten, dass die drei Vertreter unterschiedliche Funktionen in *Anabaena* sp. PCC 7120 übernehmen.

Durch eine Promotor-GFP-Fusionsanalyse konnte die Expression von Alr0075 lediglich in vegetativen Zellen nachgewiesen werden, während Alr2269 und Alr4893 sowohl in vegetativen Zellen als auch in Heterozysten exprimiert werden (persönliche Mitteilung, K. Nicolaisen). Diese unterschiedliche Lokalisierung könnte einen Hinweis auf die verschiedenen Funktionen der Omp85-Vertreter von *Anabaena* sp. PCC 7120 geben. In einer Proteomanalyse der äußeren Membran von *Anabaena* sp. PCC 7120 konnte lediglich Alr2269 detektiert werden [78]. Auch im Proteom der äußeren Membran der stickstofffixierenden Heterozysten konnte nur Alr2269 identifiziert werden [99]. Dies lässt auf eine deutlich höhere Expression von Alr2269 im Vergleich zu seinen Homologen schließen. Wie bereits in Kap. 4.2 erwähnt, wurde *in vitro* und *in vivo* eine Homooligomerisierung von Alr2269 zu trimeren Komplexen nachgewiesen [36]. Es wäre durchaus vorstellbar, dass darüber hinaus eine Heterooligomerisierung von Alr2269 mit einem oder beiden anderen Omp85-Homologen stattfinden könnte, was eine funktionelle Diversifikation der Omp85-Proteinkomplexe ermöglichen würde.

Wie verschiedene andere Gene, die für Vertreter der Omp85-Familie kodieren, konnte auch *alr2269* als Teil eines Operons identifiziert werden. Proteobakterien, wie beispielsweise *E. coli* [22], besitzen eine Operonstruktur, in welcher das Omp85-Gen *yaeT* zusammen mit dem Gen *skp*, das für ein periplasmatisches Chaperon kodiert, organisiert ist. Dagegen findet sich im Operon, in dem *alr2269* lokalisiert ist, kein für ein periplasmatisches Chaperon kodierendes Gen. Stattdessen konnten in diesem Operon mit *lpxC*, *lpxB* und *lpxA* mehrere Gene identifiziert werden, die für Proteine des Biosyntheseweges von Lipid A, welches den Grundbaustein der Lipopolysaccharidschicht des äußeren Leaflets der äußeren Hüllmembran von Gram-negativen Bakterien darstellt, kodieren. Die Regulation der Lipid A-Biosynthese und die Expression von Alr2269 scheinen also eng gekoppelt zu sein [100]. Neue Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe weisen zudem darauf hin, dass Alr2269 einen deutlichen Einfluss auf die Stabilität der äußeren Hüllmembran von *Anabaena* sp. PCC 7120 zu haben scheint

(persönliche Mitteilung, K. Nicolaisen). So wurde nach einer Abreicherung von Alr2269 in der äußeren Membran sowohl eine erhöhte Permeabilität für bestimmte schädliche Substanzen bzw. Enzyme (Erythromycin, Lysozym, Proteinase K und SDS), als auch eine erhöhte Aufnahme verschiedener Aminosäuren festgestellt.

Im Gegensatz dazu ist *alr4893* nicht Teil eines Operons, sondern befindet sich zwischen zwei Genen, die in entgegengesetzter Richtung transkribiert werden. Das Gen *alr0075*, das für das dritte Omp85-Protein von *Anabaena* sp. PCC 7120 kodiert, ist möglicherweise wiederum Bestandteil eines Operons. Die flankierenden Gene kodieren für eine putative Glykosyltransferase (*alr0074*) und eine putative Permease (*alr0076*); hingegen ist wiederum kein Chaperon-kodierendes Gen Bestandteil dieses Operons. Auch hier findet sich somit eine Operonstruktur, die sich von der der proteobakteriellen Omp85-Gene unterscheidet. In im Vergleich zu Alr2269 geringerem Ausmaß scheint auch eine Abreicherung von Alr0075 in der äußeren Membran Einfluss auf ihre Stabilität zu haben, da auch hier eine erhöhte Permeabilität für Erythromycin festgestellt werden konnte (persönliche Mitteilung, K. Nicolaisen).

Der Effekt der Omp85-Proteine von *Anabaena* sp. PCC 7120 auf die Stabilität der äußeren Membran könnte sowohl direkt, bedingt durch die Translokation oder Insertion von Lipopolysacchariden, als auch indirekter Natur sein, beispielsweise durch die Translokation oder Insertion von Proteinen in die äußere Membran, die eine essentielle Funktion bei der Assemblierung der Lipopolysaccharidschicht besitzen und die äußere Membran somit stabilisieren. Eine Auswirkung auf die Insertionsrate bestimmter Proteine wurde z. B. für das mitochondrielle β -Barrel-Protein VDAC gezeigt. Nach Integration von VDAC in eine Phospholipidmembran erhöhte sich die Insertionsrate der Proteine PorA/C1 und KcsA signifikant, nicht aber diejenige von α -Hämolysin [101].

4.4 Die evolutionäre Entwicklung der Proteine der Omp85-Familie

Aus den elektrophysiologischen Ergebnissen der Teilkonstrukte von psToc75 und Alr2269 lassen sich möglicherweise Rückschlüsse auf die evolutionäre Entwicklung der Proteine der Omp85-Familie ziehen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die distalen C-Termini von Alr2269 (AnaD) und psToc75 (PsD) in der Lage sind, Homodimere zu bilden (siehe Kap. 3.3.2 und 3.4). Für das Protein OmpX, das ebenfalls nur aus acht β -Faltblättern aufgebaut ist, wurde dies bereits gezeigt: ein Konstrukt, das durch Genduplikation von OmpX hergestellt worden war, war in der Lage, einen funktionellen Kanal zu bilden [81]. Durch Homo- oder Heterooligomerisierung von zwei aus je acht β -Faltblättern aufgebauten

4. Diskussion

Proteinen könnte so in einem ersten Schritt das aus 16 Faltblättern bestehende β -Barrel als Ursprung der modernen Omp85-Proteine entstanden sein. Um zu überprüfen, ob eine Homooligomerisierung als evolutionärer Mechanismus für die Bildung der Porenregion in Frage kommt, wurde die Ähnlichkeit der proximalen und distalen Bereiche der C-Termini von Alr2269 und PsToc75 untersucht. Alignments mit dem Programm ClustalW [84] ergaben eine Identität von 23 % (Alr2269) bzw. 21 % (psToc75) und eine Ähnlichkeit von 46 % (Alr2269) bzw. 42 % (psToc75). Diese Werte zeigen zwar keine deutliche Übereinstimmung der beiden achtsträngigen Teilbereiche dieser Proteine, die Bildung der Porendomäne durch Homooligomerisierung kann dennoch nicht völlig ausgeschlossen werden, wenn man bedenkt, dass die Entstehung der Omp85-Proteinfamilie vermutlich bereits vor über 2,8 Milliarden Jahren und somit zu einem evolutionär gesehen sehr frühen Zeitpunkt stattfand [102].

