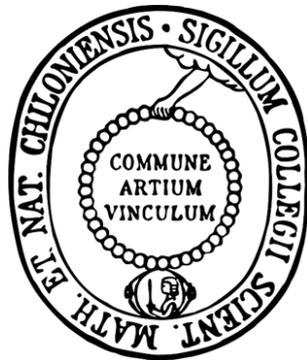


**Optimierung der zellfreien Proteinsynthese
durch Etablierung einer schnellen *in-situ*
Faltungskontrolle mittels GFP-Fusion**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Annika Müller-Lucks

Kiel 2012

Erste/r Gutachter/in: Prof. Dr. Eric Beitz

Zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Axel Scheidig

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2012

Zum Druck genehmigt: 06.12.2012

gez. Prof. Dr. Wolfgang Duschl, Dekan

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Membranproteine	1
1.1.1	Allgemeine Bedeutung der Membranproteine	1
1.1.2	Spezielle Membranproteine: Aquaporine	2
1.2	Die zellfreie Proteinsynthese	6
1.2.1	Vor- und Nachteile der zellfreien Proteinsynthese	6
1.2.2	Aufbau des <i>Continuous Exchange</i> -Systems	8
1.2.3	Produktion von Membranproteinen	8
1.3	<i>GFP</i> und seine Anwendungsgebiete	10
1.3.1	<i>GFP</i> als Faltungskontrolle im <i>in vivo</i> -System	11
1.3.2	<i>GFP</i> als Faltungskontrolle im <i>in vitro</i> -System	12
1.4	Zielsetzung der Arbeit	12
2	Material	15
2.1	Enzyme, Kits, Chemikalien, Material	15
2.2	Geräte	17
2.3	Plasmide	20
2.4	DNA-Sequenzen	22
2.5	Oligonukleotide (<i>Primer</i>)	22
2.6	<i>E. coli</i> -Stämme	23
2.7	<i>D. discoideum</i> -Stämme	23
2.8	Antikörper	24
2.9	Puffer, Medien und Lösungen	25
2.9.1	Molekularbiologie	25
2.9.2	Proteinchemie	26
2.9.3	Zellkultur von <i>D. discoideum</i>	27

2.9.4	Zellfreie Proteinsynthese	28
2.9.5	Protein-Rekonstitution	29
3	Methoden	31
3.1	Molekularbiologische Methoden	31
3.1.1	Polymerasekettenreaktion	31
3.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	31
3.1.3	Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen	32
3.1.4	Konzentrationsbestimmung von DNA	32
3.1.5	Restriktionsverdau von DNA	33
3.1.6	Ligation von DNA	33
3.1.7	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	33
3.1.8	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	34
3.1.9	Schnelltransformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	34
3.1.10	Anlegen von <i>E. coli</i> -Dauerkulturen	34
3.1.11	Isolierung von Plasmid DNA	34
3.1.12	Sequenzierung von DNA	35
3.2	Proteinchemische Methoden	36
3.2.1	Aufreinigung von Proteinen	36
3.2.2	Bradford Proteingehaltsbestimmung	37
3.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.2.4	Western Blotting und Immundetektion	38
3.3	Zellkultur von <i>Dictyostelium discoideum</i>	38
3.3.1	Anlegen von Sporen-Dauerkulturen	38
3.3.2	Anlegen von Flüssig-Plattenkulturen	39
3.3.3	Anlegen von Flüssig-Schüttelkulturen	39
3.3.4	Gewinnung der Membranproteinfraktion	39
3.3.5	Glycosylierungsanalyse des <i>D. discoideum</i> AqpB	40
3.4	Zellfreie Proteinsynthese	40
3.4.1	Herstellung der T7-RNA-Polymerase	40
3.4.2	Herstellung des S30- <i>E. coli</i> -Extraktes	41
3.4.3	Analytische zellfreie Proteinsynthese	42
3.4.4	Präparative zellfreie Proteinsynthese	44

3.5	Sekundärstrukturanalyse zellfrei hergestellter Proteine	44
3.5.1	In-Gel-Fluoreszenzmessungen	44
3.5.2	Fluorimeter-Messungen	44
3.5.3	Sekundärstrukturanalyse von Proteinen mittels Zirkulardichroismus	44
3.5.4	Durchführung der Zirkulardichroismus-Messungen	45
3.6	Protein-Rekonstitution in Liposomen	46
3.6.1	Herstellung von Liposomen	46
3.6.2	Rekonstitution von Proteinen in Liposomen	46
3.6.3	Saccharose-Gradienten-Zentrifugation	47
3.6.4	Größenmessung der Proteoliposomen	47
3.7	Funktionsstest mittels dynamischer Lichtstreuung	48
3.7.1	Prinzip der dynamischen Lichtstreuung	48
3.7.2	<i>Stopped-flow</i> -Messungen von Proteoliposomen	49
4	Ergebnisse	51
4.1	Klonierungsarbeiten	51
4.2	Etablierung der zellfreien Proteinsynthese	52
4.2.1	Herstellung und Kontrolle der T7-RNA-Polymerase	53
4.2.2	Herstellung und Kontrolle des S30- <i>E. coli</i> -Extraktes	55
4.2.3	Evaluierung der Expressionsvektoren	56
4.3	Untersuchung des Glykosylierungs-Status von <i>DdAqpB</i>	57
4.3.1	Vergleich <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> - <i>DdAqpB</i>	59
4.3.2	Chemische Deglykosylierung von <i>DdAqpB</i>	61
4.4	C-terminale <i>GFP</i> -Fusion als Faltungskontrolle	62
4.5	Etablierung einer schnellen <i>in-situ</i> Faltungskontrolle für zellfreie Proteinsynthese- <i>Screenings</i>	65
4.5.1	Sekundärstrukturanalyse des zellfrei hergestellten <i>PfAQP</i> s	66
4.5.2	Anwendbarkeit auf das nicht fusionierte Protein	69
4.5.3	Präparative Herstellung und Rekonstitution von <i>PfAQP</i>	71
4.5.4	Funktionalitätsnachweis des <i>PfAQP</i> s	77
4.5.5	Schnelle Fluoreszenzmessung im Fluorimeter	79
4.5.6	Anwendung der <i>Screening</i> -Methode auf andere Proteine	79
4.6	Zellfreie Herstellung und Funktionalitätsnachweis des <i>hAQP3</i>	82

5 Diskussion	85
5.1 Etablierung des zellfreien Proteinsynthese-Systems	85
5.2 Untersuchung des <i>DdAqpB</i>	86
5.2.1 Glykosylierungsanalyse	86
5.2.2 Vergleichende Untersuchung von <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> - <i>DdAqpB</i> .	87
5.3 Optimierung der zellfreien Proteinsynthese	89
5.3.1 <i>GFP</i> -Fusion als <i>in situ</i> -Faltungskontrolle	89
5.3.2 Validierung der Faltungskontrolle	90
5.4 <i>hAQP3</i> : Zellfreie Herstellung und Funktionstest	99
5.5 Ausblick	99
6 Zusammenfassung	101
7 Summary	103
Literaturverzeichnis	105

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
as	<i>Antisense</i>
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Ax-Medium	Axenisches Medium (für <i>D. discoideum</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Zirkulardichroismus
Cfu	<i>Colony-forming units</i>
CMC	kritische Mizellbildungskonstante
CTP	Cytidintriphosphat
Dd	<i>Dictyostelium discoideum</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENT	Equilibrativer Nukleosid-Transporter
FM	<i>Feeding Mix</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB-Medium	<i>Lysogenic broth</i> -Medium (für <i>E. coli</i>)
MCT	Monocarboxylat-Transporter

Inhaltsverzeichnis

MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MF	Membranproteinfraktion
n-OG	n-Octyl- β -D-glucopyranosid
OD	Optische Dichte
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglykol
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
Psi	<i>Pound-force per square inch</i>
RCWMDE	Arginin, Cystein, Tryptophan, Methionin, Asparaginsäure, Glutaminsäure
RM	<i>Reaction Mix</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	<i>Sense</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SPB	Sörensen Phosphatpuffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFMS	Trifluormethansulfonsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UT	Urea-Transporter
UTP	Uridintriphosphat
vvm	Liter Luft pro Liter Medium pro Minute
YPTG-Medium	Hefe-Tryptophan-Pepton-Glucose-Medium (für <i>E. coli</i>)

1 Einleitung

1.1 Membranproteine

1.1.1 Allgemeine Bedeutung der Membranproteine

Die Bedeutung der Membranproteine lässt sich anhand einer einzigen Zahl feststellen: 60 %. Denn 60 % aller *Drug Targets*, also der Zielstrukturen für Medikamente im Körper, sind Membranproteine [1,2]. Das Interesse an Membranproteinen für die Arzneimittelforschung und damit für die Gesundheit des Menschen ist immens.

Schon früh wurde erkannt, dass Arzneimittel im Körper an bestimmte Zielstrukturen binden. So postulierte der Physiologe John Newport Langley 1905, dass Nikotin und Curare an eine „rezeptive Substanz“ in Muskelzellen binden [3]. Paul Ehrlich formulierte 1907 als Erster die Existenz von „Chemorezeptoren“ [4,5]. Das lange gültige Konzept der Rezeptoren und ihrer Wechselwirkungen mit Liganden wurde von Alfred Joseph Clark [6] verfeinert und wurde erst zu Beginn der 80er Jahre, als die ersten Rezeptoren kloniert wurden [7], von einer genaueren Vorstellung über die Membranproteine abgelöst. Computergestützte Voraussagen ergeben, dass Membranproteine in etwa 20–30 % eines typischen Genoms darstellen [8]. Entsprechend groß ist ihre Bedeutung für den jeweiligen Organismus, stellen sie doch die Verbindung zwischen dem Inneren und dem Äußeren der Zelle dar: Sie transportieren Ionen, Metabolite, Proteine und RNA, sie erhalten Signale und leiten sie weiter, sie halten den Zellverbund zusammen oder heften die Zelle an der Extrazellulärmatrix fest, sie regulieren den intrazellulären Vesikel-Transport, bestimmen die Lipid-Zusammensetzung der Membran, erhalten die Form von Zellorganellen aufrecht und vieles mehr [9]. Entsprechend vielfältig sind Membranprotein-assoziierte Krankheiten: Defekte Ionenkanäle können Nerven- und Herzkrankheiten auslösen [10–13], Farbenblindheit wird hervorgerufen durch nicht funktionierende Photorezeptoren im Auge [14], Wasserkanäle (Aquaporine) können nicht nur in der Niere, sondern auch beim Schlaganfall kritisch sein [15].

Membranproteine müssen mit ihrer Struktur die Schwierigkeit überwinden, sowohl hydrophobe als auch hydrophile Bereiche zu überbrücken. Die Natur hat dieses Problem mit nur zwei Möglichkeiten der Proteinfaltung gelöst. Alle Membranproteine sind aus α -Helix- oder β -Faltblatt-Strukturen aufgebaut. Diese erlauben es, dass die Proteine hydrophobe Bereiche ausbilden können, mit denen sie sich in die Membran integrieren. Faszinierenderweise kann gleichzeitig das Innere des Proteins so hydrophil sein, dass es Wasser oder Ionen leiten kann [9].

Trotz der Tatsache, dass ein Großteil unserer heute existierenden Medikamente ein Membranprotein als Zielstruktur hat, ist über eben diese noch sehr wenig bekannt. Auch wenn inzwischen das gesamte menschliche Genom entschlüsselt ist, bedeutet die Kenntnis der Aminosäuresequenz noch lange nicht, dass die Struktur des Proteins bekannt ist [16]. Eine hochauflösende Tertiär- bzw. Quartärstruktur ist nur erhältlich, wenn das Protein kristallisiert und dann Röntgen-diffraktometrisch untersucht wird. Nur ca. 1% aller bislang kristallisierten Proteine sind jedoch Membranproteine [9]. Diese sehr geringe Zahl macht es dem modernen computergestützten *Drug Design* schwer, neue Wirkstoffe zu entwerfen. Ein lösliches Protein zu kristallisieren dauert, begonnen bei der Klonierung, im Schnitt drei Jahre. Bei Membranproteinen kann dies viel mehr Zeit in Anspruch nehmen, mit weniger Aussicht auf Erfolg [16]. Gründe dafür sind zum einen die spezielle amphiphile Struktur dieser Proteinklasse, zum anderen ist es besonders schwierig, Membranproteine in größeren Mengen zu gewinnen. Dies hängt damit zusammen, dass sie sich *in vivo* häufig sehr schlecht produzieren lassen [16].

1.1.2 Spezielle Membranproteine: Aquaporine

Das erste funktionelle Aquaporin (AQP) wurde von Peter Agre zufällig bei der Untersuchung von Rhesusproteinen in Erythrozyten entdeckt [17]. Im Jahre 2003 erhielt er dafür den Nobelpreis für Chemie. Aquaporine sind hochselektive Wasserkanäle, welche bis zu 3 Milliarden Wassermoleküle pro Sekunde entlang einem chemischen oder osmotischen Gradienten leiten können. Dies entspricht der freien Diffusion von Wasser [18]. Wasser kann zwar auch so in einem gewissen Umfang die Zellmembran passieren, jedoch ist dafür eine sehr hohe Aktivierungsenergie notwendig [17]. Dies ist für viele physiologische Prozesse, wie z.B. der Wasser-Reabsorption in der Niere, alleine nicht ausreichend [19,20]. Später wurde entdeckt, dass außer den ausschließlich

Wasser leitenden orthodoxen Aquaporinen, einige Aquaporine auch kleine ungeladene Solute, wie Glycerol und Harnstoff, leiten können. Diese werden als Aquaglyceroporine bezeichnet [21, 22]. Der Mensch besitzt 13 Aquaporine, von denen die Aquaporine 0, 1, 2, 4, 5, 6 und 8 orthodoxe Aquaporine sind, die Aquaporine 3, 7, 9 und 10 Aquaglyceroporine [23]. Die Aquaporine 11 und 12 scheinen zu einer eigenen Gruppe zu gehören [24]. Aquaporine besitzen insgesamt sechs Transmembranspannen, die beiden Termini liegen jeweils intrazellulär. Die sechs Helices werden von fünf Schleifen verbunden, von denen zwei die Membran nicht vollständig durchqueren und dementsprechend zwei Halbhelices ausbilden (s. Abb. 1.1) [23]. Die Sequenzähnlichkeiten innerhalb des Proteins lassen die Vermutung zu, dass die Aquaporine aus einer Genduplikation entstanden sind [25]. Aufgrund ihrer Sanduhr-ähnlichen Form wurden die Aquaporine früher häufig mit dem *hourglass*-Modell beschrieben [26]. Im Jahr 2000 wurden die ersten cryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen des AQP1 gemacht [27], inzwischen sind einige Aquaporine kristallisiert [28–30]. In der Zellmembran lagern sich die meisten Aquaporine zu Tetrameren zusammen, der Wasser- und Solutstrom erfolgt jedoch durch die Poren der Monomere [31]. Teilweise existieren Hinweise auch auf eine Funktion der zentralen Pore [32].

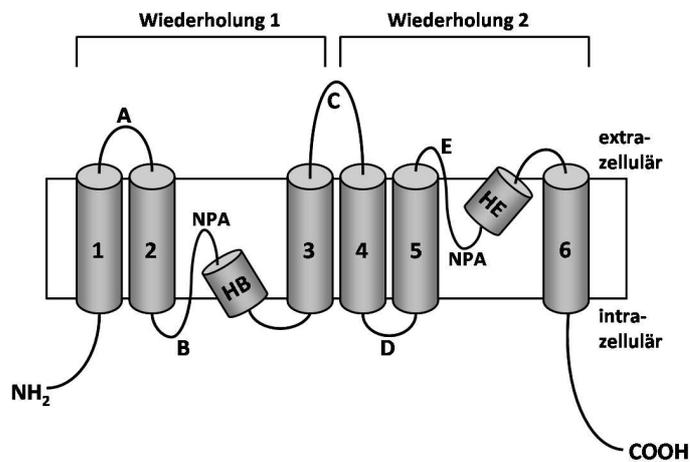


Abbildung 1.1: Allgemeiner Aufbau der Aquaporine. Die Membranhelices 1–6 sind über die *Loops* A–E miteinander verbunden. Die Halbhelices HB und HE auf den Schleifen B und E lagern sich zu einer Pseudohelix zusammen und bilden dabei an ihrer Berührungsstelle die NPA-Region aus. Abbildung in Anlehnung an [25].

Aquaporine zeichnen sich durch zwei hochkonservierte Engstellen aus: die aromatische Arginin-Region (ar/R) am extrazellulären Ende der Pore und die NPA-Region, welche durch die Asparagin-Reste des NPA-Motivs (Asparagin, Prolin, Alanin) am Ende der beiden Halbhelices in der Mitte der Pore ausgebildet wird [33, 34]. Die ar/R-Region sorgt bei den orthodoxen Aquaporinen für den Ausschluss von größeren ungeladenen Molekülen, außerdem ist sie für den Ausschluss von Protonen zuständig. Die NPA-Region hingegen ist in erster Linie für den Ausschluss von Kationen zuständig und wirkt unterstützend beim Ausschluss von Protonen [35].