In einem zweiten Schritt könnten die Eigenschaften der Kanalpore durch Wechselwirkung mit periplasmatischen Proteinen beeinflusst worden sein. Ein aktuelles Beispiel einer regulatorischen Interaktion eines periplasmatischen Proteins mit einem integralen Membranprotein ist z.B. die Regulation des membranintegrierten Proteins FhuA durch das periplasmatisch lokalisierte TonB in *E. coli* [103]. Durch ein solches regulatorisches Protein könnte eine Feinregulierung der Kanaleigenschaften ermöglicht worden sein. Durch Reorganisation der bakteriellen DNA könnten dann die Gene, welche die beiden Untereinheiten – also die periplasmatische und die membranintegrierte – kodieren, zunächst in einem gemeinsamen Operon zusammengefasst worden sein, was die Regulation der Expression und die korrekte Stöchiometrie des Komplexes sichergestellt hätte. In einem dritten Schritt könnte dann durch Genfusion der verschiedenen Untereinheiten zu einem einzigen Protein der Vorläufer der modernen Vertreter der Omp85-Familie entstanden sein. Eine graphische Darstellung dieser hypothetischen Entwicklung der Omp85-Familie ist in Abb. 4.3 dargestellt.

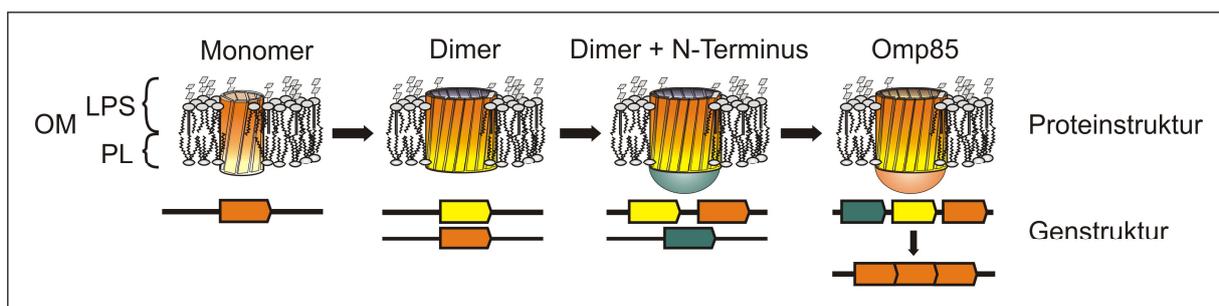


Abbildung 4.3: Modell der hypothetischen Entwicklung der Omp85-Familie auf Protein- und genetischer Ebene. OM äußere Membran, LPS Lipopolysaccharidschicht, PL Phospholipidschicht (verändert nach [36]).

Die physische Verbindung der N-terminalen mit der C-terminalen Domäne hätte zusätzlich eine weitere Konsequenz zur Folge, die in den unterschiedlichen Interaktionsfähigkeiten der Domänen von psToc75 und seinem cyanobakteriellen Verwandten Alr2269 erkennbar ist. Nach der endosymbiotischen Aufnahme des cyanobakteriellen Vorläufers in die eukaryotische Wirtszelle und dem nachfolgenden Transfer des genetischen Materials in den Zellkern musste sich der Symbiont neuen Bedingungen anpassen. Damit verbunden war die Übernahme neuer Funktionen, in diesem Fall des Imports plastidärer Vorstufenproteine aus dem Cytoplasma durch die Membransysteme in den Chloroplasten. Zu diesem Zweck mussten die Eigenschaften des cyanobakteriellen Omp85-Proteins verändert und an die neuen Gegebenheiten angepasst werden. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass diese Anpassung einen starken Einfluss auf die Affinität der N-terminalen Domäne zur Porenregion des Proteins hatte. Während letztere bei Alr2269 so stark ist, dass auch nach physischer Trennung von N- und C-Terminus eine Interaktion deutlich zu erkennen ist (siehe Kap. 3.3.1), konnte dies bei psToc75 nicht beobachtet werden (siehe Kap. 3.4). Durch die physische Verbindung von N- und C-terminaler Domäne war diese Affinität aber nicht mehr von Bedeutung, so dass sie möglicherweise zugunsten einer neuen Funktion, beispielsweise der Interaktion mit Toc34 [31] bzw. Toc159 [23], aufgegeben wurde.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die elektrophysiologische Charakterisierung von pro- und eukaryotischen β -Barrel-Membranproteinen der Omp85-Familie sowie deren Vergleich. Die analysierten Proteine wurden aufgrund ihrer Position innerhalb des phylogenetischen Stammbaums dieser Proteinfamilie ausgewählt; hierbei wurde berücksichtigt, dass sich diese Proteinfamilie phylogenetisch in zwei Hauptarme aufteilt. Aus dem Toc75-Zweig der Omp85-Familie wurden die folgenden Vertreter ausgewählt: der eukaryotische Importkanal der äußeren plastidären Hüllmembran der Erbse *Pisum sativum* (psToc75) sowie die drei Omp85-Homologen des nächsten prokaryotischen Verwandten der heutigen Chloroplasten, des Cyanobakteriums *Anabaena* sp. PCC 7120 (Alr2269, Alr0075 und Alr4893). Aus der Sam50-Unterfamilie der Omp85-Proteine wurden folgende Vertreter ausgewählt: das eukaryotische mitochondrielle Omp85-Protein der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (dmSam50), das Teil des Integrationskomplexes der äußeren Mitochondrienmembran ist, und das Omp85-Protein des prokaryotischen γ -Proteobakteriums *Escherichia coli* (YaeT), das zusammen mit anderen Komponenten die Integration von Membranproteinen in die äußere Membran dieses Gram-negativen Bakteriums ermöglicht.

Zunächst wurde ein elektrophysiologisches Messsystem konstruiert und etabliert, mittels dessen die Proteine mit der Lipid-Bilayer-Technik analysiert werden konnten. Die anschließende Charakterisierung der oben genannten Omp85-Proteine zeigte einerseits, dass alle Vertreter dieser Proteinfamilie Kationenselektivität aufweisen, was auf eine ähnliche Ladungsverteilung im Inneren der Porenregion der Omp85-Proteine schließen lässt.

Demgegenüber konnten zwischen beiden Unterfamilien deutliche Unterschiede hinsichtlich der aus den gemessenen Leitwerten abgeleiteten Porendurchmesser festgestellt werden. Hier zeigte sich, dass die Durchmesser der Kanalporen der Vertreter der Toc75-Unterfamilie die Porendurchmesser repräsentativer Vertreter der Sam50-Unterfamilie um das etwa Zwei- bis Dreifache übertrafen. Diese drastischen strukturellen Unterschiede zwischen beiden Omp85-Unterfamilien könnten die unterschiedlichen Aufgaben dieser Proteine widerspiegeln, da die Vertreter der Sam50-Unterfamilie eine Funktion bei der Integration von Membranproteinen haben, während Toc75 die Translokation von Polypeptidketten durch die Membran ermöglicht.

Die Analyse der elektrophysiologischen Ergebnisse der drei Omp85-Vertreter von *Anabaena* sp. PCC 7120 ergab niedrige Kationenselektivitäten. Die Porendurchmesser der näher miteinander verwandten Proteine Alr0075 und Alr4893 wiesen vergleichbare Werte auf, während der Durchmesser des von Alr2269 gebildeten Kanals deutlich darüber lag. Das

Schaltverhalten der drei Proteine zeigte ebenfalls deutliche Unterschiede, die möglicherweise mit den unterschiedlichen Größen der N-terminalen Domänen der drei cyanobakteriellen Vertreter zusammenhängen könnten. Während für Alr0075, das einen vergleichsweise kurzen N-Terminus enthält, ein niederfrequentes Schaltverhalten beobachtet werden konnte, zeigen Alr2269 und Alr4893, die beide deutlich größere N-terminale Domänen besitzen, ein hochfrequentes Schalten zwischen geöffnetem und geschlossenem Kanalzustand. Hinsichtlich der Funktion dieser Omp85-Proteine kann aufgrund des im Vergleich zur Sam50-Unterfamilie großen Porendurchmessers spekuliert werden, dass diese Proteine an Transportprozessen beteiligt sind. Die Tatsache, dass *alr2269* in einem gemeinsamen Operon mit mehreren Genen des Lipid A-Syntheseweges lokalisiert ist sowie die Beobachtung, dass eine Abreicherung dieses Proteins offensichtlich zu einer verringerten Stabilität der äußeren Hüllmembran führt, könnte außerdem auf eine Rolle des Omp85-Proteins bei der Integration von Lipid A in die Lipopolysaccharidschicht der äußeren Hüllmembran von *Anabaena* schließen lassen.

Anhand von Topologievorhersagen der Omp85-Proteine, die einen Aufbau aus einer N-terminalen hydrophilen und einer C-terminalen hydrophoben Domäne ergaben, wurden Teilkonstrukte von Alr2269, psToc75 und YaeT erstellt. Die Analyse der elektrophysiologischen Daten zeigt eindeutig, dass die C-terminale Domäne die Porenregion der Omp85-Proteine bildet, während die N-terminale Domäne nachweislich einen regulatorischen Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften hat, der sich z.B. in einer Modulation des Leitwerts (bei psToc75 und Alr2269) oder des Schaltverhaltens (bei Alr2269 und YaeT) zeigt. Zusätzlich konnte durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse nachgewiesen werden, dass die N-terminale Domäne des cyanobakteriellen Omp85-Proteins Alr2269, das die höchste Verwandtschaft zum plastidären Importkanal Toc75 besitzt, eine starke Affinität zur C-terminalen Porendomäne besitzt, während dies bei Toc75 offensichtlich nicht der Fall ist. Weiterhin konnte durch die elektrophysiologische Analyse der distalen C-Termini der Omp85-Proteine, welche die innerhalb dieser Proteinfamilie am stärksten konservierten Proteinregionen sind und acht der 16 am Aufbau des β -Barrels beteiligten β -Faltblätter bereitstellen, eindeutig gezeigt werden, dass diese schaltfähige Kanäle zu bilden vermögen. Der dabei ermittelte Leitwert legt die Vermutung nahe, dass die distalen C-Termini einen Kanal bilden können, der aus Homodimeren besteht, diese Teile des Proteins also eine starke Affinität zu sich selbst besitzen. Durch die Analyse aller mit den Omp85-Teilkonstrukten gewonnenen Daten konnte zudem eine Hypothese zur Evolution dieser Proteinfamilie aufgestellt werden. Demnach könnte die C-terminale Kanaldomäne dieser

Proteine durch Homo- oder Heterodimerisierung des distalen C-Terminus gebildet worden sein. Zur Regulation der Kanaleigenschaften und der Interaktion mit anderen Proteinen könnte daraufhin die N-terminale Domäne hinzugekommen sein, zunächst als separates Protein mit hoher Affinität zur Kanaldomäne. Durch genetische Reorganisation in einem gemeinsamen Operon und anschließende Fusion der beteiligten Gene könnte das primitive Omp85-Protein entstanden sein. Durch Endosymbiose mussten die Omp85-Proteine veränderte Aufgaben übernehmen, die vermutlich eine Verringerung der Affinität der nunmehr physisch verbundenen regulatorischen Domäne zur Folge hatten.

Durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse konnten somit wichtige Erkenntnisse zum Verständnis der Evolution und der Funktion der Proteine der Omp85-Familie gewonnen werden. Darüber hinaus konnten durch die elektrophysiologischen Analysen der Omp85-Proteine Grundlagen gelegt werden, die beispielsweise bei der Beantwortung folgender Fragestellungen von Nutzen sind: die Ergebnisse könnten dazu beitragen, die genaue Funktion der drei Omp85-Homologen in *Anabaena* sp. PCC 7120 aufzuklären. Zur Klärung der Frage, ob die Länge der regulatorischen N-terminalen Domäne einen Einfluss auf das Schaltverhalten hat, sollten zudem Teilkonstrukte von Alr4893, das eine vergleichsweise lange N-terminale Domäne besitzt, und Alr0075, dessen N-Terminus deutlich kürzer ist, detailliert analysiert und mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen der Teilkonstrukte AnaC und AnaA des Proteins Alr2269 verglichen werden. Durch solche Experimente könnte auch die Frage geklärt werden, ob die im Vergleich zu Alr2269 geringeren Leitwerte von Alr0075 und Alr4893 durch die C-terminale Porenregion bestimmt sind oder ob sie durch den Einfluss der N-terminalen Domäne zustande kommen. Weiterhin könnte durch solche Versuche festgestellt werden, ob auch bei diesen beiden prokaryotischen Omp85-Proteinen eine hohe Affinität zwischen den beiden Proteindomänen, wie in dieser Arbeit für Alr2269 nachgewiesen, beobachtet werden kann. Zusätzlich könnte durch Interaktionsanalysen der Frage nachgegangen werden, ob diese homologen Proteine möglicherweise heterooligomere Komplexe miteinander ausbilden, was zusammen mit der beobachteten unterschiedlichen Expression dieser Homologen in vegetativen Zellen und Heterozysten von *Anabaena* sp. PCC 7120 weitere Hinweise auf ihre Funktion liefern könnte.