Das *Dictyostelium discoideum* Aquaporin B (*DdAqpB*)

Von Bülow *et al.* gelang 2012 in diesem Arbeitskreis die funktionelle Charakterisierung des *DdAqpB*. Da die zuvor entdeckten putativen Aquaporine *wacA* und *AqpA* nicht auf ihre Wasser- oder Glyceroleitfähigkeit untersucht wurden [36, 37], ist es somit das erste funktionelle Aquaporin aus dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*. Dieser ist ein etablierter Modellorganismus für Chemotaxis [38] und dient in diesem Zusammenhang der Fragestellung, ob Aquaporine an der Zellwanderung beteiligt sind. Während der *DdAqpB*-Wildtyp keine signifikante Wasserleitfähigkeit besitzt, konnte gezeigt werden, dass bei Deletion der Aminosäuren 208-219 im *D-Loop*, das Protein zu einem Wasser leitenden Kanal wird. Somit liegt vermutlich ein durch diesen Teil des Proteins hervorgerufener *Gating*-Mechanismus vor, der jedoch noch nicht weiter untersucht ist. Das *DdAqpB* konnte in allen Stadien des Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum* nachgewiesen werden und wurde sowohl in der Plasmamembran als auch in innerzellulären Vakuolen und Lamellipodien-artigen Ausstülpungen lokalisiert [39]. Desweiteren vermuten wir, dass das *DdAqpB* teilweise glykosyliert vorliegt. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass eine Glykosylierung großen Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften des Proteins ausüben kann: Die Proteolyseeigenschaften können verändert sein, ebenso die Löslichkeit und Stabilität des Proteins, sowie die Form und die Erkennung durch andere Proteine [40]. Auch bei der Proteinproduktion und -prozessierung haben Zuckerreste einen Einfluss [41]. Was besonders für das *DdAqpB* interessant ist, ist die Tatsache, dass Glykosylierungen durchaus an *Gating*-Mechanismen beteiligt sein können [42].

Das *Plasmodium falciparum* Aquaporin (*PfAQP*)

Das Aquaporin aus dem Malaria-Erreger und intrazellulären Parasiten *Plasmodium falciparum* (*PfAQP*) hat die ungewöhnliche Eigenschaft, sowohl Wasser als auch Glycerol genauso effizient zu leiten, wie sonst nur orthodoxe Aquaporine, beziehungsweise Glycerol-Kanäle. Die Gründe hierfür sind seit der Existenz der in Abb. 1.2 dargestellten Kristallstruktur bekannt. Das *PfAQP* ist eines der seltenen Aquaporine, bei dem nicht nur eine, sondern beide NPA-Regionen verändert sind (NLA und NPS). In Bezug auf Porenweite und Aminosäure-Zusammensetzung gleicht das *PfAQP* einem klassischen Aquaglyceroporin. Es besitzt jedoch gleichzeitig die Fähigkeit, am konservierten Arginin ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk auszubilden, welches die schnelle Passage von Wasser erlaubt [30].

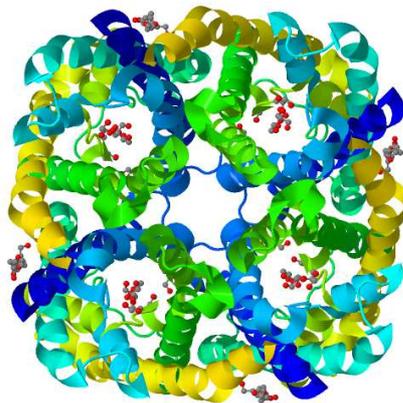


Abbildung 1.2: Kristallstruktur des *PfAQP*. Abbildung aus der RCSB Protein Data Bank (3CO2) [30].

Das *humane* Aquaporin 3 (*hAQP3*)

Das *hAQP3* ist ein Aquaglyceroporin, welches in der Niere, der Lunge, im Auge und der Haut vorkommt [43–46]. Eine besondere Rolle spielt es in der Haut. Dort sind Wasser- und Glyceroltransport durch das *hAQP3* für den Hydratisierungszustand der Haut zuständig. Ebenso spielt es eine Rolle beim Wassertransport während der Zellmigration und im Glyceroltransport für den Lipid- und ATP-Metabolismus. Dieser ist wichtig für Zellproliferation, -differenzierung und Wundheilung [47]. Wahrscheinlich aus diesem Grund ist das *hAQP3* auch mit der Entstehung von Hautkrebs assoziiert [48].

1.2 Die zellfreie Proteinsynthese

Schon in den frühen 60er Jahren wurden von Marshall W. Nirenberg und Heinrich Matthaei wichtige Meilensteine in der Geschichte der zellfreien Proteinsynthese gesetzt, als sie *in vitro* zeigen konnten, wie mRNA in funktionelle Polypeptide translatiert wird [49, 50]. Damals diente das System noch vornehmlich der Aufklärung des Entstehens von Proteinen aus in DNA codierten Informationen [51]. Seitdem hat sich die Technik rapide verbessert und stellt heute vor allem eine wichtige Alternative zu den klassischen *in vivo*-Proteinproduktions-Systemen dar. Das Prinzip basiert auf der Erkenntnis, dass die Zellintegrität keine Voraussetzung für ein Funktionieren von Transkription und Translation ist, dementsprechend kann im Prinzip ein Lysat jeglichen Organismus als Basis für die zellfreie Proteinsynthese dienen [50]. Der entsprechende Extrakt liefert die notwendigen Ribosomen, Translationsfaktoren und weitere Faktoren wie Aminoacyl-tRNA-Synthetase [52]. Diejenigen Extrakte, welche sich im Laufe der Zeit am stärksten durchgesetzt haben, sind der *E. coli*-Extrakt, der Weizenkeimextrakt und der Kaninchen-Retikulozyten-Extrakt [53]. Während im *E. coli*-basierten System und im Weizenkeim-System außer der Ausbildung von Disulfidbrücken keine posttranslationalen Modifikationen vorkommen, gibt es Hinweise über Glykosylierungen bei Einsatz des Kaninchen-Retikulozyten-Extraktes [54, 55]. Am standardisiertesten und am einfachsten in der Herstellung ist zur Zeit der S30-*E. coli*-Extrakt, der deshalb auch in dieser Arbeit verwendet wurde [56]. Viele pro- und eukaryotischen Proteine wurden mit diesem schon erfolgreich hergestellt [56].

1.2.1 Vor- und Nachteile der zellfreien Proteinsynthese

Die Vorteile der zellfreien Proteinsynthese gegenüber den klassischen *in vivo*-Proteinproduktions-Systemen sind vielfältig. Zunächst können mit sehr kleinen Reaktionsansätzen im Milliliter-Maßstab Proteinmengen im Milligrammbereich gewonnen werden [57]. Desweiteren eignet sich das System vor allem auch für Proteine, welche *in vivo* nur schwer produziert werden können. Dazu gehören außer toxischen Proteinen vor allem die Membranproteine. Membranproteine sind – hergestellt in *E. coli*, Hefe oder anderen Zellen – meist nicht mit deren Zellphysiologie kompatibel, werden durch proteolytische Kontrollsysteme abgebaut oder verstopfen die Translokationssysteme. Dies führt zum Absterben der Zellen und damit zu geringen Ausbeuten oder zur Aus-

bildung sogenannter *Inclusion Bodies* mit größtenteils denaturiertem Protein, welches sich, wenn überhaupt, oft nur mit sehr starken Detergenzien wieder entfalten lässt [56]. Bei Membranprotein-*Screenings* im zellfreien Synthesesystem wird hingegen eine Erfolgsrate von in etwa 80 % geschätzt [57]. In Anbetracht der Tatsache, dass eines der großen Hindernisse bei der Strukturaufklärung von Membranproteinen deren geringe Verfügbarkeit ist, wird deutlich, wie relevant diese Technik für die Zukunft ist.

Ein weiterer großer Vorteil ist die geringe Hintergrundproduktion. Während der Herstellung wird der S30-*E. coli*-Extrakt kurz einem Salz- und Temperaturschock unterworfen. Dies bedingt das Abdissoziieren von endogener mRNA und deren anschließende Desintegration. Die Hintergrundproduktion kann so extrem gering gehalten werden. Dies wird weiterhin dadurch unterstützt, dass die hochspezifische T7-RNA-Polymerase eingesetzt wird. Diese erkennt ausschließlich die auf dem Plasmid vor dem zu exprimierenden Gen codierte T7-Sequenz und stellt somit sicher, dass fast nur das gewünschte Protein produziert wird [52].

Ein weiterer wichtiger Faktor ist auch, dass das System dem Experimentator komplett zugänglich ist. Dies bietet Ansatz für vielfältige Möglichkeiten der Manipulation. Auf der einen Seite kann als *Template* sowohl Plasmid-DNA als auch PCR-Produkt oder mRNA in das System gegeben werden. Weiterhin sind proteinstabilisierende Zusätze möglich, wie zum Beispiel Protease-Inhibitoren, solubilisierende Detergenzien oder Liposomen, Chaperone, Kofaktoren oder sonstige [57, 58]. Auf der anderen Seite besteht außerdem die Möglichkeit, auch direkt das Endprodukt zu manipulieren. Durch den einfachen Austausch bestimmter Aminosäuren im Reaktionsgemisch, können die Proteine z.B. mit stabilen Isotopen markiert werden, was für NMR-Untersuchungen interessant ist [59]. Auch synthetisch hergestellte, unnatürliche Aminosäuren können in die Proteine eingebaut und damit bestimmte Regionen ganz nach Wunsch in ihren Eigenschaften verändert werden, so dass es möglich ist, diese funktionell zu charakterisieren [60].

Als einziger Nachteil ist zu nennen, dass die zellfreie Herstellung von Proteinen noch etwas teurer ist als die klassischen Systeme. Eine komplette 1 ml Reaktion kostet im Handel im Schnitt 300 €. Die Kosten können jedoch enorm reduziert werden, wenn die Komponenten nicht kommerziell erworben, sondern selbst hergestellt werden. Die ungefähren Materialkosten belaufen sich dann nach eigenen Berechnungen auf etwa 30 € pro Reaktion, kosten also im Schnitt ein Zehntel. Somit ist die *in vitro*-Produktion kaum noch teurer als die *in vivo*-Herstellung. Die Eigenherstellung hat aber auch noch

einen weiteren Vorteil: Die kommerziellen Systeme sind nur als fertige Mischungen erhältlich, desweiteren werden die genauen Mengen an enthaltenem Magnesium oder Kalium oft nicht angegeben. Häufig ist es jedoch notwendig, gerade in Bezug auf den Magnesiumgehalt, aber teilweise auch in Bezug auf den Kaliumgehalt oder die Anteile der verschiedenen Aminosäuren, die Reaktionszusätze verändern zu können [52]. Auch eine Manipulation des Proteins durch den Einbau unnatürlicher oder isotopenmarkierter Aminosäuren ist nur mit einem eigenen, offenen System denkbar.

1.2.2 Aufbau des *Continuous Exchange-Systems*

Eine Durchführung der zellfreien Proteinsynthese im *Batch*-Verfahren ist möglich, führt aber aufgrund des schnellen Verbrauchs an Präkursoren und dem raschen Anfallen des toxischen Abbauprodukts Pyrophosphat zu einem schnellen Erliegen der Reaktion und damit zu geringen Proteinausbeuten. Es empfiehlt sich deshalb, das *Continuous-Exchange*-Verfahren anzuwenden (s. Abb. 1.3 und 1.4). Bei diesem gibt es zunächst ein Kompartiment (*Reaction Mix*), welches alle Komponenten des Systems beinhaltet und in dem entsprechend die Proteinsynthese stattfindet. Außerdem gibt es ein zweites Kompartiment, welches mit dem *Reaction Mix* über eine semipermeable Membran verbunden ist: der *Feeding Mix* beinhaltet zusätzlich alle niedermolekularen Komponenten und kann durch Diffusion diese Präkursoren, sobald sie im *Reaction Mix* zur Neige gehen, nachliefern. Außerdem kann das Pyrophosphat in den *Feeding Mix* verdünnt werden. Mit diesem Verfahren sind Reaktionszeiten bis zu einem Tag und hohe Ausbeuten möglich [52].

1.2.3 Produktion von Membranproteinen

Werden Membranproteine im zellfreien Produktionssystem hergestellt, präzipitieren diese aufgrund ihres hydrophoben Charakters. Das entstehende Präzipitat ist in seiner Struktur nicht mit den *Inclusion Bodies* zu vergleichen, da es sich meist mit milden Detergenzien resolubilisieren lässt [56]. Die Produktion des Proteins als Präzipitat liefert erfahrungsgemäß jedoch nur in einigen Fällen gute Ausbeuten, außerdem kann eine zwischenzeitliche Denaturierung auch die Funktionalität beeinflussen [61]. Es ist dementsprechend üblich, bei der Herstellung von Membranproteinen Detergenzien zuzusetzen. Diese sind aufgrund ihrer amphiphilen Struktur dazu in der Lage,

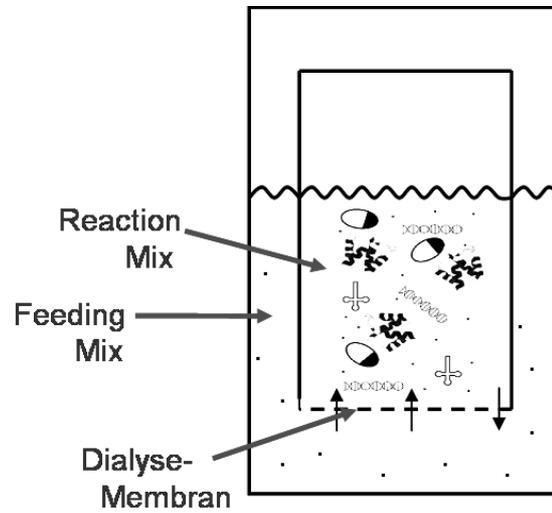


Abbildung 1.3: Aufbau des *Continuous-Exchange-Systems*. Abbildung verändert nach [53].

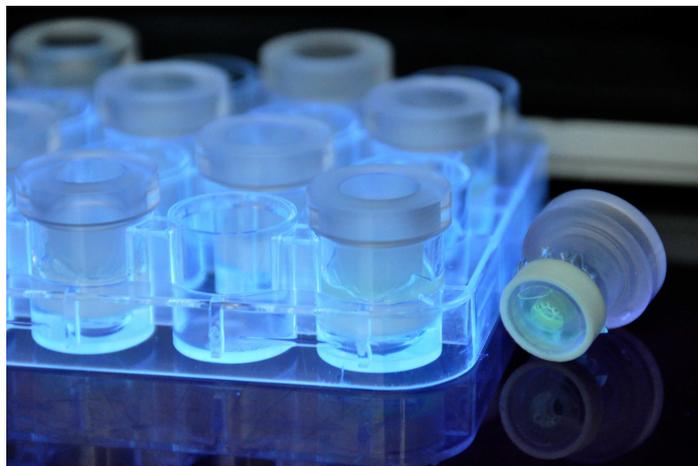


Abbildung 1.4: Einsatz des *Continuous-Exchange-Systems*. Dargestellt sind mehrere einzelne Reaktionsgefäße, welche in eine 24-well-Platte eingesetzt werden können.

in wässrigen Lösungen Mizellen auszubilden. In diese können die größtenteils hydrophoben Membranproteine integriert werden, sobald sie vom Ribosom abdissoziieren. Sie werden so in ihrer ursprünglichen Form bewahrt [56]. Inzwischen stehen viele Detergenzien zur Verfügung, die von dem zellfreien Proteinsynthese-System gut toleriert werden und auch schon erfolgreich eingesetzt wurden [62]. Auch die direkte Integration in Liposomen oder *Nanodisks* konnte schon gezeigt werden [63, 64].

1.3 GFP und seine Anwendungsgebiete

Das zuerst von Shimomura *et al.* aus der Qualle *Aequorea aequorea* isolierte fluoreszierende Protein *green fluorescent protein (GFP)* (s. Abb. 1.5 und 1.6) [65] wurde 1974 von Morise *et al.* kristallisiert [66]. Der Mechanismus der Fluorophor-Bildung wurde 1995 von Cubitt *et al.* postuliert [67]. Das Fluorophor bildet sich nach der Translation in einer chemischen Reaktion aus den drei Aminosäuren Serin, Tyrosin und Glycin. Dafür ist eine Zyklisierung mit anschließender Dehydrierung und Oxidation notwendig [67]. Der große Durchbruch für das Protein kam, als das Gen von Prasher *et al.* 1992 kloniert wurde [68] und Chalfie *et al.* und Inouye & Tsuji 1994 zeigen konnten, dass die Expression des Gens in anderen Organismen zu Fluoreszenz führt [69–71]. Seitdem hat das *GFP* an enormer Bedeutung für die Molekularbiologie gewonnen, was 2008 mit einem Nobelpreis für Shimomura, Chalfie und Tsien gewürdigt wurde. *GFP* und seine Mutanten werden zum Beispiel als *in vivo* Marker und Reporter-Gen verwendet, einerseits um die Expression bestimmter Gene nachzuvollziehen, andererseits um regulatorische Regionen zu identifizieren und Promotoraktivitäten zu bestimmen [72–74]. Als Fusionsproteine können sie *Target*-Proteine auf Gewebeebene, zellulärer oder subzellulärer Ebene lokalisieren oder als Kontrolle für die Transformationseffizienz dienen [67, 71, 72, 75]. Zudem finden das *GFP* und seine Abkömmlinge als Indikatoren Einsatz: Aufgrund ihrer pH- und Calcium-Sensitivität werden sie bei intrazellulären pH- und Calcium-Messungen verwendet. Eine ebenso große Rolle spielen sie bei der Aufklärung von Protein-Protein-Wechselwirkungen [71, 74, 76, 77]. Dafür macht man sich das unter dem Namen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) bekannte Phänomen zunutze, dass die Energie eines angeregten Farbstoffes strahlungslos auf einen zweiten Farbstoff übertragen werden kann und es dabei zu einer Verschiebung des Maximums im Emissionsspektrum kommt. Da Donor und Akzeptor dafür eine gewisse

räumliche Nähe haben müssen, können Wechselwirkungen zwischen Proteinen gemessen werden, sofern sie mit den entsprechenden Farbstoffen, wie zum Beispiel *GFP* markiert sind [78]. Ein weiteres, jedoch weniger bekanntes Anwendungsgebiet ist die *GFP*-Fusion zur Faltungskontrolle.

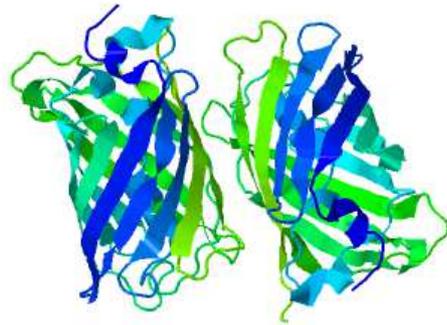


Abbildung 1.5: Kristallstruktur des *GFP*-Dimers. Abbildung aus der RCSB Protein Data Bank (1GFL) [79].

1.3.1 *GFP* als Faltungskontrolle im *in vivo*-System

Zuerst beschrieben durch Waldo *et al.* hat sich die N- oder C-terminale *GFP*-Fusion schnell zu einem etablierten System der Faltungskontrolle von *in vivo* hergestellten Membranproteinen entwickelt [80]. Die Autoren konnten zeigen, dass, wenn N- oder C-terminal an das entsprechende Protein angehängtes *GFP* korrekt gefaltet ist – und sich damit das Fluorophor ausbilden und fluoreszieren kann – das vorangegangene Protein ebenfalls korrekt gefaltet ist. Es ist daher möglich, Fluoreszenz des Fusionsproteins direkt mit einer korrekten Faltung zu korrelieren und damit die Produktionsbedingungen für das jeweilige Protein zu optimieren. Die Gültigkeit dieser Faltungskontrolle wurde inzwischen durch mehrere Autoren bestätigt [81–83].

1.3.2 GFP als Faltungskontrolle im *in vitro*-System

Zum Einsatz der GFP-Fusion im zellfreien Proteinsynthese-System existiert bislang kaum Literatur. Beschrieben wurde lediglich die N-terminale GFP-Fusion von löslichen Proteinen [80,84], wobei auch nur bei Waldo *et al.* die GFP-Fusion als Faltungskontrolle dient, bei Chekulayeva *et al.* hingegen ist sie nur Mittel zur Überprüfung der Ausbeute. Desweiteren wurden im Weizenkeim-System N-terminale GFP-Fusionsproteine hergestellt, um über die Fluoreszenz die Rekonstitution der Proteine in Liposomen zu überprüfen [85]. An eine mögliche zusätzliche Faltungskontrolle wurde hier jedoch nicht gedacht.



Abbildung 1.6: Zellfrei hergestelltes GFP in verschiedenen Konzentrationen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war zunächst die Untersuchung des *DdAqpB* hinsichtlich seiner Glykosylierung und anschließend dessen zellfreie Herstellung. Zu diesem Zweck sollte das zellfreie Proteinsynthese-System in diesem Arbeitskreis etabliert werden. Während der zellfreien Herstellung von *DdAqpB* gemachte Beobachtungen ließen den Schluss zu, dass, abhängig von den Reaktionsbedingungen, verschieden gefaltete Proteinspezies entstehen können.

Diesem Phänomen sollte mit Hilfe der C-terminalen GFP-Fusion als Faltungsindikator auf den Grund gegangen werden. Neben dem *DdAqpB* wurde als weiteres Testprotein das *PfAQP* ausgewählt. Das Verfahren sollte dann weiter ausgebaut werden, um eine *High throughput-Screening*-Methode für die Reaktionsbedingungen im zellfreien Proteinsynthese-System zu etablieren, welche im Gegensatz zu den jetzigen Verfahren nicht auf der Proteinausbeute, sondern auf der Proteinfaltung basiert. Dafür sollte geprüft werden, ob die mit dem Fusionsprotein erzielten Ergebnisse auch für das nicht fusionierte Protein gelten. Ebenso sollten Sekundärstrukturanalysen von unter

verschiedenen Bedingungen hergestelltem *PfAQP* gemacht werden, um den Einfluss verschiedener Reaktionszusätze auf die Faltung zu untersuchen. Letztendlich sollte die Funktionalität des unter optimierten Bedingungen hergestellten *PfAQPs* nachgewiesen werden. Ebenso sollte die Möglichkeit der Anwendung im *High throughput*-Verfahren gezeigt werden, sowie die Anwendbarkeit des Systems auf andere Membranproteine.

Als weiteres Aquaporin sollte das *hAQP3* zellfrei produziert und dessen Funktionalität nachgewiesen werden.

2 Material

2.1 Enzyme, Kits, Chemikalien, Material

ABCR, Karlsruhe

Calciumfolinat

Affymetrix, Santa Clara, USA

THERMO SEQUENASE™ CYCLE SEQUENCING KIT

Amersham Biosciences, GE Healthcare, München

ECL plus Western Blotting Detection System, HYBOND™-P Western Blot-Membranen, Q-SEPHAROSE™ FAST FLOW, WHATMAN NUCLEPORE TRACK-ETCH MEMBRANES, WHATMAN CHROMATOGRAPHY PAPER 3MM

AppliChem, Darmstadt

LB-Agar-Pulver, LB-Medium-Pulver, SDS, MES, n-Octyl- β -D-glucopyranosid, BRIJ®35, BRIJ®58, Streptomycinsulfat, Phosphoenolpyruvat, Magnesiumacetat

Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA

E. coli Polar Lipid Extract

Becton Dickinson and Company, Heidelberg

BACTO™ YEAST EXTRACT, BACTO™ TRYPTONE, BACTO™ PROTEOSE PEPTONE NO. 3, BACTO™ PEPTONE,

Bio-Rad, München

POLYPREP® CHROMATOGRAPHY COLUMNS, Bio-Rad Protein Assay-Reagenz, BIO-BEADS®SM-2

Fermentas, St.Leon-Rot

Restriktionsenzyme, dNTPs, λ -DNA, T4 DNA Ligase, RIBOLOCKTM RNASE INHIBITOR, pBlueskript II SK (-)

Genaxxon BioScience, Ulm

GENAGAROSE LE, Ampicillin, TEMED

Glycon, Luckenwalde

n-Dodecyl- β -maltosid

Greiner bio-one

UV-STAR[®] MICROPLATTEN

J.T.Baker, München

Methanol, Ethanol, Isopropanol, Essigsäure

Macherey-Nagel, Düren

NUCLEOBOND[®]PC500

Merck, Darmstadt

DMSO, AMICON[®]ULTRA-4 Zentrifugenfilter

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

Ethidiumbromid

National Diagnostics, Atlanta, USA

SEQUAGEL[®]XR 7,5 %, SEQUAGEL[®]COMPLETE BUFFER REAGENT

Peqlab, Erlangen

PEQGOLD PRESTAINED PROTEIN MARKER III

PerkinElmer, Waltham, USA

OTIPLATETM-96

Promega, Mannheim

WIZARD[®]PLUS SV MINIPREPS DNA PURIFICATION KIT

Roche Diagnostics, Mannheim

Pyruvat-Kinase, *E. coli*-tRNA, COMPLETE EDTA-FREE PROTEASE INHIBITOR COCKTAIL TABLETS, pIVEX2.3

Roth, Karlsruhe

CaCl₂, Glycerol, APS, Albumin Fraktion V (BSA), ROTIPHORESE[®] BLAU R, ROTIPHORESE[®]-GEL 40, Trichloressigsäure, NH₃, NaCl, Dialysierschlauch Visking Cellulose, L-Leucin, L-Prolin, L-Arginin, HEPES, EDTA, Kaliumacetat, NaN₃, TRITON[™]X-100, Saccharose, DTT, Tris, Orange G, Borsäure, Bromphenolblau, TWEEN[®]20, Milchpulver, KH₂PO₄, K₂HPO₄, Na₂HPO₄ · 2 H₂O, Pen/Strep-PreMix (6,25 mg/ml Penicillin G Natrium-Salz, 10 mg/ml Streptomycin, 9 mg/ml Natriumchlorid), Agar-Agar, 2-Mercaptoethanol, Glucose, KCl

Sigma-Aldrich, München

GLYCOPROFILE[™]IV CHEMICAL DEGLYCOSYLATION KIT, Digitonin, Imidazol, Acetylphosphat, Mineralöl, IPTG *Antifoam Y-30 Emulsion*, alle weiteren Aminosäuren, ATP, CTP, GTP, UTP, PEG 8000, BRIJ[®]98

Stratagene, La Jolla, USA

PFUTURBO[®]DNA POLYMERASE AD

Südlaborbedarf, Gauting

HIGH YIELD[®]PCR CLEAN-UP & GEL-EXTRACTION KIT

Thermo Scientific, Schwerte

BRIJ[®]78, SLIDE-A-LYZER[®]DIALYSIS CASSETTES

Qiagen, Hilden

Ni-NTA Agarose

2.2 Geräte

Agilent Technologies, Waldbronn

UV/Vis-Spektrometer VARIAN CARY 50 UV-VIS

Avestin, Mannheim

Liposomen-Extruder LIPOSOFAST[™]

Bandelin, Berlin

Ultraschall-Sonotrode SONOPLUS

Beckman Coulter, Krefeld

OPTIMA™XL-80K ULTRACENTRIFUGE

Bio-Rad, München

POWER PAC 2000, TRANSBLOT® SD SEMIDRY TRANSFER CELL

Christ, Osterode

Gefriertrockner ALPHA2-4

Clemens, Waldbüttelbrunn

PCR-Gerät PRIMUS ADVANCED HT2X und HT MANAGER SOFTWARE

Edmund Bühler, Hechingen

Schüttler WS-10

Eppendorf, Hamburg

Photometer BIOPHOTOMETER

Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Wasserbad

Grant-bio, Hillsborough, USA

ROTATOR MIXER PTR-30

Infors, Bottmingen, Schweiz

Brutschrank INFORS HT MINITRON

Jasco, Gross-Umstadt

J-715 CD Spektrometer, Stopped-Flow BIOLOGIC: Software BIOKINE Ver 4.42, Küvette FC-08, Lichtbox mit 150 W Xe(Hg)-Lampe, Microprozessor Unit MPS-60, Mischeinheit SFM-300, UV/Vis- und Fluoreszenzspektrometer MOS-200, Monochromator BH-10-61UV, Photomultiplier PMS 250, Spannungsquelle ALX 250

Kern & Sohn GmbH, Balingen

Waage ABS 120-4

LI-COR Biosciences, Bad Homburg

DNA SEQUENCER 4200

Malvern, Herrenberg

ZETASIZER NANO ZS

New Brunswick Scientific, Wesseling-Berzdorf

Tiefkühlschrank U535 INNOVA

Olympus, Hamburg

Mikroskop CK2

PerkinElmer, Waltham, USA

Fluorimeter LS 55

Peqlab, Erlangen

Zentrifuge PERFECTSPIN, SDS-Gel-Gießstand und -Laufkammer

Raytest, Straubenhardt

Gel-Dokumentations-System IDA

Roche Diagnostics, Mannheim

Bild-Dokumentationssystem LUMI IMAGER™F1

Sartorius, Göttingen

Fermenter BIOSTAT® APLUS

Schott Instruments, Mainz

pH-Meter Lab 850

Scientific Industries, New York, USA

Heizblock TECHNE DRI-BLOCK®DB-2D

Thermo-Dux, Wertheim

VORTEX-GENIE®2

Thermo Scientific, Schwerte

NANODROP®SPECTROPHOTOMETER ND-1000, MULTIFUGE 1S-R, Sterilbank
HERA SAFE, Hochdruck-Homogenisator FRENCH PRESS CELL DISRUPTER FA-
078 mit zugehöriger Zelle

Zirbus, Bad Grund

Autoklav LTA 32/25

2.3 Plasmide

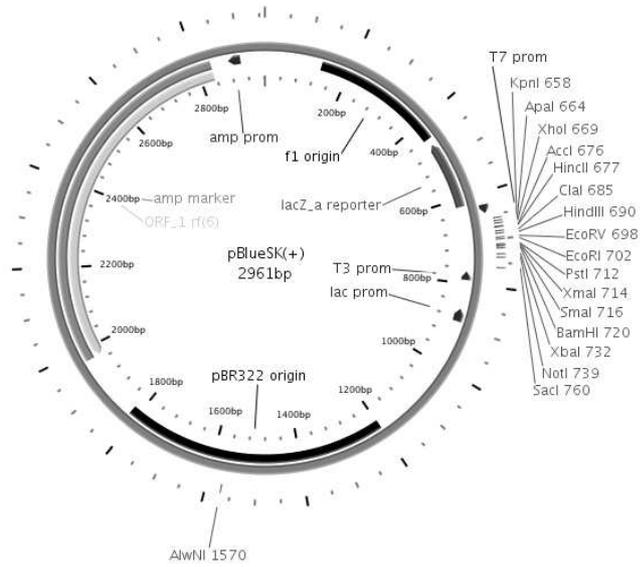


Abbildung 2.1: pBlueskript II SK (-)

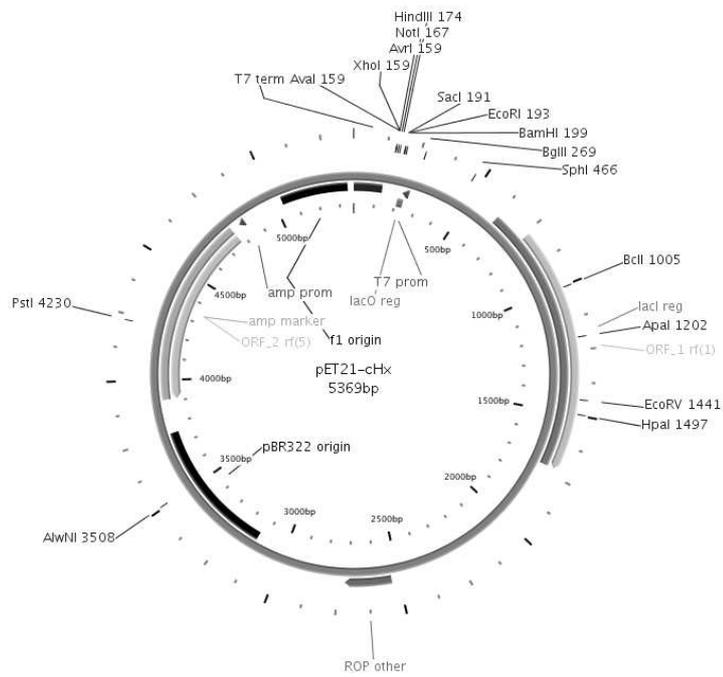


Abbildung 2.2: pET21a-cHx

2 Material

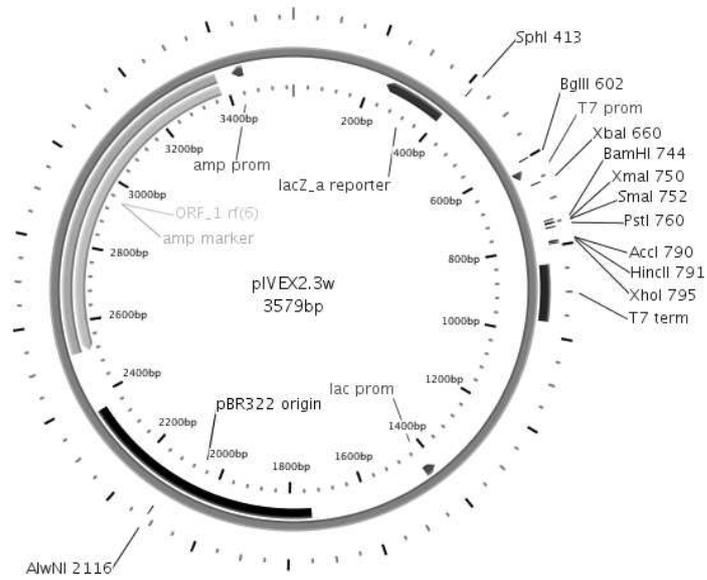


Abbildung 2.3: pIVEX2.3w

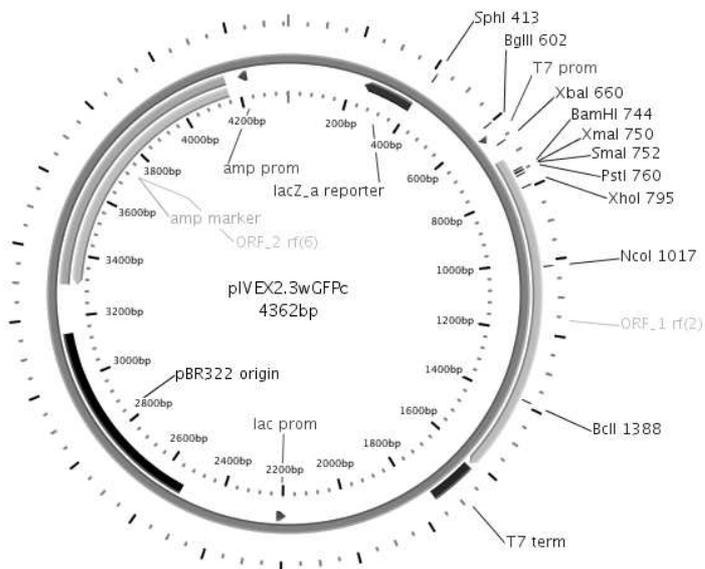


Abbildung 2.4: pIVEX2.3wGFPc

2.4 DNA-Sequenzen

Name	Beschreibung	Gene ID	Quelle
<i>Pf</i> AQP	Aquaporin aus <i>Plasmodium falciparum</i>	810885	NCBI
<i>At</i> ENT1	Equilibrativer Nukleosid-Transporter aus <i>Arabidopsis thaliana</i> 1	843369	NCBI
<i>At</i> ENT3	Equilibrativer Nukleosid-Transporter aus <i>Arabidopsis thaliana</i> 3	825857	NCBI
<i>h</i> UT-B	Urea-Transporter B aus <i>Homo sapiens</i>	6563	NCBI
<i>h</i> AQP3	Aquaporin 3 aus <i>Homo sapiens</i>	360	NCBI
<i>h</i> MCT4	Monocarboxylat-Transporter 4 <i>Homo sapiens</i>	9122	NCBI
<i>Dd</i> AqpB	Aquaporin aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	DDB_G0279443	dictyBase