Um die oben erwähnte mögliche Rolle von Alr2269 bei der Integration von Lipid A in die äußere cyanobakterielle Hüllmembran aufzuklären, könnte außerdem der Einfluss von Lipid A auf die biophysikalischen Eigenschaften von Alr2269 untersucht werden. Zusätzlich könnte ein Vergleich der elektrophysiologischen Eigenschaften von Alr2269 mit denjenigen des Proteins OstA, das die Integration von Lipopolysacchariden in die äußere Membran

Gram-negativer Bakterien vermittelt, weitere Antworten zu dieser Frage liefern. Daher sollte auch dieses Protein elektrophysiologisch untersucht werden.

Wie in Kap. 1.3.2 erwähnt, konnten bei *Arabidopsis thaliana* neben atToc75-III, dem nächsten Verwandten zum in dieser Arbeit untersuchten plastidären Importkanal psToc75 von *Pisum sativum*, mit atToc75-IV, atToc75-V, atP35 und atP47 noch vier weitere Proteine der Toc75-Unterfamilie identifiziert werden (siehe auch Abb. 1.1). Hier stellt sich insbesondere die Frage nach den elektrophysiologischen Eigenschaften der drei Omp85-Vertreter atToc75-V, atP35 und atP47, da diese eine höhere Verwandtschaft zu den cyanobakteriellen Omp85-Proteinen besitzen als atToc75-III und atToc75-IV, und somit ein Vergleich der Eigenschaften dieser Proteine mit den drei in dieser Arbeit analysierten Vertretern von *Anabaena* sp. PCC 7120 weitere Antworten zur evolutionären Entwicklung des plastidären Importkanals liefern könnte.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Analyse der Toc75-Unterfamilie der Omp85-Proteine. Aus den elektrophysiologischen Ergebnissen Vertreter der Sam50-Unterfamilie ergeben sich allerdings ebenfalls Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen. So stellt sich die Frage, ob auch in dieser Unterfamilie eine Affinität zwischen beiden Proteindomänen festgestellt werden kann und ob hier möglicherweise ebenfalls Affinitätsunterschiede zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Vertretern existieren. Darüber hinaus sollten zur Erweiterung der Erkenntnisse über diese ursprüngliche Proteinfamilie auch die elektrophysiologischen Eigenschaften weiterer Vertreter beider Unterfamilien analysiert und mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen verglichen werden. Interessant wäre zum Beispiel die Analyse des zur Sam50-Unterfamilie gehörenden Omp85 aus *Neisseria meningitidis*, das eine Rolle bei der Lipidinsertion in die äußere Hüllmembran spielt und somit eine abweichende Funktion zu den in dieser Arbeit analysierten Proteinen der Sam50-Unterfamilie besitzt, oder eines Vertreters der α -Proteobakterien, der nächsten Verwandten der heutigen Mitochondrien.

Mithilfe des in dieser Arbeit konstruierten und etablierten Lipid-Bilayer-Messsystems ist es darüber hinaus möglich, den Einfluss von Inhibitoren oder Effektoren auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Omp85-Proteine zu untersuchen. So sollte z.B. der Einfluss von plastidären Signalpeptiden auf das Schaltverhalten von Alr2269 untersucht werden, da eine Affinität der N-terminalen Domäne zu solchen Signalsequenzen biochemisch in Interaktionsanalysen gezeigt werden konnte. Das Ergebnis einer solchen Untersuchung, unterstützt durch Importversuche, könnte weitere Hinweise zur Aufklärung der genauen Funktion von Alr2269 bei der beobachteten Stabilisierung der äußeren Hüllmembran von

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Anabaena sp. PCC 7120 liefern. Eine Interaktion dieses Proteins mit Signalsequenzen und deren Transport durch die Membran spräche für eine Funktion von Alr2269 bei der Integration membranstabilisierender Proteine in die äußere Hüllmembran. Darüber hinaus könnten diese Versuche einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der evolutionären Entwicklung des Proteinkanals des plastidären Translokationsapparates leisten.

6. Literatur

1. White, S. H. & Wimley, W. C. (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles, *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 28, 319-65.
2. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science.* 175, 720-31.
3. Simons, K. & Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes, *Nature.* 387, 569-72.
4. Wallin, E. & von Heijne, G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms, *Protein Sci.* 7, 1029-38.
5. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes, *J Mol Biol.* 305, 567-80.
6. von Heijne, G. (2007) The membrane protein universe: what's out there and why bother?, *J Intern Med.* 261, 543-57.
7. Reumann, S., Maier, E., Benz, R. & Heldt, H. W. (1995) The membrane of leaf peroxisomes contains a porin-like channel, *J Biol Chem.* 270, 17559-65.
8. Reumann, S. (2000) The structural properties of plant peroxisomes and their metabolic significance, *Biol Chem.* 381, 639-48.
9. Latruffe, N. & Vamecq, J. (2000) Evolutionary aspects of peroxisomes as cell organelles, and of genes encoding peroxisomal proteins, *Biol Cell.* 92, 389-95.
10. Leister, D. (2003) Chloroplast research in the genomic age, *Trends Genet.* 19, 47-56.
11. Gabaldon, T., Snel, B., van Zimmeren, F., Hemrika, W., Tabak, H. & Huynen, M. A. (2006) Origin and evolution of the peroxisomal proteome, *Biol Direct.* 1, 8.
12. Hoepfner, D., Schildknecht, D., Braakman, I., Philippsen, P. & Tabak, H. F. (2005) Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation, *Cell.* 122, 85-95.
13. Erdmann, R. & Kunau, W. H. (1992) A genetic approach to the biogenesis of peroxisomes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell Biochem Funct.* 10, 167-74.
14. Tamm, L. K., Hong, H. & Liang, B. (2004) Folding and assembly of β -barrel membrane proteins, *Biochim Biophys Acta.* 1666, 250-63.
15. Song, L., Hobaugh, M. R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H. & Gouaux, J. E. (1996) Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore, *Science.* 274, 1859-66.