2.5 Oligonukleotide (*Primer*)

Sequenzierprimer

Name	Sinn	Sequenz	Vektor
T3	as	GTG TAA GTT GGT ATT ATG TAG	pBlueskript
T7	s	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	pBlueskript

Klonierungsprimer

Name	Sinn	Sequenz	Schnittstelle
AqpBs	s	GCG <i>GGA TCC</i> ATG TCA TTA AAA AGA T	<i>Bam</i> HI
AqpBas	as	CGC <i>CTC GAG</i> TTT ATG AGT AGA TGA A	<i>Xho</i> I

2.6 *E. coli*-Stämme

Name	Genotyp	Quelle
DH5 α	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1</i> <i>endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁺</i>) <i>phoA supE44 thi-1</i> <i>gyrA96 relA1 λ⁻</i>	Hanahan, 1983
XL1- <i>Blue</i>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene
BL21(DE3)pRep4	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) pRep4 (Neo)	Novagen

2.7 *D. discoideum*-Stämme

Name	Genotyp	Quelle
AX2	214, <i>axeA2</i> , <i>axeB2</i> , <i>axeC2</i>	DBS0235534 dictyBase

2.8 Antikörper

Primärantikörper

Name	Beschreibung	Verdünnung
T7-RNAP	Monoklonaler Antikörper gegen die T7 RNA-Polymerase, 1 mg/ml, Maus, Novagen	1:5000
RGS-anti His	Monoklonaler Antikörper gegen den 6×Histidin- <i>Tag</i> , 0,2 mg/ml, Maus, Qiagen	1:2000
Penta His	Monoklonaler Antikörper gegen den 5×Histidin- <i>Tag</i> , 0,2 mg/ml, Maus, Qiagen	1:2000
GFP (FL)	Polyklonaler Antikörper gegen die <i>GFP</i> -Sequenz, 0,2 mg/ml, Kaninchen, Santa Cruz	1:10.000
Anti HA 12CA5	Monoklonaler Antikörper gegen den HA- <i>Tag</i> , 0,2 mg/ml, Maus, Roche	1:5000
αN20-34	Polyklonaler Antikörper gerichtet gegen die Aminosäuresequenz EDGGNIKDEEEKPLD des N-Terminus von <i>DdAqpB</i> , 0,5 mg/ml, Kaninchen, Biogenes	1:1000

Sekundärantikörper

Name	Beschreibung	Verdünnung
anti-Maus	Polyklonaler Antikörper gegen die leichte Kette des Maus-IgG, Meerettich-Peroxidase-konjugiert, 0,8 mg/ml, Ziege, Jackson Immuno Research	1:2000
anti-Kaninchen	Polyklonaler Antikörper gegen die leichte und die schwere Kette des Kaninchen IgG, Meerettich-Peroxidase-konjugiert, 0,4 mg/ml, Ziege, Jackson Immuno Research	1:10.000

2.9 Puffer, Medien und Lösungen

2.9.1 Molekularbiologie

Agarose-Gelelektrophorese

TAE Puffer

40 mM Tris-acetat, pH 8,0
1 mM EDTA

Probenpuffer orange (10-fach)

0,4 % Orange G
30 % Glycerol
100 mM EDTA

Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)

1 Tablette Ethidiumbromid
10 ml Aqua bidest.

Sequenzierung

TBE-Puffer (10-fach)

0,89 M Tris
0,89 M Borsäure
0,02 M EDTA, pH 8,3

E. coli Nährmedien

LB-Medium

10 g Trypton
10 g NaCl
5 g Hefeextrakt
ad 1 l Aqua bidest.

LB-Ampicillin-Platten

100 mg Ampicillin
1 l LB-Agar

LB-Agarplatten (Lennox)

35 g LB-Agar (Fertigpulver)
ad 1 l Aqua bidest.

2.9.2 Proteinchemie

Proteinreinigung

Protein-Reinigungspuffer

20 mM Tris-HCl, pH 8,0
300 mM NaCl
0,05 % n-Dodecyl- β -maltosid

SDS-PAGE

SDS-Ladepuffer (4-fach)

250 mM Tris-HCl, pH 6,8
400 mM DTT
0,02 % Bromphenolblau
8 % SDS
40 % Glycerol

Sammelgel-Puffer (4-fach)

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
0,4 % SDS

Trenngel-Puffer (4-fach)

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
0,4 % SDS

Kathodenpuffer (10-fach)

25 mM Tris-HCl, pH 8,3
192 mM Glycin
0,1 % SDS

Färbe-Lösung

50 % Rotiphorese[®] Blau R
50 % Aqua bidest.

Entfärber-Lösung

10 % Essigsäure
30 % Ethanol
60 % Aqua bidest.

Western Blotting

Transfer-Puffer (5-fach)

25 mM Tris-HCl, pH 8,3
192 mM Glycin
0,0375 % SDS

TBS-T-Puffer (10-fach)

1,35 M NaCl
0,2 M Tris-HCl, pH 7,6
1 % Tween 20

Transfer-Puffer (1-fach)

10 ml Transfer-Puffer 5-fach
10 ml Methanol
30 ml Aqua bidest.

M-TBS-T-Puffer

10 % TBS-T-Puffer (10-fach)
3 % Milchpulver

2.9.3 Zellkultur von *D. discoideum*

D. discoideum-Nährmedien

Ax-Medium, pH 6,7

2,5 g Bacto Trypton
2,5 g Pepton aus Casein
5,0 g Bacto Proteose Peptone No. 3
1,2 g KH_2PO_4
0,45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
27,6 ml 2 M Glucose
10 ml Pen/Strep-PreMix
ad 11 Aqua bidest.

Sörensen-Phosphatagar-Platten

15 g Agar-Agar
ad 11 SPB

SPB, pH 6,0

15 mM KH_2PO_4
2 mM Na_2HPO_4

2.9.4 Zellfreie Proteinsynthese

T7-RNA-Polymerase

T7-Puffer

30 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
50 mM NaCl
5 % Glycerol
10 mM 2-Mercaptoethanol

T7-Dialyse-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA
10 mM NaCl
1 mM DTT

S30-E. coli-Extrakt

YPTG-Medium, pH 7,0 (2-fach)

29,9 g KH_2PO_4
91,3 g K_2HPO_4
100 g Hefe-Extrakt
160 g Bacto Tryptone
50 g NaCl
198 g Glucose
ad 10l Aqua bidest.

S30-Puffer

10 mM Tris-acetat, pH 8,2
14 mM Magnesiumacetat
0,6 mM Kaliumacetat

S30-Puffer A

10 mM Tris-acetat, pH 8,2
14 mM Magnesiumacetat
0,6 mM KCl
6 mM 2-Mercaptoethanol

S30-Puffer B

10 mM Tris-acetat, pH 8,2
14 mM Magnesiumacetat
0,6 mM KCl
1 mM DTT
1 Tablette COMPLETE

S30-Puffer C

10 mM Tris-acetat, pH 8,2
14 mM Magnesiumacetat
0,6 mM Kaliumacetat
0,5 mM DTT

2.9.5 Protein-Rekonstitution

Rekonstitutionspuffer

20 mM Tris/MES, pH 8,0

30 mM KCl

Gradienten-Puffer

20 mM Tris-HCl, pH 7,5

100 mM NaCl

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde eingesetzt, um die *Dictyostelium discoideum* AqpB-Sequenz (*DdAqpB*) zu amplifizieren und gleichzeitig am 5'-Ende eine *Xho* I-Schnittstelle, sowie am 3'-Ende eine *Bam*H I-Schnittstelle einzufügen. Dazu wurden 20-60 ng *template* DNA mit 0,5 μ l des entsprechenden Primers (20 μ M), sowie 4 μ l dNTPs (2,5 mM), 5 μ l 10-fach PCR-Puffer für Pfu-Polymerase und 0,5 μ l Pfu-Polymerase (2,5 U/ μ l) versetzt. Der Ansatz wurde mit Aqua bidest. auf 50 μ l aufgefüllt und dem in Tabelle 3.1 dargestellten Temperaturprogramm unterworfen.

Tabelle 3.1: PCR Programm für die Polymerasekettenreaktion

Denaturierung	95° C	5 min
30 Zyklen		
Denaturierung	95° C	30 s
<i>Annealing</i>	50° C	40 s
Extension	72° C	1 min
Extension	72° C	10 min
Lagerung	4° C	

3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe, außerdem kann sie zur Konzentrationsbestimmung derselben herangezogen werden. Das Agarosegel wurde hergestellt, indem 1% Agarose in TAE-Puffer in der Mikrowelle erwärmt und gelöst wurde. Nach kurzem Abkühlen wurde der Lösung 1 μ l

Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) hinzugefügt und in die Gelgießkammer gegeben. Das ausgehärtete Gel wurde in die Gelkammer gelegt, mit TAE-Puffer überschichtet und die mit Probenpuffer versetzten Proben in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 120 V über 20 min. Als Marker diente mit *Pst* I verdaute λ -DNA (s. Abbildung 3.1). Die DNA-Banden wurden mittels Bestrahlung durch UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht.

λ -DNA/*Pst* I

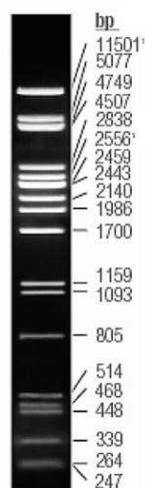


Abbildung 3.1: *Pst* I verdaute λ -DNA als Größenmarker für die Agarose-Gelelektrophorese.

3.1.3 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Aufreinigung wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des HIGH YIELD[®] PCR CLEAN-UP & GEL-EXTRACTION KIT aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 30 μ l gereinigtem Wasser.

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die Konzentration der DNA zu bestimmen, wurde diese photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = E_{260} \cdot f \cdot \text{Verdünnung} \quad (3.1)$$

$f = 0,02$ bei RNA, Einzelstrang-DNA, Oligonukleotiden

$f = 0,04$ bei Doppelstrang-DNA, Plasmiden

Proteine ($E_{280\text{ nm}}$) und Zucker ($E_{230\text{ nm}}$), welche als Verunreinigungen in der Probe vorliegen können, werden ebenfalls miterfasst. Ein Verhältnis von $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$ über 1,8 wird für die meisten molekularbiologischen Arbeiten als ausreichend sauber angesehen.

3.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Für den Restriktionsverdau wurden mindestens 800 ng DNA eingesetzt. Diese wurden mit ungefähr 1 U Enzym/ μg DNA in dem vom Hersteller angegebenen Puffer verdaut. Bei Doppelverdauen wurde ein für beide Enzyme kompatibler Puffer gewählt. Der Verdau erfolgte bei 37°C über einen Zeitraum von 2–3 h.

3.1.6 Ligation von DNA

Für die Ligation wurden mindestens 50 ng Vektor-DNA eingesetzt. Das Verhältnis von *Insert* zu Vektor betrug 5 : 3 oder 7 : 1. Pro Ligrationsansatz wurden 5 U T4 DNA-Ligase und der entsprechende Puffer eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur über 20 min.

3.1.7 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Von einer frischen LB-Platte gepickte DH5 α - oder BL21-Klone wurden ca. 10 h bei 37°C zu einer 5 ml LB-Vorkultur herangezogen. Anschließend wurde mit dieser die Hauptkultur von 100 ml angeimpft und bei 20°C bis zu einer OD_{600} von 0,4–0,6 inkubiert. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend bei $2000 \times g$ und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen mit 15 ml einer kalten 0,1 M CaCl_2 -Lösung überschichtet und vor dem Resuspendieren 10 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde weitere 10 min auf Eis gekühlt und die Zellen erneut abzentrifugiert. Anschließend wurden 10 ml der CaCl_2 -Lösung hinzugegeben, 20 min auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml kalter CaCl_2 -Lösung, welche 20 % Glycerol enthielt, resuspendiert. Die Suspension wurde über Nacht auf Eis inkubiert und am nächsten Tag in $100\ \mu\text{l}$ Aliquots bei

–80° C eingefroren. Die Transformationseffizienz wurde mit 1 ng Plasmid bestimmt und musste mindestens 10^6 Cfu/ μ g DNA besitzen.

3.1.8 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurden ca. 20–80 ng DNA eingesetzt. 100 μ l der kompetenten *E. coli*-Zellen wurden zunächst 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend mit dem Ligationsprodukt versetzt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden sie für 45 s auf 42° C erwärmt und anschließend 2 weitere Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 900 μ l LB-Medium und einstündiger Inkubation bei 37° C wurden die Zellen auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

3.1.9 Schnelltransformation kompetenter *E. coli*-Zellen

1 μ l Plasmid-DNA (Minipräparation, s. Abschnitt 3.1.11) wurde auf 100 μ l der kompetenten *E. coli*-Zellen gegeben, nachdem diese ca. 10 min auf Eis aufgetaut wurden. Der Ansatz wurde gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 45-sekündiges Erwärmen auf 42° C und ein kurzes Abkühlen auf Eis, bevor die Zellen auf den entsprechenden LB-Platten ausplattiert wurden.

3.1.10 Anlegen von *E. coli*-Dauerkulturen

Von den entsprechenden *E. coli*-Zellen wurden Dauerkulturen angelegt, indem 500 μ l 80 % Glycerol mit 1 ml Zellsuspension versetzt und bei –80° C eingefroren wurden.

3.1.11 Isolierung von Plasmid DNA

Zur Gewinnung kleinerer Mengen Plasmid-DNA wurden Minipräparationen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein entsprechender Klon von einer frisch hergestellten Platte gepickt und in 5 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37° C inkubiert. Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurde das WIZARD[®] PLUS SV MINIPREPS DNA PURIFICATION KIT eingesetzt, wobei folgende Abweichungen vom Protokoll gemacht wurden: Auf die Zugabe der alkalischen Protease wurde verzichtet, außerdem wurden zur Elution lediglich 50 μ l Aqua bidest. eingesetzt. Zur Gewinnung

größerer Mengen Plasmid-DNA wurden Maxipräparationen durchgeführt. Hierzu wurde zunächst mit einem frisch gepickten Klon eine 5 ml Vorkultur angelegt, welche bei 37° C für ca. 10 h inkubiert wurde. Darauffolgend wurde mit dieser die 500 ml Hauptkultur angeimpft, welche über Nacht bei 37° C inkubiert wurde. Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurde dann das NUCLEOBOND[®] PC500 Kit eingesetzt, wobei folgende Änderungen durchgeführt wurden: Nach dem Ausfällen der Proteine wurde sowohl die Zentrifugation (40 min) als auch die Filtration vorgenommen. Die Trocknungsdauer für die ausgefällte Plasmid-DNA wurde zudem auf 2 h verlängert. Das Lösen der Plasmid-DNA erfolgte mit ca. 300 μ l Aqua bidest.

3.1.12 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Methode nach Sanger. Die Probenvorbereitung erfolgte mit dem THERMO SEQUENASE[™] PRIMER CYCLE SEQUENCING KIT. Hierzu wurden 1500 ng *template* DNA mit 2 μ l IRD 800 fluoreszenzmarkierten Primern (2 μ M) versetzt und mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 13 μ l gebracht. Von diesem Mastermix wurden je 3 μ l mit 1,5 μ l des ddNTP/dNTP-Mixes versetzt, mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und folgendem PCR-Programm unterworfen:

Tabelle 3.2: PCR Programm für die Sequenzierung

Denaturierung	96° C	2 min
30 Zyklen		
Denaturierung	96° C	20 s
<i>Annealing</i>	50° C	20 s
Extension	60° C	4 min
Lagerung	4° C	

Im Anschluss an die PCR wurden die Proben mit 5 μ l Formamid-Puffer versetzt, von denen 1 μ l auf ein 6 % Polyacrylamidgel aufgetragen wurde (s. Tab. 3.3). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit Hilfe des LICOR DNA SEQUENCERS 4200 bei 1500 V mit TBE als Laufpuffer. Die Auswertung erfolgte mit der BASEIMAGIR V.4.2. Software.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Sequenziergels

30 ml	SEQUAGEL [®] XR 7,5 %
7,5 ml	SEQUAGEL [®] COMPLETE BUFFER REAGENT
400 μ l	DMSO
300 μ l	10% APS

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Aufreinigung von Proteinen

Im analytischen Maßstab (55 μ l) zellfrei hergestellte Proteine mit Oligo-Histidin-*Tag* (s. Abschnitt 3.4.3) wurden folgendermaßen aufgereinigt: Pro Ansatz wurden 15 μ l NI-NTA AGAROSE in eine Minipräparations-Säule gegeben. Diese wurde zunächst zweimal mit je 400 μ l Wasser und anschließend mit 200 μ l Reinigungspuffer gewaschen. Anschließend wurde die NI-NTA AGAROSE mit ca. 400 μ l Protein-Reinigungspuffer aus der Säule gespült und zu dem Protein gegeben. Die Bindung erfolgte bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln über 3 h. Anschließend wurde der Ansatz wieder in die Minipräparations-Säule gegeben, wobei nur die NI-NTA AGAROSE auf der Fritte verblieb. Es folgte ein Waschschriff mit zweimal 80 μ l Protein-Reinigungspuffer, welcher zusätzlich 20 mM Imidazol enthielt. Anschließend wurden 80 μ l Protein-Reinigungspuffer mit 300 mM Imidazol auf die Säule gegeben, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann eluiert.

Im präparativen Maßstab (1–3 ml) zellfrei hergestellte Proteine (s. Abschnitt 3.4.4) wurden folgendermaßen aufgereinigt: Pro 1 ml Reaktionsansatz wurden 200 μ l NI-NTA AGAROSE in eine POLY-PREP[®] CHROMATOGRAPHY COLUMN gegeben und mit zweimal 1 ml Aqua bidest. gespült. Anschließend wurde mit zweimal 1 ml Protein-Reinigungspuffer gespült. Die Säule wurde verschlossen und die NI-NTA AGAROSE mit einigen ml Protein-Reinigungspuffer aus der Säule geholt, zu dem aufzureinigenden Protein gegeben und über Nacht bei leichtem Schütteln und 4° C inkubiert. Anschließend wurde die NI-NTA AGAROSE mit dem gebundenen Protein auf eine Minipräparations-Säule gegeben, dreimal mit je 500 μ l Protein-Reinigungspuffer (0–40 mM Imidazol) gewaschen und anschließend in mehreren 500 μ l-Fractionen mit steigendem Imidazol-Gehalt (40–300 mM) eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden dann

mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. Abschnitt 3.2.3) auf ihre Reinheit überprüft. Fraktionen, die ausschließlich das gewünschte Protein enthielten, wurden vereint. Die Imidazol-Entfernung und Aufkonzentrierung des Proteins erfolgte mit Hilfe von AMICON[®] ULTRA-4 Zentrifugations-Filtern mit einem *cut-off* von 10 kDa. Dafür wurde der Filter zunächst mit 1 ml des Protein-Reinigungspuffers (ohne Imidazol) durch 5 min Zentrifugation bei $7500 \times g$ gespült, anschließend wurde die Proteinlösung hinzugegeben und mit Puffer aufgefüllt. Der Ansatz wurde 8–15 min bei $7500 \times g$ zentrifugiert, bis die Lösung auf ca. 1 ml einkonzentriert war. Der Vorgang wurde mindestens drei weitere Male wiederholt.

3.2.2 Bradford Proteingehaltsbestimmung

Die Proteingehaltsbestimmung erfolgte mit dem BIO-RAD Protein-*Assay*-Reagenz. 0,8–8 μ l der Proteinprobe wurden mit Aqua bidest. auf 800 μ l aufgefüllt, mit 200 μ l Reagenz versetzt und 5 min inkubiert. Eine Blindprobe wurde mit reinem Puffer angefertigt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Zuvor wurde eine Kalibriergerade mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt.

3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE dient der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Die Gele bestanden aus einem 12,5–15 % Trenngel und einem 5 % Sammelgel (s. Tab. 3.4). Zur Vorbereitung der Proben wurden diese mit SDS-Ladepuffer versetzt und 30 min bei 37° C inkubiert. Nach Einfüllen des Kathodenpuffers wurde pro Probentasche, je nachdem ob es sich um eine aufgereinigte Probe handelte oder nicht, 10–200 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Als Größenstandard diente der PEQGOLD PRESTAINED PROTEIN MARKER III. Zunächst wurde eine Spannung von 140 V für 15 min angelegt, um die Proben an der Grenze zum Trenngel zu fokussieren. Zur Auftrennung im Trenngel wurde die Spannung für 60–90 min auf 200 V erhöht. Die Gele wurden anschließend entweder für die Western-Blot-Analyse (s. Abschnitt 3.2.4) verwendet oder 1–2 h mittels Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung (RO-TIPHORESE[®] BLAU R) gefärbt. Die Entfärbung des Gels erfolgte unter Schütteln mit Entfärber-Lösung über Nacht.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamidgelen

	Trenngel 12,5 %	Trenngel 15 %	Sammelgel
H ₂ O	4 ml	3 ml	2,4 ml
Trenngelpuffer	3 ml	3 ml	
Sammelgelpuffer			1 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	5 ml	6 ml	0,6 ml
10% APS	80 μ l	80 μ l	25 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	6 μ l

3.2.4 Western Blotting und Immundetektion

Um die Proteine immunchemisch nachweisen zu können, mussten diese zuvor auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert werden. Dazu wurden auf der Anode einer TRANSBLOT[®] SD SEMIDRY TRANSFER CELL zunächst drei mit Transfer-Puffer getränkte WHATMAN CHROMATOGRAPHY PAPER 3 MM übereinander gelegt. Auf diese wurde die mit Methanol aktivierte PVDF-Membran gegeben, dann folgten das SDS-Gel und drei weitere mit Transfer-Puffer getränkte WHATMAN CHROMATOGRAPHY PAPER 3 MM. Nach Anlegen der Kathode erfolgte der Proteintransfer bei 17 V über 1 h. Die freien Bindungsstellen auf der Membran wurden anschließend für 1 h mit M-TBS-T blockiert, danach wurde die Membran bei 4° C über Nacht mit dem Erstantikörper (Verdünnung 1:2000–1:10.000 in M-TBS-T) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 15 min mit TBS-T gewaschen, anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper (Verdünnung 1:2000–1:10.000) inkubiert und drei weitere Male gewaschen. Die Entwicklung des Blots erfolgte mit dem ECL PLUS WESTERN BLOTTING DETECTION SYSTEM, die Auswertung mit Hilfe des LUMI-IMAGER[™] F1 und der entsprechenden LUMIANALYST Software.

3.3 Zellkultur von *Dictyostelium discoideum*

3.3.1 Anlegen von Sporen-Dauerkulturen

Alle Arbeiten mit *D. discoideum* wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Alle verwendeten Geräte, Behältnisse und Medien wurden zuvor sterilisiert. Dauerkulturen von *D. discoideum* wurden hergestellt, indem zuvor auf einer LB-Platte kultivierte

E. coli-Bakterien zur Hälfte mit einer Pipettenspitze abgekratzt und in 100 μl SPB resuspendiert wurden. Die Mischung wurde auf einer Phosphatagar-Platte ausgestrichen und ca. 4 Tage bei 22° C inkubiert. Die Sporen wurden anschließend mit einigen ml SPB von der Phosphatagar-Platte gewaschen, mit dem gleichen Volumen Glycerol versetzt und bei –80° C eingefroren.

3.3.2 Anlegen von Flüssig-Plattenkulturen

10 ml Ax-Medium in einer Petrischale wurden mit 100 μl der Sporen-Dauerkultur versetzt und 5–7 Tage ohne Schütteln bei 22° C inkubiert, bis sich eine konfluente Schicht amoeboidaler Zellen ausgebildet hatte. Die Flüssig-Plattenkulturen wurden nach einem Monat verworfen, um die Wahrscheinlichkeit von Mutationen zu reduzieren. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, indem das alte Medium vorsichtig vom Rand her abgesaugt wurde, die Platte anschließend mit einigen ml neuen Mediums gewaschen wurde und 10 ml neues Medium hinzugegeben wurden. Platten, welche 2–3 Tage konfluent bewachsen waren, wurden passagiert, indem sie zunächst wie oben angegeben vorsichtig gespült wurden. Anschließend wurden die Zellen mit 4 ml Ax-Medium vom Plattenboden abgelöst, auf 20 ml aufgefüllt und auf zwei Platten aufgeteilt.

3.3.3 Anlegen von Flüssig-Schüttelkulturen

Zur Gewinnung größerer Mengen an *D. discoideum*-Zellen wurden Flüssig-Schüttelkulturen angelegt. Zu diesem Zweck wurden ca. $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml bis $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml in 100 ml Ax-Medium bei 22° C und 150 rpm für ca. 24 h inkubiert. Die Zelldichte bei der Ernte lag bei $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml bis $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml.

3.3.4 Gewinnung der Membranproteinfraktion

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben gewonnen, 10 min bei 4° C und $2000 \times g$ abzentrifugiert und zweimal in kaltem SPB gewaschen, bevor sie in 1 ml SPB resuspendiert wurden. Die Zellen wurden fünf *freeze/thaw*-Zyklen unterworfen (8 min bei –80° C und 6 min bei 37° C). Nach jedem Auftauen wurden die Zellen durch eine Kanüle aufgezogen und somit weiter zertrümmert. Dann wurde wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben der Proteingehalt bestimmt. Um Zelltrümmer abzutrennen, wurde die Probe 15 min bei 4° C und $10.000 \times g$ zentrifugiert. Die Membranproteinfraktion wurde

dann durch Ultrazentrifugation bei $100.000 \times g$ und 4°C über 45 min gewonnen. Das Pellet wurde in $80 \mu\text{l}$ SPB resuspendiert.

3.3.5 Glycosylierungsanalyse des *D. discoideum* AqpB

Zur Untersuchung des Glykosylierungsstatus des *D. discoideum* AqpB wurde zunächst Membranproteinfraktion mit einem Gesamtproteingehalt von 1 mg lyophilisiert. Die chemische Deglykosylierung erfolgte dann mit Hilfe des GLYCOPROFILETMIV CHEMICAL DEGLYCOSYLATION KIT. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 5 % Trichloressigsäure ausgefällt und 10 min bei 4°C und $13.000 \times g$ abzentrifugiert. Das Pellet wurde in $150 \mu\text{l}$ SPB resuspendiert und erneut gefällt. Der Vorgang wurde dann ein drittes Mal wiederholt, um alles Pyridin zu entfernen. Das Pellet wurde erneut resuspendiert, die Probe mit einer geringen Menge Ammoniak neutralisiert und wie unter Abschnitt 3.2.3 beschrieben auf einem SDS-Gel getrennt und anschließend geblottet.

3.4 Zellfreie Proteinsynthese

Die Herstellung aller Komponenten und die Durchführung der zellfreien Proteinsynthese erfolgte in Anlehnung an Schwarz *et al.* 2007 [52].

3.4.1 Herstellung der T7-RNA-Polymerase

Mit jeweils vier von einer frischen LB-Ampicillin-Platte gepickten Klonen wurden vier 5 ml LB-Ampicillin-Kulturen angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. Mit diesen Präkulturen wurden vier 500 ml LB-Ampicillin-Kulturen angeimpft und bei 37°C solange inkubiert, bis eine OD_{600} von 0,6–0,8 erreicht war. Anschließend wurde die Proteinproduktion mittels Zugabe von IPTG induziert und weitere 5 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei $4500 \times g$ abzentrifugiert, in T7-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Aufschluss der in T7-Puffer resuspendierten Zellen erfolgte mittels Hochdruck-Homogenisation in der *French Press* (20.000 Psi, 2 Durchgänge). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand mit 2 % Streptomycinsulfat versetzt. Dieses führte zur Präzipitation der DNA, welche somit nach erneuter Zentrifugation abgetrennt werden konnte. Anschließend erfolgte

die säulenchromatographische Aufreinigung der Proteine, wobei Q-SEPHAROSE[®] als Säulenmaterial verwendet wurde. Dieses wurde in eine 2,5 cm breite und 10 cm hohe Säule gepackt, mit Puffer gespült und mit dem Zellextrakt beladen. Die Elution erfolgte mittels eines NaCl-Gradienten (20–500 mM NaCl). Die aufgefangenen Fraktionen hatten ein Volumen von ca. 12 ml. Von jeder Fraktion der Aufreinigung wurden 200 μ l in eine UV-Licht durchlässige 96-well-Platte pipettiert und im Photometer die jeweiligen Absorptionen bei 280 nm gemessen. Proben mit besonders hoher Absorption und entsprechend hohem Proteingehalt wurden für die Western Blot-Analyse ausgewählt (s. Abschnitt 3.2.4). Diejenigen Fraktionen der Aufreinigung, welche laut Western Blot-Analyse T7-RNA-Polymerase enthielten, wurden gepoolt und die Proteinkonzentration nach Bradford (s. Abschnitt 3.2.2) bestimmt. Um einen Proteingehalt zwischen 4 und 8 mg/ml zu erreichen, wurde die Probe mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Zuletzt erfolgte noch eine Dialyse mit 1 l T7-Dialyse-Puffer, bevor die T7-RNA-Polymerase mit Glycerol versetzt und bei -80°C eingefroren wurde. Die Qualitätskontrolle des Enzyms erfolgte durch einen Magnesium-Screen (s. Abschnitt 3.4.3) mit *GFP*.

3.4.2 Herstellung des S30-*E. coli*-Extraktes

Der S30-*E. coli*-Extrakt dient als Basis für die gesamte zellfreie Proteinsynthese. Die Handhabung aller Medien, Gefäße und Geräte erfolgte unter sterilen Bedingungen, da kein Selektionsantibiotikum eingesetzt werden konnte. Zunächst wurde einmalig der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pRep4 in mehreren Schritten ohne Selektionsdruck in LB-Medium kultiviert, so dass dieser sein Plasmid verlor. Von dem erhaltenen Stamm wurden Dauerkulturen angelegt, die für alle weiteren Extrakte verwendet wurden.

Mit einem von einer frischen LB-Platte gepickten *E. coli*-Klon wurde dann eine 5 ml LB-Mediumkultur hergestellt, welche 8 h bei 37°C und unter Schütteln inkubiert wurde. Mit 0,5 ml dieser Vorkultur wurde eine 50 ml LB-Mediumkultur angeimpft und ca. 14 h inkubiert. Mit diesem Inokulum wurde ein 5 l-Fermenter mit $2\times\text{YPTG}$ angeimpft. Die Fermenter-Parameter wurden so gewählt, dass bei einer Rührerdrehzahl von 500–700 rpm die Sauerstoffsättigung stets über 80 % blieb. Die Sauerstoffelektrode war zuvor kalibriert worden, indem das unbewegte Medium direkt nach dem Autoklavieren als zu 0 % mit Sauerstoff gesättigt definiert wurde, das bei vollem Lufteinstrom und maximaler Rührerdrehzahl (10 vvm, 1000 rpm) durchmischte Medium als zu 100 % mit

Sauerstoff gesättigt. Übermäßige Schaumbildung wurde durch Zugabe von 0,5 ml *Anti-foam* verhindert. Nach Erreichen der gewünschten OD_{600} von 2,5–3 wurde der Ansatz innerhalb von 45 min auf 12° C gekühlt. Für diesen Zweck wurde der gesamte Fermenter in ein Eiswasserbad gestellt und die geräteinterne Kühlung aktiviert. Die Zellen wurden dann bei $8000 \times g$ und 4° C über 10 min pelletiert, das Pellet dreimal mit 150 ml S30-Puffer A gewaschen und schließlich in 110 % (vol/m) S30-Puffer B resuspendiert. Die Zellen wurden mittels *French Press* (20.000 Psi, 2 Durchgänge) aufgeschlossen und zweimal bei $30.000 \times g$ und 4° C über 30 min zentrifugiert, wobei jeweils 2/3 des klaren Überstandes weiterverwendet wurden. Der verbleibende Überstand wurde anschließend mit 400 mM NaCl versetzt und bei 42° C über 45 min inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte eine Dialyse mit zweimal 2,5l S30-Puffer C, dem sich eine weitere Zentrifugation anschloss. Der fertige Extrakt wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80° C gelagert. Die Qualitätskontrolle erfolgte ebenfalls durch Produktion des *GFP* in einem Magnesium-*Screen*.

3.4.3 Analytische zellfreie Proteinsynthese

Zur Überprüfung einer neuen Charge des S30-*E. coli*-Extraktes oder der T7-RNA-Polymerase sowie zur Evaluation der Produktionsbedingungen bei neuen Proteinen (Magnesium-Konzentration, Art des Detergens) wurde eine zellfreie Proteinsynthese im analytischen Maßstab mittels *Continuous-Exchange*-Verfahren durchgeführt. Die hierfür eingesetzten, nach Vorlage von Schneider *et al.* selbst gebauten Reaktionsgefäße [53], hatten ein RM : FM-Verhältnis von 1 : 15 und wurden in eine 24-well Platte gesetzt (s. Abb. 1.4). Beide Kompartimente waren durch eine semipermeable Membran mit einem *Cut-off* von 10–14 kDa voneinander getrennt. Die Tabellen 3.5 und 3.6 geben Auskunft über die eingesetzten Komponenten. Der Ansatz wurde über Nacht bei 30° C und unter Schütteln inkubiert. Alle analytischen Reaktionsansätze wurden stets als Doppelbestimmung durchgeführt.

Im Magnesium-*Screen* wurde die Magnesium-Konzentration zwischen 12 und 20 mM Mg^{2+} variiert. Über die im Detergenzien-*Screen* eingesetzten Detergenzien gibt die Tabelle 3.7 Auskunft.