16. Clantin, B., Delattre, A. S., Rucktooa, P., Saint, N., Meli, A. C., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F. & Villeret, V. (2007) Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily, *Science*. 317, 957-61.
17. Arora, A., Rinehart, D., Szabo, G. & Tamm, L. K. (2000) Refolded outer membrane protein A of *Escherichia coli* forms ion channels with two conductance states in planar lipid bilayers, *J Biol Chem*. 275, 1594-600.
18. Koebnik, R., Locher, K. P. & Van Gelder, P. (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell, *Mol Microbiol*. 37, 239-53.
19. Veenendaal, A. K., van der Does, C. & Driessen, A. J. (2004) The protein-conducting channel SecYEG, *Biochim Biophys Acta*. 1694, 81-95.
20. Rizzitello, A. E., Harper, J. R. & Silhavy, T. J. (2001) Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*, *J Bacteriol*. 183, 6794-800.
21. Voulhoux, R. & Tommassen, J. (2004) Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly, *Res Microbiol*. 155, 129-35.
22. Voulhoux, R., Bos, M. P., Geurtsen, J., Mols, M. & Tommassen, J. (2003) Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly, *Science*. 299, 262-5.
23. Schleiff, E., Soll, J., Kuchler, M., Kuhlbrandt, W. & Harrer, R. (2003) Characterization of the translocon of the outer envelope of chloroplasts, *J Cell Biol*. 160, 541-51.
24. Poole, K., Schiebel, E. & Braun, V. (1988) Molecular characterization of the hemolysin determinant of *Serratia marcescens*, *J Bacteriol*. 170, 3177-88.
25. Guedin, S., Willery, E., Tommassen, J., Fort, E., Drobecq, H., Locht, C. & Jacob-Dubuisson, F. (2000) Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin, *J Biol Chem*. 275, 30202-10.
26. Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H. E., Guiard, B., Meisinger, C. & Pfanner, N. (2003) An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane, *J Biol Chem*. 278, 48520-3.
27. Sanchez-Pulido, L., Devos, D., Genevrois, S., Vicente, M. & Valencia, A. (2003) POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of β -barrel outer membrane proteins, *Trends Biochem Sci*. 28, 523-6.
28. Moslavac, S., Mirus, O., Bredemeier, R., Soll, J., von Haeseler, A. & Schleiff, E. (2005) Conserved pore-forming regions in polypeptide-transporting proteins, *Febs J*. 272, 1367-78.

29. Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R. & Lithgow, T. (2004) The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria, *J Cell Biol.* *164*, 19-24.
30. Gentle, I. E., Burri, L. & Lithgow, T. (2005) Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins, *Mol Microbiol.* *58*, 1216-25.
31. Ertel, F., Mirus, O., Bredemeier, R., Moslavac, S., Becker, T. & Schleiff, E. (2005) The evolutionarily related β -barrel polypeptide transporters from *Pisum sativum* and *Nostoc* PCC 7120 contain two distinct functional domains, *J Biol Chem.* *280*, 28281-9.
32. Kim, S., Malinverni, J. C., Sliz, P., Silhavy, T. J., Harrison, S. C. & Kahne, D. (2007) Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine, *Science.* *317*, 961-4.
33. Knowles, T. J., Jeeves, M., Bobat, S., Dancea, F., McClelland, D., Palmer, T., Overduin, M. & Henderson, I. R. (2008) Fold and function of polypeptide transport-associated domains responsible for delivering unfolded proteins to membranes, *Mol Microbiol.* *68*, 1216-27.
34. Sveshnikova, N., Grimm, R., Soll, J. & Schleiff, E. (2000) Topology studies of the chloroplast protein import channel Toc75, *Biol Chem.* *381*, 687-93.
35. Schleiff, E., Eichacker, L. A., Eckart, K., Becker, T., Mirus, O., Stahl, T. & Soll, J. (2003) Prediction of the plant β -barrel proteome: a case study of the chloroplast outer envelope, *Protein Sci.* *12*, 748-59.
36. Bredemeier, R., Schlegel, T., Ertel, F., Vojta, A., Borissenko, L., Bohnsack, M. T., Groll, M., von Haeseler, A. & Schleiff, E. (2007) Functional and phylogenetic properties of the pore-forming β -barrel transporters of the Omp85 family, *J Biol Chem.* *282*, 1882-90.
37. Gerdes, S. Y., Scholle, M. D., Campbell, J. W., Balazsi, G., Ravasz, E., Daugherty, M. D., Somera, A. L., Kyrpides, N. C., Anderson, I., Gelfand, M. S., Bhattacharya, A., Kapatral, V., D'Souza, M., Baev, M. V., Grechkin, Y., Mseeh, F., Fonstein, M. Y., Overbeek, R., Barabasi, A. L., Oltvai, Z. N. & Osterman, A. L. (2003) Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655, *J Bacteriol.* *185*, 5673-84.
38. Sklar, J. G., Wu, T., Gronenberg, L. S., Malinverni, J. C., Kahne, D. & Silhavy, T. J. (2007) Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *104*, 6400-5.
39. Doerrler, W. T. & Raetz, C. R. (2005) Loss of outer membrane proteins without inhibition of lipid export in an *Escherichia coli* YaeT mutant, *J Biol Chem.* *280*, 27679-87.

40. Werner, J. & Misra, R. (2005) YaeT (Omp85) affects the assembly of lipid-dependent and lipid-independent outer membrane proteins of *Escherichia coli*, *Mol Microbiol.* 57, 1450-9.
41. Wu, T., Malinverni, J., Ruiz, N., Kim, S., Silhavy, T. J. & Kahne, D. (2005) Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*, *Cell.* 121, 235-45.
42. Genevrois, S., Steeghs, L., Roholl, P., Letesson, J. J. & van der Ley, P. (2003) The Omp85 protein of *Neisseria meningitidis* is required for lipid export to the outer membrane, *Embo J.* 22, 1780-9.
43. Bos, M. P., Tefsen, B., Geurtsen, J. & Tommassen, J. (2004) Identification of an outer membrane protein required for the transport of lipopolysaccharide to the bacterial cell surface, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 9417-22.
44. Braun, M. & Silhavy, T. J. (2002) Imp/OstA is required for cell envelope biogenesis in *Escherichia coli*, *Mol Microbiol.* 45, 1289-302.
45. Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M. & Penny, D. (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 12246-51.
46. Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., Yamada, M., Yasuda, M. & Tabata, S. (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *DNA Res.* 8, 205-13; 227-53.
47. Elhai, J. & Wolk, C. P. (1988) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria, *Methods Enzymol.* 167, 747-54.
48. Schleiff, E. & Soll, J. (2005) Membrane protein insertion: mixing eukaryotic and prokaryotic concepts, *EMBO Rep.* 6, 1023-7.
49. Reyes-Prieto, A., Weber, A. P. & Bhattacharya, D. (2007) The origin and establishment of the plastid in algae and plants, *Annu Rev Genet.* 41, 147-68.
50. Dyall, S. D., Brown, M. T. & Johnson, P. J. (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles, *Science.* 304, 253-7.
51. Timmis, J. N., Ayliffe, M. A., Huang, C. Y. & Martin, W. (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes, *Nat Rev Genet.* 5, 123-35.