Tabelle 3.5: Komponenten des *Feeding Mix*

Komponente	Einheit	Konzentration
Aminosäuren	mM	0,55
RCWMDE	mM	1,0
Acetylphosphat	mM	20,0
Phosphoenolpyruvat	mM	20,0
ATP	mM	4,8
GTP, CTP, UTP	mM	3,2
Dithiothreitol	mM	2,0
Folsäure	mg/ml	0,1
COMPLETE	X	1,0
Hepes	M	0,1
EDTA	mM	21
Magnesiumacetat	mM	11,0
Kaliumacetat	mM	130,0
PEG 8000	%	2,0
NaN ₃	%	0,05

Tabelle 3.6: Zusätzliche oder in anderen Mengen eingesetzte Komponenten des *Reaction Mix*

Komponente	Einheit	Konzentration
Aminosäuren	mM	0,5
S30- <i>E. coli</i> -Extrakt	%	35,0
Plasmid	mg/ml	0,015
RIBOLock [®]	U/ μ l	0,3
T7-RNA-Polymerase	U/ μ l	15,0
<i>E. coli</i> -tRNA	mg/ml	0,7
Pyruvat-Kinase	mg/ml	0,08

Tabelle 3.7: Im Detergenzien-*Screen* eingesetzte Substanzen

Detergens	Konzentration (%)
Brij [®] 35	0,2
Brij [®] 58	1,5
Brij [®] 78	0,8
Brij [®] 98	0,2
Digitonin	0,4

3.4.4 Präparative zellfreie Proteinsynthese

Die präparative Herstellung von Proteinen erfolgte im 1–2 ml-Maßstab, wobei SLIDE-A-LYZER[®]DIALYSIS CASSETTES 0,5–3 ML mit einem *Cut-off* von 10 kDa eingesetzt wurden. Die Konzentrationen der Komponenten entsprachen denen in Abschnitt 3.4.3. Das Verhältnis von RM : FM war 1 : 17.

3.5 Sekundärstrukturanalyse zellfrei hergestellter Proteine

3.5.1 In-Gel-Fluoreszenzmessungen

In-Gel-Fluoreszenzmessungen wurden durchgeführt, indem die Proben wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben auf einem SDS-Gel aufgetrennt wurden. Das Gel wurde im LUMI-IMAGER[™]F1 bei 520 nm belichtet und mit der LUMIANALYST Software ausgewertet.

3.5.2 Fluorimeter-Messungen

200 μ l der verdünnten Probe wurden in eine OPTIPLATE[™]-96 pipettiert und im Fluorimeter bei einer Anregungswellenlänge von 475 nm und einer Emissionswellenlänge von 509 nm vermessen.

3.5.3 Sekundärstrukturanalyse von Proteinen mittels Zirkulardichroismus

Zirkulardichroismus-Messungen sind ein besonders wertvolles Instrument, um die Sekundärstruktur von Proteinen zu untersuchen. α -Helicale Proteine zeigen negative Banden bei 208 und 222 nm und eine positive bei 193 nm. β -Faltblatt-Strukturen resultieren in einer negativen Bande bei 218 nm und einer positiven bei 195 nm. Ungeordnete Proteine zeigen eine geringe Elliptizität über 210 nm und eine negative Bande bei 195 nm [86]. Mit Hilfe verschiedener Algorithmen können dann die Anteile der verschiedenen Elemente berechnet werden. Als Referenzen dafür dienen CD-Spektren von Proteinen oder Peptiden, von denen die Kristallstruktur bekannt ist [87]. Mit

modernen CD-Geräten ist es auch möglich, die Probe zu erhitzen und die Denaturierung über die Veränderung der Sekundärstruktur nachzuvollziehen [87]. Der Punkt, an dem die Denaturierung eintritt, wird als Schmelzpunkt bezeichnet. Zusätzlich wird außerdem zu jeder Messung ein sogenanntes *High tension voltage*-Signal (HT-Signal) registriert. Dieses zeigt an, wie stark das CD-Signal verstärkt werden muss. Zeigt die Probe in sehr hohen oder sehr niedrigen Wellenlängenbereichen sehr hohe Absorption oder ändert sie ihr Absorptionsverhalten, zum Beispiel durch Auftreten von Aggregaten, wird dieses im HT-Signal wiedergegeben. Ein reiner Denaturierungsprozess ohne Aggregation des Proteins ist gekennzeichnet durch den Anstieg des CD-Signals, aber nicht des HT-Signals [88, 89].

3.5.4 Durchführung der Zirkulardichroismus-Messungen

Im Gegensatz zur regulären Aufreinigung der Proteine erfolgte diese vor den CD-Messungen ohne einen Detergens-Wechsel zu DDM, um etwaige Einflüsse auf die Sekundärstruktur auszuschließen. Zudem wurde mittels NANODROP[®] SPECTROPHOTOMETER ND-1000 die genaue Proteinkonzentration über die OD₂₈₀ bestimmt. Die CD-Messungen wurden bei Raumtemperatur in einem Wellenlängenbereich von 200–250 nm und bei einer Geschwindigkeit von 5 nm/min durchgeführt. Die Probe befand sich in einer 1 mm-Küvette. Es wurden jeweils 4 Spektren gemittelt und die Spektren der reinen Puffer subtrahiert. Thermische Denaturierung wurde bei einer Wellenlänge von 222 nm im Bereich von 20–95° C gemessen. Auch hier wurden Spektren der reinen Puffer subtrahiert. Die Auswertung erfolgte über die Berechnung der *Mean Residue Ellipticity* bei der Wellenlänge λ ($[\Theta]_{MRW,\lambda}$), wobei zunächst das *Mean Residue Weight* (MRW) berechnet wurde. Die Rohdaten wurden somit auf Proteinkonzentration und -länge bezogen, so dass ein Vergleich möglich war.

$$MRW = M/(N - 1) \tag{3.2}$$

M = Molekulargewicht des Proteins (Da)

N = Anzahl der Aminosäuren

$$[\Theta]_{MRW,\lambda} = MRW \cdot \Theta_\lambda / 10 \cdot d \cdot c \quad (3.3)$$

$[\Theta]_\lambda$ = Elliptizität (Grad)

d = Küvettenlänge (cm)

c = Konzentration des Proteins (g/ml)

3.6 Protein-Rekonstitution in Liposomen

3.6.1 Herstellung von Liposomen

Pro Rekonstitutionsansatz wurden 2,5 mg *E. coli polar lipids* in Diethylether gelöst und ca. 1 h mit Stickstoff begast. Nach Zugabe einiger Glasperlen wurden die Lipide in Rekonstitutionspuffer gelöst und zunächst in 6 Zyklen mit einer Ultraschall-Sonotrode behandelt, wobei die Probe auf Eis gekühlt und mit Stickstoff begast wurde (15 s *on*/45 s *off*). Anschließend erfolgten 3 *freeze/thaw*-Zyklen mit flüssigem Stickstoff. Um die Probe zu homogenisieren, wurde sie letztendlich noch durch eine 200 nm Polycarbonat-Membran extrudiert [90].

3.6.2 Rekonstitution von Proteinen in Liposomen

Das Rekonstitutionsprotokoll ist eine Abwandlung verschiedener, bereits bekannter Methoden [61, 91]. Zunächst wurde die Liposomen-Lösung mit 0,5% TRITONTMX-100 versetzt, um die Liposomen zu destabilisieren. Anschließend wurden auf 1 ml dieser Lösung 250 μ l des gereinigten Proteins (Proteinkonzentration: 1 mg/ml) gegeben und bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken für 30 min inkubiert. Die Detergenzien wurden anschließend durch Zugabe von 2 \times 200 mg zuvor aktivierter BIO-BEADS[®]SM-2 entfernt. BIO-BEADS[®]SM-2 sind makroporöse, polymerische Adsorbentien aus Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer und besitzen eine hohe Oberfläche, die besonders für die Adsorption von TRITONTMX-100, aber auch von anderen Detergenzien, geeignet ist. Die erste Inkubation erfolgte bei 4° C über Nacht, die zweite nur für einige Stunden. Anschließend wurde die Probe erneut durch eine 200 nm Polycarbonat-Membran extrudiert.

3.6.3 Saccharose-Gradienten-Zentrifugation

Die Saccharose-Gradienten-Zentrifugation wurde durchgeführt, um die Effizienz der Rekonstitution zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurden eine 50 μg Protein entsprechende Menge Proteoliposomen in 700 μl Gradienten-Puffer suspendiert und mit 30 % Saccharose versetzt. Diese Mischung wurde in ein Ultrazentrifugations-Röhrchen gegeben und mit 5 weiteren 700 μl -Fraktionen des Puffers mit abnehmenden Saccharose-Konzentrationen überschichtet (25, 20, 15, 5 und 0 %). Der Gradient wurde mit Hilfe eines SW 60 Ti-Schwingrotors bei 4° C und $164.000 \times g$ über 6 h zentrifugiert. Die einzelnen Schichten wurden anschließend sorgsam abpipettiert, das Protein mit 5 % Trichloressigsäure ausgefällt und per Western Blot analysiert. Das Protokoll wurde verändert nach Yakata *et al.* [92].

3.6.4 Größenmessung der Proteoliposomen

Die Größe der Proteoliposomen und Liposomen wurde am ZETASIZER NANO ZS bestimmt. Die Partikelgrößenbestimmung erfolgt hier über die durch die Brown'sche Molekularbewegung hervorgerufene Änderung der dynamischen Lichtstreuung. Der errechnete *Z-Average* gibt den intensitätsgewichteten, durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser des Partikels an. Der hydrodynamische Durchmesser beschreibt den Durchmesser des Partikels samt seiner Hydrathülle. Es ist anzumerken, dass die Intensitätsverteilung keinerlei Aussage über die Massen- oder Anzahlverteilung macht. Zusätzlich wird ein sogenannter Polydispersitätsindex (PDI) ausgegeben, welcher eine Aussage über die Breite der Partikelgrößenverteilung macht. Die unten aufgeführte Tabelle stellt dar, wie die Partikelgrößenverteilung anhand des PDI beurteilt werden kann (s. Tab. 3.8). Ist der PDI größer als 0,7, ist das Partikelkollektiv derart breit verteilt, dass eine Aussage über die Partikelgröße nicht mehr möglich ist. Die Berechnung der Parameter kann dem ISO Standarddokument 13321:1996E entnommen werden. Für die Messung wurde eine 1 cm Plastikkuvette verwendet.

Tabelle 3.8: Beurteilung des PDI

PDI	Verteilung
$\leq 0,05$	Streng monodispers
0,1–0,2	Enge Verteilung
0,2–0,5	Breite Verteilung
0,5–0,7	Sehr breite Verteilung
$\geq 0,7$	Nicht mehr auswertbar

3.7 Funktionstest mittels dynamischer Lichtstreuung

3.7.1 Prinzip der dynamischen Lichtstreuung

Mit Hilfe einer SFM-300 *Stopped-flow*-Apparatur können in einer Zeitspanne von wenigen Millisekunden zwei bis drei Flüssigkeiten in einer Messküvette miteinander vermischt und spektroskopisch vermessen werden. Durch das schnelle Mischen von zum Beispiel Liposomen mit einem hyperosmolaren Puffer kommt es zu einem Schrumpfen der Vesikel. Das im 90° -Winkel eingestrahlte monochromatische Licht einer Xenon/Quecksilber Bogenlampe verändert sich je nach Vesikelgröße in seinem Streuverhalten beim Durchtritt durch die Messküvette. Diese Veränderung wird an einem Photomultiplier registriert und kann mittels der zugehörigen BIO-KINE-Software ausgewertet werden. Für diesen Zweck werden 9 Kurven gemittelt und die Ratenkonstante k mit der Einheit s^{-1} durch einfach oder zweifach exponentielles Kurvenfitting ermittelt. Der vordere Teil der Gleichung ($a \cdot t + b$) beschreibt dabei die lineare Komponente, der hintere Teil die exponentiellen Komponenten.

$$y = a \cdot t + b + \sum_{i=1}^N c_i \cdot e^{-k \cdot t} \quad (3.4)$$

t = Zeit

k = Ratenkonstante

3.7.2 Stopped-flow-Messungen von Proteoliposomen

Zunächst wurden die Proteoliposomen mit dem Rekonstitutionspuffer auf eine Lipid-Konzentration von 0,4 mg/ml verdünnt. Die Proteoliposomen für Glycerolleitfähigkeitsmessungen wurden zudem mit 600 mM Saccharose versetzt. Als Gegenpuffer für die isoosmotischen Glycerolleitfähigkeitsmessungen diente Rekonstitutionspuffer, welcher mit 300 mM Saccharose und 300 mM Glycerol versetzt war. Als Gegenpuffer für die hyperosmotischen Wasserleitfähigkeitsmessungen diente mit 600 mM Saccharose versetzter Rekonstitutionspuffer. Proteoliposomen und entsprechender Gegenpuffer wurden in einem Verhältnis von 1 : 1 und einem Endvolumen von 150–202 μ l miteinander gemischt und bei einer Wellenlänge von 546 nm und einer Temperatur von 10° C vermessen. Für die Auswertung wurden jeweils 9 Kurven gemittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierungsarbeiten

Die genaue Durchführung der Klonierungsarbeiten ist im Abschnitt 3.1 beschrieben. Das *DdAqpB* wurde aus dem pOG2-Vektor amplifiziert und dabei gleichzeitig am 5'-Ende eine *Xho*I-Schnittstelle, sowie am 3'-Ende eine *Bam*H I-Schnittstelle eingefügt. Das Produkt wurde mit Hilfe dieser Schnittstellen zum Zwecke der Sequenzierung in den pBluescript II SK (–)-Vektor und für die zellfreie Proteinsynthese in den pET21a-cHx-Vektor kloniert. Der pET21a-cHx mit einem zehnfachen Histidin-*Tag* wurde uns von Frank Bernhard (Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Die Sequenzierung zeigte Übereinstimmung mit der Original-Sequenz.

Das sich im pDXA-Vektor befindende *DdAqpB-GFP*-Konstrukt wurde mit Hilfe von *Xho*I und *Hind*III partiell verdaut. Dabei erfolgte zunächst ein kompletter Verdau mit *Xho*I, anschließend ein nur 5-minütiger Verdau mit *Hind*III. *Hind*III schneidet sowohl am 3'-Ende als auch am 5'-Ende der *GFP*-Sequenz. Bei einem langen Verdau würde deshalb das Fusionsprotein gespalten werden. Der kurze Verdau ermöglichte, dass neben dem komplett verdauten Konstrukt auch eine geringe Menge an integrem *DdAqpB-GFP* aus dem Vektor herausgeschnitten wurde. Auf dem Agarose-Gel erkennt man den linearisierten Vektor (6156 bp), die *DdAqpB-GFP*-Fusion (1600 bp) und das *DdAqpB* bzw. *GFP* (885 bp)(s. Abb. 4.1). Aufgrund des geringen Größenunterschiedes konnte man *DdAqpB* und *GFP* nicht voneinander trennen. Das Fusionsprotein wurde isoliert und dann in den mit den Enzymen *Hind*III und *Sal*I verdauten pET21a-cHx-Vektor ligiert. Alle weiteren Klonierungsarbeiten wurden durch den Arbeitskreis durchgeführt.

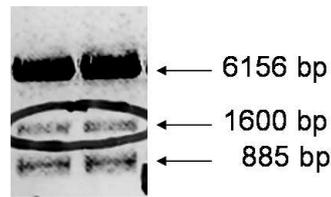


Abbildung 4.1: Agarose-Gel des partiell verdauten *DdAqpB-GFP*/pDXA. Obere Bande: pDXA, mittlere Bande: *DdAqpB-GFP*, untere Bande: *DdAqpB*.

4.2 Etablierung der zellfreien Proteinsynthese

Die kritischen Komponenten bei der zellfreien Proteinsynthese sind der S30-*E. coli*-Extrakt und die T7-RNA-Polymerase. Da die späteren Proteinausbeuten stark von der Qualität des Extraktes und der Polymerase abhängig sind, müssen beide vor ihrem Einsatz auf ihre Effizienz überprüft werden. Dies erfolgte, indem *GFP* als Testprotein bei verschiedenen Magnesium-Konzentrationen (üblicherweise in einem Bereich von 10–20 mM) produziert wurde. Als Kontrolle wurde das *GFP* unter den gleichen Bedingungen mit einem Laborstandard-Extrakt oder einer Laborstandard-Polymerase hergestellt. In diesem Fall wurden als Standards Extrakt und Polymerase von Frank Bernhard (Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Die Reaktionsansätze wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und die Fluoreszenzintensität densitometrisch ausgewertet (Bestimmung der In-Gel-Fluoreszenz, s. Abschnitte 3.2.3 und 3.5.1). Gleichzeitig erhielt man mit dem Magnesium-Screen die für die jeweilige Komponente optimale Magnesium-Konzentration. Da der Magnesiumgehalt einen wesentlichen Einfluss auf das zellfreie Proteinsynthese-System hat [52], wurde vor dem Einsatz jeder neuen Charge Extrakt oder Polymerase, sowie bei der zellfreien Herstellung von neuen Proteinen, dieser Screen durchgeführt.

Es ist anzumerken, dass die unterschiedlichen Extrakte in Kombination mit jeweils anderen Chargen T7-RNA-Polymerase verschiedene Magnesium-Optima aufwiesen. Da im Laufe dieser Arbeit mit verschiedenen Chargen T7-RNA-Polymerase und S30-*E. coli*-Extrakt gearbeitet wurde, sind bezüglich der Magnesium-Optima wechselnde Angaben zu finden.

4.2.1 Herstellung und Kontrolle der T7-RNA-Polymerase

Herstellung

Das Lysat der T7-RNA-Polymerase produzierenden *E. coli*-Zellen wurde wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben mittels Kationenaustauscher-Chromatographie aufgereinigt. Die photometrische Bestimmung der erhaltenen Fraktionen zeigte deutliche Unterschiede im Proteingehalt. Beispielhaft sind hier die Werte der ersten 65 Fraktionen abgebildet (s. Abb. 4.2). Diejenigen Fraktionen, deren Absorption höher war als 0,2, wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt.