52. Soll, J. & Schleiff, E. (2004) Protein import into chloroplasts, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5, 198-208.
53. Oreb, M., Tews, I. & Schleiff, E. (2008) Policing Tic 'n' Toc, the doorway to chloroplasts, *Trends Cell Biol.* 18, 19-27.
54. Schleiff, E., Jelic, M. & Soll, J. (2003) A GTP-driven motor moves proteins across the outer envelope of chloroplasts, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 4604-9.
55. Qbadou, S., Becker, T., Bionda, T., Reger, K., Ruprecht, M., Soll, J. & Schleiff, E. (2007) Toc64 – a preprotein-receptor at the outer membrane with bipartite function, *J Mol Biol.* 367, 1330-46.
56. Becker, T., Hritz, J., Vogel, M., Caliebe, A., Bukau, B., Soll, J. & Schleiff, E. (2004) Toc12, a novel subunit of the intermembrane space preprotein translocon of chloroplasts, *Mol Biol Cell.* 15, 5130-44.
57. Baldwin, A., Wardle, A., Patel, R., Dudley, P., Park, S. K., Twell, D., Inoue, K. & Jarvis, P. (2005) A molecular-genetic study of the *Arabidopsis* Toc75 gene family, *Plant Physiol.* 138, 715-33.
58. Vojta, A., Alavi, M., Becker, T., Hormann, F., Kuchler, M., Soll, J., Thomson, R. & Schleiff, E. (2004) The protein translocon of the plastid envelopes, *J Biol Chem.* 279, 21401-5.
59. Doolittle, R. F., Feng, D. F., Tsang, S., Cho, G. & Little, E. (1996) Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock, *Science.* 271, 470-7.
60. Becker, T., Vogtle, F. N., Stojanovski, D. & Meisinger, C. (2008) Sorting and assembly of mitochondrial outer membrane proteins, *Biochim Biophys Acta.* 1777, 557-63.
61. Kutik, S., Stojanovski, D., Becker, L., Becker, T., Meinecke, M., Kruger, V., Prinz, C., Meisinger, C., Guiard, B., Wagner, R., Pfanner, N. & Wiedemann, N. (2008) Dissecting membrane insertion of mitochondrial β -barrel proteins, *Cell.* 132, 1011-24.
62. Chan, N. C. & Lithgow, T. (2008) The Peripheral Membrane Subunits of the SAM Complex Function Codependently in Mitochondrial Outer Membrane Biogenesis, *Mol Biol Cell.* 19, 126-36.
63. Waizenegger, T., Habib, S. J., Lech, M., Mokranjac, D., Paschen, S. A., Hell, K., Neupert, W. & Rapaport, D. (2004) Tob38, a novel essential component in the biogenesis of β -barrel proteins of mitochondria, *EMBO Rep.* 5, 704-9.

64. Stegmeier, J. F., Gluck, A., Sukumaran, S., Mantele, W. & Andersen, C. (2007) Characterisation of YtfM, a second member of the Omp85 family in *Escherichia coli*, *Biol Chem.* 388, 37-46.
65. Neher, E. & Sakmann, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres, *Nature.* 260, 799-802.
66. Sakmann, B. & Neher, E. (1995) *Single-Channel Recording*, 2 edn, Springer, New York.
67. Miller, C. & Racker, E. (1976) Ca²⁺-induced fusion of fragmented sarcoplasmic reticulum with artificial planar bilayers, *J Membr Biol.* 30, 283-300.
68. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
69. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* 72, 248-54.
70. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 227, 680-5.
71. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76, 4350-4.
72. Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T. & Wescott, W. C. (1962) Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system, *Nature.* 194, 979-80.
73. Hinnah, S. C., Wagner, R., Sveshnikova, N., Harrer, R. & Soll, J. (2002) The chloroplast protein import channel Toc75: pore properties and interaction with transit peptides, *Biophys J.* 83, 899-911.
74. Hille, B. (1992) *Ion Channels of Excitable Membranes*, 2 edn, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
75. Smart, O. S., Breed, J., Smith, G. R. & Sansom, M. S. (1997) A novel method for structure-based prediction of ion channel conductance properties, *Biophys J.* 72, 1109-26.
76. Hille, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3 edn, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
77. Chen, M., Khalid, S., Sansom, M. S. & Bayley, H. (2008) Outer membrane protein G: Engineering a quiet pore for biosensing, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 6272-7.
78. Moslavac, S., Bredemeier, R., Mirus, O., Granvogel, B., Eichacker, L. A. & Schleiff, E. (2005) Proteomic analysis of the outer membrane of *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *J Proteome Res.* 4, 1330-8.

79. Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites, *Protein Eng.* *10*, 1-6.
80. Saint, N., De, E., Julien, S., Orange, N. & Molle, G. (1993) Ionophore properties of OmpA of *Escherichia coli*, *Biochim Biophys Acta.* *1145*, 119-23.
81. Arnold, T., Poynor, M., Nussberger, S., Lupas, A. N. & Linke, D. (2007) Gene duplication of the eight-stranded β -barrel OmpX produces a functional pore: a scenario for the evolution of transmembrane β -barrels, *J Mol Biol.* *366*, 1174-84.
82. Tranel, P. J., Froehlich, J., Goyal, A. & Keegstra, K. (1995) A component of the chloroplastic protein import apparatus is targeted to the outer envelope membrane via a novel pathway, *Embo J.* *14*, 2436-46.
83. Hinnah, S. C., Hill, K., Wagner, R., Schlicher, T. & Soll, J. (1997) Reconstitution of a chloroplast protein import channel, *Embo J.* *16*, 7351-60.
84. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. & Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics.* *23*, 2947-2948.
85. Stegmeier, J. F. & Andersen, C. (2006) Characterization of pores formed by YaeT (Omp85) from *Escherichia coli*, *J Biochem.* *140*, 275-83.
86. Lakey, J. H., Watts, J. P. & Lea, E. J. (1985) Characterisation of channels induced in planar bilayer membranes by detergent solubilised *Escherichia coli* porins, *Biochim Biophys Acta.* *817*, 208-16.
87. Benz, R., Schmid, A. & Hancock, R. E. (1985) Ion selectivity of gram-negative bacterial porins, *J Bacteriol.* *162*, 722-7.
88. Dupont, M., De, E., Chollet, R., Chevalier, J. & Pages, J. M. (2004) Enterobacter aerogenes OmpX, a cation-selective channel *mar*- and osmo-regulated, *FEBS Lett.* *569*, 27-30.
89. Simonet, V. C., Basle, A., Klose, K. E. & Delcour, A. H. (2003) The *Vibrio cholerae* porins OmpU and OmpT have distinct channel properties, *J Biol Chem.* *278*, 17539-45.
90. Benz, R., Janko, K., Boos, W. & Lauger, P. (1978) Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*, *Biochim Biophys Acta.* *511*, 305-19.

91. Boehler-Kohler, B. A., Boos, W., Dieterle, R. & Benz, R. (1979) Receptor for bacteriophage λ of *Escherichia coli* forms larger pores in black lipid membranes than the matrix protein (porin), *J Bacteriol.* 138, 33-9.
92. Bonhivers, M., Ghazi, A., Boulanger, P. & Letellier, L. (1996) FhuA, a transporter of the *Escherichia coli* outer membrane, is converted into a channel upon binding of bacteriophage T5, *Embo J.* 15, 1850-6.
93. Pavlov, E., Grigoriev, S. M., Dejean, L. M., Zweihorn, C. L., Mannella, C. A. & Kinnally, K. W. (2005) The mitochondrial channel VDAC has a cation-selective open state, *Biochim Biophys Acta.* 1710, 96-102.
94. Löffelhardt, W., Von Haeseler, A. & Schleiff, E. (2007) The β -barrel shaped polypeptide transporter, an old concept for precursor protein transfer across membranes, *Symbiosis.* 44, 33-42.
95. Krantz, B. A., Trivedi, A. D., Cunningham, K., Christensen, K. A. & Collier, R. J. (2004) Acid-induced unfolding of the amino-terminal domains of the lethal and edema factors of anthrax toxin, *J Mol Biol.* 344, 739-56.
96. Yang, F. L. & Braun, V. (2000) ShlB mutants of *Serratia marcescens* allow uncoupling of activation and secretion of the ShlA hemolysin, *Int J Med Microbiol.* 290, 529-38.
97. Xu, X. & Colombini, M. (1996) Self-catalyzed insertion of proteins into phospholipid membranes, *J Biol Chem.* 271, 23675-82.
98. Popp, B., Court, D. A., Benz, R., Neupert, W. & Lill, R. (1996) The role of the N and C termini of recombinant *Neurospora* mitochondrial porin in channel formation and voltage-dependent gating, *J Biol Chem.* 271, 13593-9.
99. Moslavac, S., Reisinger, V., Berg, M., Mirus, O., Vosyka, O., Ploscher, M., Flores, E., Eichacker, L. A. & Schleiff, E. (2007) The proteome of the heterocyst cell wall in *Anabaena* sp. PCC 7120, *Biol Chem.* 388, 823-9.
100. Raetz, C. R., Reynolds, C. M., Trent, M. S. & Bishop, R. E. (2007) Lipid A modification systems in gram-negative bacteria, *Annu Rev Biochem.* 76, 295-329.
101. Li, X. X. & Colombini, M. (2002) Catalyzed insertion of proteins into phospholipid membranes: specificity of the process, *Biophys J.* 83, 2550-9.
102. Cavalier-Smith, T. (2006) Rooting the tree of life by transition analyses, *Biol Direct.* 1, 19.
103. Faraldo-Gomez, J. D., Smith, G. R. & Sansom, M. S. (2003) Molecular dynamics simulations of the bacterial outer membrane protein FhuA: a comparative study of the ferrichrome-free and bound states, *Biophys J.* 85, 1406-20.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Phylogenetischer Stammbaum der Omp85-Familie.....	4
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Ca ²⁺ -induzierten Fusion von Proteo- liposomen mit dem planaren Bilayer	8
Abbildung 1.3: Lipid-Bilayer-Messsystem.....	9
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte.....	12
Abbildung 2.2: Konstruktionszeichnung des Käfiggerüsts.....	14
Abbildung 2.3: Konstruktionszeichnung des Messtischgerüsts.....	15
Abbildung 2.4: Konstruktionszeichnung der Käfiggitter.....	16
Abbildung 2.5: Konstruktionszeichnung der Käfigtüren.....	17
Abbildung 2.6: Konstruktionszeichnung der Tischplatten.....	18
Abbildung 2.7: Konstruktionszeichnung des Messkammertischs.....	19
Abbildung 2.8: Konstruktionszeichnungen der Messkammertischhalterung und des Trichterhalters.....	20
Abbildung 2.9: Konstruktionszeichnungen von Mikroskophalterung, Messtischträger und Reitern.....	21
Abbildung 2.10: Konstruktionszeichnungen der Perfusion (Baugruppe Käfigtischplatte)	23
Abbildung 2.11: Konstruktionszeichnungen der Perfusion (Baugruppe Messtisch).....	24
Abbildung 2.12: Konstruktionszeichnungen Headstagehalterung und Lichtwellenleiter- halterung, Teil 1.....	26
Abbildung 2.13: Konstruktionszeichnungen Headstagehalterung und Lichtwellenleiter- halterung, Teil 2.....	27
Abbildung 2.14: Konstruktionszeichnungen zum Einbau des Kippschalters in die Head- stage und zur Halterung der Erdungselektrode.....	28
Abbildung 2.15: Konstruktionszeichnungen der Messkammer.....	29
Abbildung 2.16: Konstruktionszeichnungen des Fixierschraubers und des Erdungs- adapters.....	30
Abbildung 3.1: Innenansicht des Messstandes.....	43
Abbildung 3.2: Vorderansicht des Messstandes.....	44
Abbildung 3.3: Abschirmung des Lichtwellenleiters.....	46
Abbildung 3.4: Überexpression des Proteins Alr2269.....	47
Abbildung 3.5: Elektrophysiologische Ergebnisse von Alr2269.....	49
Abbildung 3.6: Elektrophysiologische Ergebnisse von AnaC.....	50
Abbildung 3.7: Einfluss von AnaA auf das Schaltverhalten von AnaC.....	51

Tabellenverzeichnis

Abbildung 3.8: Analyse der Unterleitwerte von Alr2269.....	52
Abbildung 3.9: Elektrophysiologische Ergebnisse von AnaD.....	53
Abbildung 3.10: Elektrophysiologische Ergebnisse von Alr0075.....	55
Abbildung 3.11: Elektrophysiologische Ergebnisse von Alr4893.....	57
Abbildung 3.12: Elektrophysiologische Ergebnisse von PsC.....	58
Abbildung 3.13: Effekt von PsA auf das Schaltverhalten von PsC.....	60
Abbildung 3.14: Elektrophysiologische Ergebnisse von PsD.....	61
Abbildung 3.15: Elektrophysiologische Ergebnisse von YaeT.....	62
Abbildung 3.16: Elektrophysiologische Ergebnisse von YaeT _{C-term}	63
Abbildung 3.17: Elektrophysiologische Ergebnisse von dmSam50.....	65
Abbildung 4.1: Vermuteter Zusammenhang zwischen Porendurchmesser und Funktion innerhalb der Unterfamilien der Omp85-Familie.....	68
Abbildung 4.2: Kristallstruktur von FhaC.....	70
Abbildung 4.3: Modell der hypothetischen Entwicklung der Omp85-Familie auf Protein- und genetischer Ebene.....	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Konstrukte.....	12
Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der elektrophysiologischen Versuche....	67

Eigene Veröffentlichungen

Bredemeier, R., Hulsch R., Metzger J.O. & Berthe-Corti, L. (2003). Submersed culture production of extra cellular wax by the marine bacterium *Fundibacter jadensis*. J Mar. Biotech., 5(6):579-83.