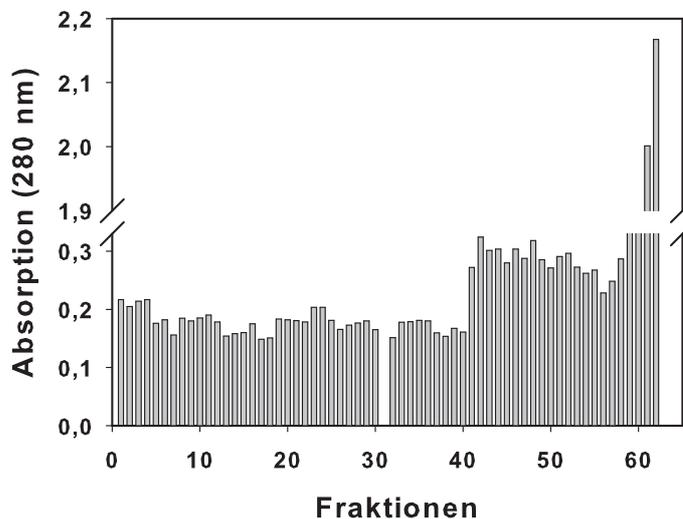


Abbildung 4.2: Absorption der Fraktionen der säulenchromatographischen Aufreinigung der T7-RNA-Polymerase bei 280 nm.

Die ausgewählten Fraktionen wurden mittels Western Blot-Analyse auf ihren Gehalt an T7-RNA-Polymerase untersucht (s. Abb. 4.3). Fraktionen mit positivem Nachweis wurden gepoolt, aufkonzentriert und dialysiert.

Kontrolle

Es wurde wie in Abschnitt 3.4.3 dargelegt ein Magnesium-Screen (18–22 mM Magnesium) mit der neuen und der Laborstandard-T7-RNA-Polymerase durchgeführt. Die entstandenen Reaktionsprodukte wurden per SDS-PAGE getrennt und die In-Gel-Fluoreszenz bestimmt. Die Signalintensitäten zeigten, dass die neue T7-RNA-

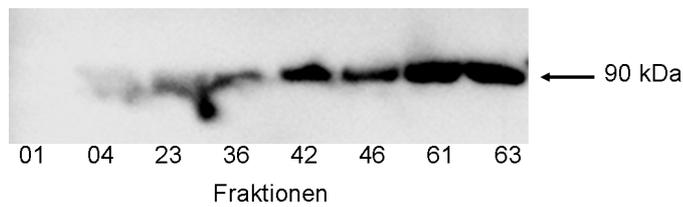


Abbildung 4.3: Beispielhafter Western Blot mit verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung. Die ersten Fraktionen enthalten keine oder kaum T7-RNA-Polymerase, in allen anderen Fraktionen ist das Enzym in verschiedenen Konzentrationen nachweisbar. Detektion durch T7-RNAP-AK.

Polymerase sogar zu etwas höheren Ausbeuten an *GFP* führte als der Standard (s. Abb 4.4). Desweiteren ergab sich in dem untersuchten Bereich für beide Polymerasen die gleiche optimale Magnesium-Konzentrationen von 18 mM. Da alle anderen Reaktionszusätze identisch waren, konnte man daraus schließen, dass sich der Magnesiumgehalt der neuen und der alten T7-RNA-Polymerase entsprachen. In Bezug auf den 18 mM-Ansatz besaß die neu hergestellte T7-RNA-Polymerase 111 % der Effizienz der Laborstandard-T7-RNA-Polymerase (s. Tab. 4.1).

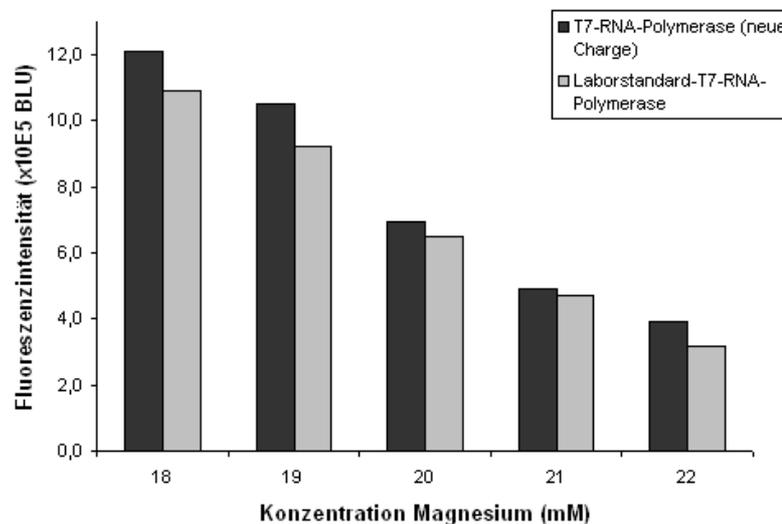


Abbildung 4.4: Vergleichender Magnesium-Screen einer neuen Charge T7-RNA-Polymerase mit den Laborstandard. Als Testprotein wurde *GFP* hergestellt.

Tabelle 4.1: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der oben gezeigten T7-RNA-Polymerasen bei der jeweils optimalen Magnesium-Konzentrationen von 18 mM

T7-RNA-Polymerase	Fluoreszenzintensität (BLU)
Laborstandard-T7-RNA-Polymerase	$1,09 \cdot 10^7$
Neue Charge der Polymerase	$1,21 \cdot 10^7$

4.2.2 Herstellung und Kontrolle des S30-*E. coli*-Extraktes

Überprüfung der *E. coli*-Kultur und der Fermenterbedingungen

Bevor der Extrakt wie in Abschnitt 3.4.2 angegeben hergestellt wurde, wurde zunächst die BL21-Kultur bis zur stationären Phase kultiviert. Die erhaltene Wachstumskurve (s. Abb. 4.5) gab Aufschluss darüber, dass die Fermenter-Parameter optimal gewählt waren (Generationszeit der Zellen 20–30 min) und darüber, wann ein Ernten der Zellen sinnvoll wäre. Der Erntezeitpunkt sollte in der logarithmischen Phase liegen, da die Zellen hier sehr viele Ribosomen und Translationsfaktoren produzieren. In der stationären Phase wurde eine OD_{600} von ca. 20 erreicht.

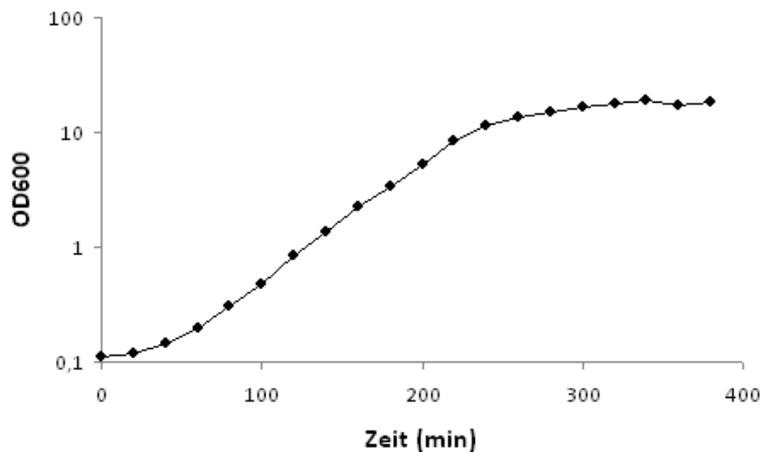


Abbildung 4.5: Logarithmisch dargestellte Wachstumskurve der BL21-Kultur.

Herstellung des Extraktes

Bei der S30-*E. coli*-Extrakt-Herstellung haben sich folgende Parameter als kritisch erwiesen: Um einen hochwertigen Extrakt zu erhalten, musste zunächst eine optimale Sauerstoffversorgung während der Wachstums- vor allem aber auch während der Kühlphase gewährleistet sein. Das Kühlen der Zellen musste zügig innerhalb der angegebenen Zeit erfolgen. Auch nach der Pelletierung der Zellen war es wichtig, stets eine ausreichende Kühlung sicherzustellen. Ein weiterer kritischer Schritt war das Abpipettieren des klaren Überstandes nach der Zentrifugation. Dies musste sehr vorsichtig geschehen, vor allem ohne die oben aufschwimmenden Lipide mitzuerfassen. Unter Berücksichtigung dieser Parameter erhielt man ein 25–30 g schweres Zellpellet, welches letztendlich zwischen 12 und 15 ml Extrakt lieferte.

Kontrolle des Extraktes

Der fertige S30-*E. coli*-Extrakt wurde ebenfalls, zusammen mit dem Laborstandard-Extrakt, einem Magnesium-*Screen* unterzogen. Auch hier zeigte sich eine Übereinstimmung der Magnesium-Optima (12 mM). Ein Vergleich dieser Ansätze zeigte, dass der neue Extrakt ca. 36 % der Effizienz des Standard-Extraktes besaß (s. Tab. 4.2). Eine höhere Effizienz wäre wünschenswert gewesen, jedoch wurde diese Charge als knapp ausreichend befunden. Später hergestellte Extrakte besaßen meist eine bessere Qualität.

Tabelle 4.2: Vergleich einer neuen Charge des S30-*E. coli*-Extraktes mit dem Laborstandard-Extrakt. Angabe der Fluoreszenzintensitäten bei den jeweils optimalen Magnesium-Konzentrationen von 12 mM

	Fluoreszenzintensität (BLU)
Laborstandard-S30- <i>E. coli</i> -Extrakt	$3,56 \cdot 10^6$
Neue Charge des S30- <i>E. coli</i> -Extraktes	$1,29 \cdot 10^6$

4.2.3 Evaluierung der Expressionsvektoren

Für das zellfreie Proteinsynthese-System stehen mehrere Vektoren zur Verfügung. Die am häufigsten eingesetzten sind die pET21- und die pIVEX-Familie. Die *Multiple Cloning Site* des pIVEX2.3, welche zuvor nur die Schnittstellen *Nco* I und *Sma* I enthielt,

wurde in unserem Labor um einige weitere Restriktionsschnittstellen erweitert und daraus der pIVEX2.3w erhalten. Der entsprechende Ausschnitt aus der Plasmidkarte ist in Abb. 4.6 dargestellt. Die Vektoren wurden mittels *GFP*-Produktion verglichen. Der Vergleich zeigte, dass beide Vektoren sehr ähnlich hohe Ausbeuten an *GFP* lieferten.

Tabelle 4.3: Vergleich der Vektoren pET21a-cHx und pIVEX2.3w durch Produktion von *GFP* unter denselben Bedingungen und Messung der Fluoreszenzintensität.

Vektor	Fluoreszenzintensität (BLU)
pET21a-cHx	$7,5 \cdot 10^5$
pIVEX2.3w	$8,1 \cdot 10^5$

4.3 Untersuchung des Glykosylierungs-Status von *DdAqpB*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das *DdAqpB* aus dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* untersucht werden. Das Protein war im Arbeitskreis schon funktionell charakterisiert worden [39]. Es blieb jedoch die Frage ungeklärt, ob das *DdAqpB* *in vivo* in glykosylierter Form vorliegt. Der Western-Blot der Membranproteinfraction legte diesen Verdacht nahe, da neben der erwarteten Bande auf Höhe von 31 kDa eine zweite Bande auf Höhe von 38 kDa auftrat (s. Abb. 4.7). Vorangegangene Versuche zum Nachweis einer N-Glykosylierung mit N-Glykosidase waren erfolglos gewesen [93]. Es boten sich deshalb folgende zwei Versuche an: Einerseits sollte das Protein im zellfreien Proteinsynthese-System hergestellt werden. Das *E. coli*-basierte System ist zu keinerlei posttranslationalen Modifikationen in der Lage [52], dementsprechend würde hier nur das Auftauchen einer einzelnen Bande auf Höhe von 31 kDa erwartet. Desweiteren sollte eine chemische Deglykosylierung der Membranproteinfraction mit TFMS durchgeführt werden. TFMS spaltet sowohl N- als auch die selteneren O-glykosidischen Bindungen [94].

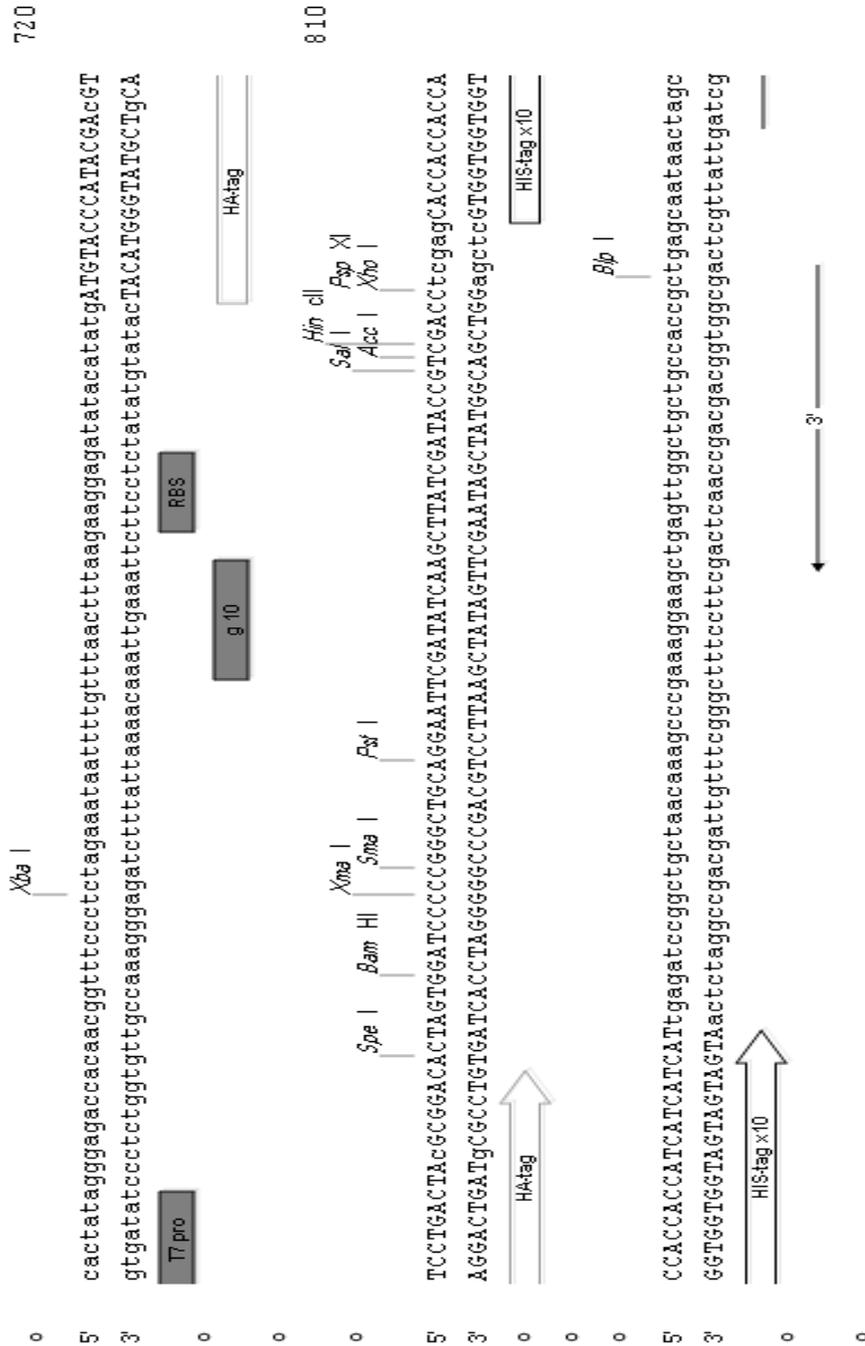


Abbildung 4.6: *Multiple Cloning Site* des pIVEX2.3w. Neben den Schnittstellen kann der Karte entnommen werden, wo sich der N-terminale HA-Tag und der C-terminale Histidin-Tag befinden.

4.3.1 Vergleich *in vivo*- und *in vitro*-DdAqpB

Zunächst wurde aus einer *D. discoideum*-Kultur wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben die Membranproteinfraktion gewonnen und anschließend geblottet (s. Abschnitt 3.2.4). Der zum Blotten eingesetzte Antikörper α N20-34 war spezifisch gegen eine Sequenz des N-Terminus gerichtet. Im Blot zeigte sich außer den Banden bei 31 und 38 kDa noch eine weitere Bande bei 90 kDa (s. Abb. 4.7). Es konnte jedoch im Arbeitskreis nachgewiesen werden, dass es sich bei dieser um eine, in einigen Fällen auftauchende, unspezifische Bande des Primärantikörpers handelte [93].

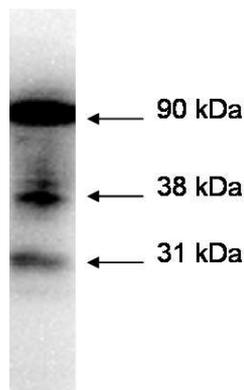


Abbildung 4.7: Nachweis von *DdAqpB* in der Membranproteinfraktion von *D. discoideum*. Detektion durch α N20-34-AK.

Dasselbe Protein wurde anschließend im zellfreien Proteinsynthese-System hergestellt, gleichzeitig wurde ein Magnesium-Screen (15–19 mM Mg^{2+}) durchgeführt. Da an das Protein ein C-terminaler Oligo-Histidin-Tag angefügt war, konnte es mit dem RGS-anti His-Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden. Abgesehen von der 15 mM Mg^{2+} -Fraktion wurden hohe Proteinausbeuten erhalten. Wie erwartet erschien bei 31 kDa eine Bande. Auffälligerweise erschien auch hier eine zweite Bande, jedoch mit 20 kDa deutlich unter der 31 kDa-Bande (s. Abb. 4.8).