Bredemeier, R., Heber, C. & Berthe-Corti, L. (2003). Screening of bacterial isolates from marine sediments for their production of wax esters. Congress Proceedings of the II. International Congress on Marine Science and Technology "Oceans III Millennium", Alicante, Spain.

Moslavac, S., Mirus, O., Bredemeier, R., Soll, J., von Haeseler, A. & Schleiff, E. (2005). Conserved pore-forming regions in polypeptide-transporting proteins. Febs J. 272:1367-1378.

Ertel, F., Mirus, O., Bredemeier, R., Moslavac, S., Becker, T. & Schleiff, E. (2005). The evolutionary related β -barrel polypeptide transporters from *Pisum sativum* and *Nostoc* sp. PCC 7120 contain two distinct functional domains. J Biol. Chem. 280(31):28281-9.

Moslavac, S., Bredemeier, R., Mirus, O., Granvogel, B., Eichacker, L.A. & Schleiff, E. (2005). Proteomic analysis of the outer membrane of *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. J Proteome Res. 4(4):1330-8.

Ertel, F., Bredemeier, R., & Schleiff, E. (2005). Die Grenze zwischen Prokaryont und Eukaryont. BioForum 10:35-37. Review.

Bredemeier, R., Schlegel, T., Ertel, F., Vojta, A., Borissenko, L., Bohnsack, M.T., Groll, M., von Haeseler, A. & Schleiff, E. (2007). Functional and phylogenetic properties of the pore-forming β -barrel transporters of the Omp85 family. J Biol. Chem. 282(3):1882-90.

Nicolaisen, K., Mariscal, V., Pernil, R., Bredemeier, R., Moslavac, S., Maldener, I., Herrero, A., Schleiff, E. & Flores, E. The outer membrane is a barrier for glutamate and some other amino acids in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. In preparation.

Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, R., Takeda, N., Schleiff, E. & Parniske, M. CASTOR and POLLUX are potassium channels crucial for Nod factor induced calcium spiking. In preparation.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Enrico Schleiff für die Überlassung des interessanten Projekts, die stete Unterstützung, die hilfreichen Impulse und die konstruktive Kritik bei der Anfertigung dieser Arbeit, zudem für die anregenden Diskussionen und die gewährte forschersische Freiheit.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Eckhard Boles für die Begutachtung dieser Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Thomas Schlegel und Prof. Dr. Arndt von Haeseler, bei Dr. Ljudmila Borissenko und Prof. Dr. Michael Groll sowie bei Prof. Dr. Jürgen Soll für die wissenschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Vielen Dank zudem an Lars Becker, Tom Goetze und Prof. Dr. Richard Wagner für ihre Hilfe bei der Erlernung der Lipid-Bilayer-Technik.

Franziska, Kerstin, Sunčana und Oliver danke ich für ihre produktive Mitarbeit an meinem Projekt.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Anastazia, Angelika, Anja, Daniela, Gisela, Joana, Josefine, Maike, Rajae, Sandra, Ute, Alexander, Dieter, Jan, Maik, Markus, Matthias, Mohamed, Roman und Zheng für ihre immerwährende Diskussionsbereitschaft, ihre hilfreichen Ratschläge und das überaus angenehme Arbeitsklima bedanken, außerdem bei Petra und Tihana zusätzlich für ihre Gastfreundschaft und ganz besonders bei Mislav und Saša. Dank auch an meine früheren Kollegen Serena, Soumya, Marcel, Thomas und Tobi, zudem an Myriam, mit der ich mich immer gerne um die Messzeiten gestritten habe.

Einen besonderen Dank an Walter König, ohne dessen handwerkliches Geschick der elektrophysiologische Messstand niemals hätte fertig gestellt werden können.

Mein großer Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie, meinen Eltern Ingrid und Klaus sowie meinen Geschwistern Anne und Gerd, für ihre stete Hilfe.

Zu guter Letzt möchte ich mich jedoch bei Steffi bedanken. Ohne ihren Rückhalt, ihre Zuneigung, ihre Ablenkung zur rechten Zeit, ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Geduld wären die vorangegangenen Seiten nur weißes Papier.

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den.....

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über die

Evolutionäre Entwicklung von Proteinkanälen von Translokationsapparaten

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den.....

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Rolf Bredemeier
Geburtsdatum/-ort: 13.02.1972 in Oldenburg (Oldb.)
Wohnsitz: Eckenheimer Landstr. 409, 60435 Frankfurt am Main

Schulbildung:

1984 – 1991: Gymnasium Bad Zwischenahn/Edeweicht
Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung:

WS 1992/93 – SS 2002: Studium der Biologie an der Carl von Ossietzky-Universität Oldenburg, Studienabschluss: Diplom
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Zellbiologie, Genetik, Biochemie
Diplomarbeit: „Einfluss der Kulturbedingungen auf die Produktion apolarer extrazellulärer Metabolite durch *Fundibacter jadensis* Stamm T9T“
(AG Mikrobiologie, H.DoZ. Dr. Luise Berthe-Corti, ICBM der Universität Oldenburg)

01.01.2004 – 31.12.2007: Promotion am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München (AG Dr. Enrico Schleiff)

Seit 01.01.2008: Fortführung der Promotion am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Goethe-Universität Frankfurt am Lehrstuhl Molekulare Zellbiologie der Pflanzen (Prof. Dr. Enrico Schleiff).

Weitere Tätigkeiten:

2000 – 2003: Selbständige Tätigkeit als Webdesigner und Internetdienstleister in der mitbegründeten Firma CaRoNet.de GbR, Oldenburg

2002 – 2003: Vorarbeiten zu einer Promotion auf dem Gebiet der Wachstestere synthese in der AG Mikrobiologie der Carl von Ossietzky-Universität Oldenburg (Arbeitskreis Biotechnologie)

01.12.2003 – 31.12.2003: Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft in der AG Dr. Enrico Schleiff (LMU München)

Sprachkenntnisse: Deutsch (Muttersprache); Englisch (sehr gute Kenntnisse); Französisch (Grundkenntnisse); Portugiesisch (Grundkenntnisse); Latein

Hobbys: Gleitschirmfliegen, Konzertbesuche, Klettersteigtouren, Skifahren, Tauchen, Reisen