Es konnte also zunächst gezeigt werden, dass bei der *in vitro* Synthese keine 38 kDa-Bande auftrat. Dies war ein Hinweis auf eine mögliche Glykosylierung.

Was die unerwartete 20 kDa-Bande betraf, wurde vermutet, dass es sich hierbei um falsch gefaltetes Produkt handeln könnte. Da das *DdAqpB* ein Membranprotein ist, aggregiert es im zellfreien Proteinsynthese-System, wenn kein Zusatz von Detergenzien oder anderen Stabilisatoren erfolgt [52]. Es ist gut möglich, dass dabei in diesem

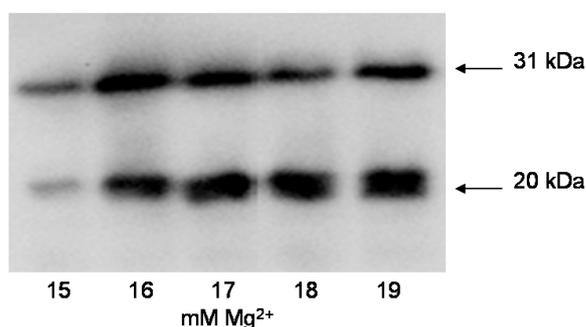


Abbildung 4.8: Western Blot des *in vitro* bei verschiedenen Magnesium-Konzentrationen hergestellten *DdAqpB*. Detektion durch RGS-anti His-AK.

Fall neben dem korrekt gefalteten Protein auch falsch gefaltetes Produkt anfiel. Es ist anzumerken, dass alle Proteine bei der Behandlung im SDS-Ladepuffer für die SDS-PAGE denaturieren. Dabei muss man bedenken, dass eine Denaturierung selten eine völlige Zerstörung der Proteinstruktur bedeutet. Meist sind nur einige Prozent des Proteins falsch gefaltet und die ursprüngliche Faltung ist häufig noch zu erkennen. Es ist dementsprechend trotz denaturierender Behandlung im Ladepuffer möglich, zuvor verschieden gefaltete Proteinspezies im Western Blot zu erkennen [82].

Um der Frage der Faltung weiter auf den Grund zu gehen, wurde das *DdAqpB* wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben in Anwesenheit verschiedener Detergenzien hergestellt. Ein Kontrollversuch erfolgte ohne Detergens. Da die vielen Detergenzien sehr unterschiedliche Effekte auf die Löslichkeit von Membranproteinen und auch auf deren Ausbeute haben können, ist es stets sinnvoll, zunächst verschiedene Detergenzien auf ihre Eignung zu untersuchen [62]. Der Western Blot des Detergenzien-Screens bestärkte die Vermutung, dass es sich bei der 20 kDa Bande um falsch gefaltetes Protein handeln könnte. Bei allen vier Detergenzien trat jeweils nur die obere Bande auf. In der Kontrolle ohne Detergenzienzusatz war sogar nur die untere Bande sichtbar (s. Abb. 4.9).

Da nach Erhalt dieses Western Blots großes Interesse daran bestand, der Natur der unteren Bande auf den Grund zu gehen, wurde beschlossen, mittels C-terminaler *GFP*-Fusion zu ermitteln, ob es sich tatsächlich um falsch gefaltetes Protein handelte. Die in diesem Rahmen durchgeführten Versuche werden in den folgenden Kapiteln dargestellt (s. Abschnitt 4.4).

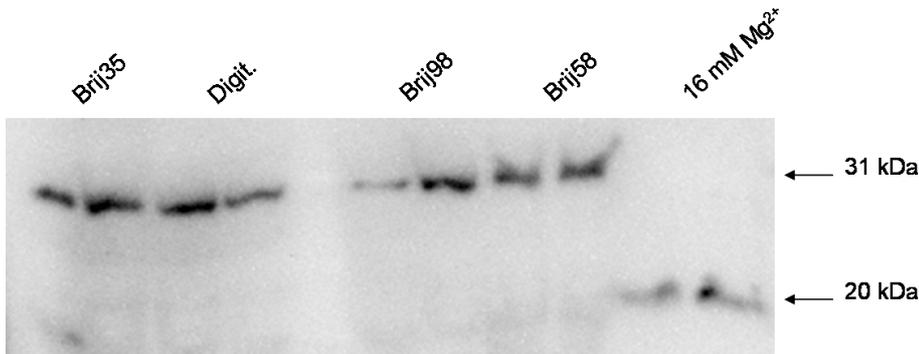


Abbildung 4.9: Western Blot des *in vitro* Detergenzien-Screens des *DdAqpB*. Detektion durch RGS-anti His-AK.

4.3.2 Chemische Deglykosylierung von *DdAqpB*

Um die aus dem vorangegangenen Versuch bestärkte Vermutung der Glykosylierung des *DdAqpB* in der Membranproteinfraktion zu klären, wurde eine chemische Deglykosylierung mit TFMS durchgeführt, welche N- und O-Glykoside spaltet (s. Abschnitt 3.3.5) [95]. Als Kontrolle diente Membranproteinfraktion, welche, abgesehen von der Behandlung mit TFMS und der anschließenden Neutralisation, der gleichen Prozedur unterworfen wurde. Der Blot zeigte sehr deutlich die starke Abnahme der 38 kDa-Bande. Dafür trat die 31 kDa-Bande viel stärker hervor (s. Abb. 4.10). Da eine N-Glykosylierung des Proteins zuvor ausgeschlossen werden konnte [93], konnte nun vermutlich gezeigt werden, dass eine O-Glykosylierung des *DdAqpB* vorlag. Mit Hilfe des DICTYOLYIC 1.1-Servers der Technischen Universität Dänemarks wurde eine O-Glykosylierungsvorhersage für das *DdAqpB* gemacht. Diese ergab, dass am Serin 75 oder am Serin 244 eine Glykosylierung möglich wäre.

Es ist anzumerken, dass neueste Ergebnisse aus dem Arbeitskreis Zweifel an der Spezifität des Antikörpers aufkommen ließen, da ein *DdAqpB-Knockout* in *D. discoideum* weiterhin die 38 kDa-Bande im Western Blot zeigte. Die 31 kDa-Bande jedoch war erwartungsgemäß verschwunden. Eventuell wurde die Spezifität des Antikörpers also nur unzureichend festgestellt und eine Glykosylierung muss in Frage gestellt werden.

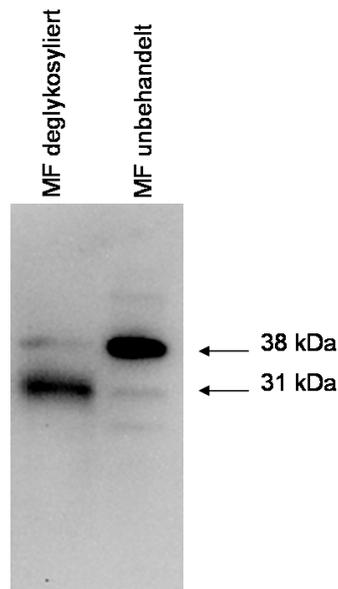


Abbildung 4.10: Western Blot der mit TFMS behandelten und unbehandelten *Dd*-Membranproteinfraktion (MF). Durch die Abnahme der 38 kDa-Bande nach der TFMS-Behandlung wird deutlich, dass das *DdAqpB* wahrscheinlich glykosyliert vorliegt. Detektion durch α N20-34-AK.

4.4 C-terminale *GFP*-Fusion als Faltungskontrolle

Wie schon in Abschnitt 4.3.1 erwähnt, sollte mittels C-terminaler *GFP*-Fusion überprüft werden, ob bei der zellfreien Herstellung von *DdAqpB*, je nach Reaktionszusatz, unterschiedlich gefaltete Proteinspezies entstehen.

Das sich im pET21a-cHx-Vektor befindene *DdAqpB-GFP* wurde zunächst ohne den Zusatz von Detergenzien in einem Magnesium-*Screen* untersucht. Jedoch wurde kein Produkt erhalten. Der anschließend durchgeführte Detergenzien-*Screen* zeigte zwar auf der erwarteten Höhe von 58 kDa ein Signal im Western Blot, jedoch war im SDS-Gel keinerlei Fluoreszenz detektierbar (s. Abb. 4.11). Dies bedeutet, dass wahrscheinlich nur falsch gefaltetes Produkt erhalten wurde. Die fluoreszierende Bande auf Höhe von 27 kDa war vermutlich unabhängig vom Fusionsprotein produziertes *GFP*. Dies ist möglich, weil die AUG-Startsequenz des *GFP* im Vektor noch vorhanden war.

In Anbetracht der Tatsache, dass nun vermutlich auch im Magnesium- und Detergenzien-*Screen* mit dem unfusionierten Protein ausschließlich nicht korrekt gefaltetes Protein entstanden war, musste die Natur der 20 kDa-Bande im Magnesium-*Screen*

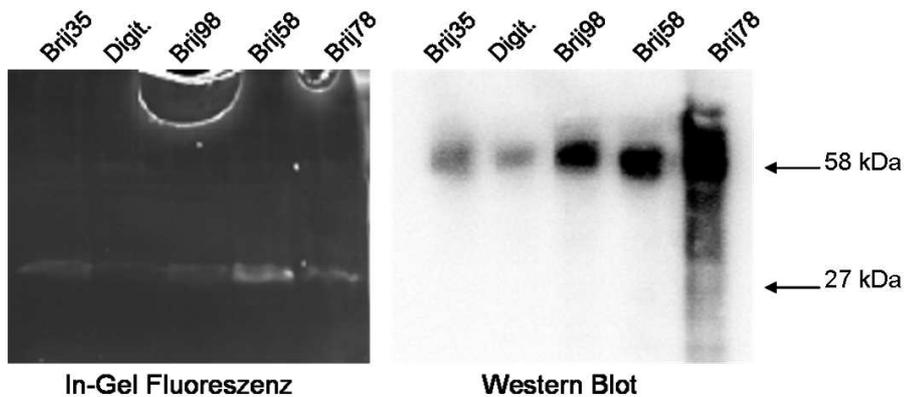


Abbildung 4.11: *DdAqpB-GFP* Detergenzien-Screen. Links: In-Gel-Fluoreszenz des SDS-Gels. Rechts: Western Blot. Detektion durch α N20-34-AK.

neu überdacht werden. Es wurde daher vermutet, dass es sich bei der unteren Bande um ein Abbruchprodukt des *DdAqpB* handelte. Vom C-Terminus ausgehend würde ein 20 kDa-Protein einen Bruch im *Loop B* bedeuten.

Um diese These zu überprüfen, wurde das zellfrei hergestellte *DdAqpB* zusätzlich mit dem gegen den N-Terminus gerichteten Antikörper α N20-34, mit welchem auch schon das *in vivo*-Protein nachgewiesen wurde, geblottet. Der Blot zeigte deutlich die erwartete *DdAqpB*-Bande auf Höhe von 31 kDa. Zusätzlich war auch hier eine Bande weiter unten detektierbar, jedoch deutlich unter der 20 kDa-Marke (s. Abb. 4.12). Eine Extrapolation der Markerbanden ergab eine etwaige Höhe von 8 kDa. Dieser Wert war nur eine grobe Schätzung, da der Marker erst bei 19 kDa begann. Der Unterschied zur 20 kDa-Bande jedoch war deutlich genug, um feststellen zu können, dass es sich hier höchstwahrscheinlich um den N-terminalen Teil des *DdAqpB* handelte. Es konnte also nachgewiesen werden, dass es zu einer Zerstörung des Proteins kam, wenn keine Detergenzien in den Reaktionsansatz gegeben wurden.

Die Erkenntnis, dass offensichtlich auch ein Produkt auf der richtigen Höhe nicht unbedingt bedeuten muss, dass korrekt gefaltetes Protein entstanden ist, war Anlass, das *GFP*-Faltungskontrollsystem an einem anderen Protein zu testen. Es bot sich dafür das Aquaporin aus *Plasmodium falciparum* (*PfAQP*) an. Das *PfAQP* ist im Gegensatz zu dem *DdAqpB* bereits gut charakterisiert [30] und im Arbeitskreis schon vielfältig untersucht worden [96–100]. Das sich im pIVEX2.3wGFPc-Vektor befindende *PfAQP*-

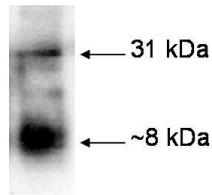


Abbildung 4.12: *In vitro* hergestelltes *DdAqpB*. Detektion durch α N20-34-AK.

GFP wurde ebenso, zunächst ohne den Zusatz von Detergenzien, in einem Magnesium-*Screen* untersucht. Auch hier wurde kein Produkt erhalten. Ein Detergenzien-*Screen* zeigte jedoch folgende Ergebnisse (s. Abb. 4.13):

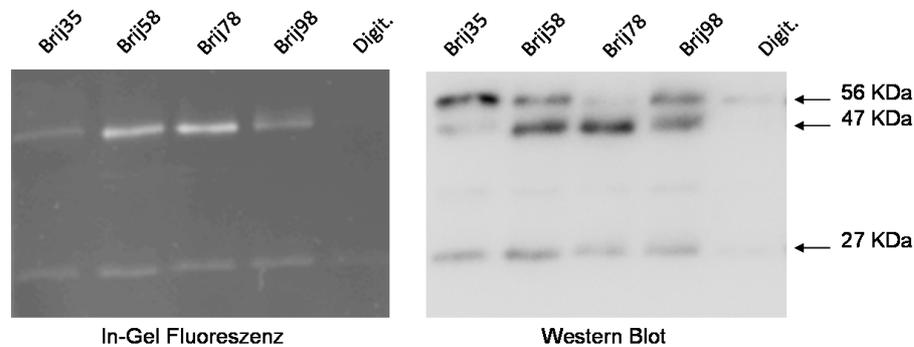


Abbildung 4.13: *PfAQP-GFP* Detergenzien-*Screen*. Links: In-Gel-Fluoreszenz des SDS-Gels. Rechts: Western Blot mit einem Antikörper gegen das *GFP* (*GFP* (FL)-AK).

Wurde zunächst die In-Gel-Fluoreszenz der Reaktionsprodukte betrachtet, fiel auf, dass die Fluoreszenzintensitäten sehr unterschiedlich waren. Das bedeutet, dass die Ausbeuten an vermutlich korrekt gefaltetem Protein sehr stark variierten, je nachdem welches Detergens zugesetzt wurde. Während zum Beispiel Brij[®]78 eine stark fluoreszierende Bande lieferte, zeigte Brij[®]35 weniger vielversprechende Ergebnisse. Zusätzlich tauchte auch hier in allen Ansätzen die fluoreszierende Bande auf Höhe von 27 kDa auf. Abgesehen von unabhängig produziertem *GFP*, könnte es sich in diesem Fall zusätzlich um ein Spaltprodukt des Fusionsproteines handeln. Dass es sich bei der oberen, fluoreszierenden Bande nicht um das *GFP*-Dimer handelte, wurde nachgewiesen, indem außer dem Western Blot mit dem anti-*GFP*-Antikörper, ein zusätzlicher Blot mit einem Antikörper gegen den N-terminalen *HA-Tag* durchgeführt wurde. Die-

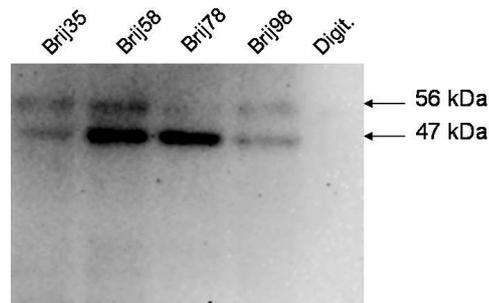


Abbildung 4.14: Western Blot des *PfAQP-GFP* Detergenzien-*Screens* mit einem Antikörper gegen den N-terminalen HA-*Tag* (HA 12CA5-AK).

ser zeigte deutlich das gleiche Muster wie der des obigen Western Blots, die untere *GFP*-Spur tauchte jedoch erwartungsgemäß nicht auf (s. Abb. 4.14).

Desweiteren war im Western Blot der Abbildung 4.13 klar zu sehen, dass die fluoreszierenden Banden auf Höhe von 47 kDa im SDS-Gel auch hier mit den entsprechenden Signalintensitäten auftauchten. Jedoch wurde nun auch deutlich, dass die Banden eigentlich als Doppelbanden auftraten, mit einem weiteren Reaktionsprodukt auf Höhe von 56 kDa. Dieses Phänomen wurde auch schon bei Geertsma *et al.* 2008 beschrieben [82]. Dort konnte nachgewiesen werden, dass korrekt und falsch gefaltete Spezies desselben Proteins unterschiedliche Laufhöhen im SDS-Gel haben können.

Es ist erkennbar, dass bei allen BRIJ[®]-Reagenzien in etwa die gleichen Mengen an Gesamtprotein erzeugt wurden, die unterschiedlichen Detergenzien jedoch maßgeblich zu beeinflussen schienen, ob dieses auch fluoreszierte (s. Tab 4.18). Alleine das Digitonin hat in diesem Fall nur zu extrem geringen Mengen an *PfAQP* geführt, zudem lieferte es vermutlich nur falsch gefaltetes Protein.

4.5 Etablierung einer schnellen *in-situ* Faltungskontrolle für zellfreie Proteinsynthese-*Screenings*

Bestandteil dieses Kapitels war es nun, zu prüfen, ob tatsächlich abhängig von dem zugesetzten Detergens unterschiedliche Proteinfaltungen entstehen. Desweiteren sollte

getestet werden, ob sich die *GFP*-Fusion nutzen lässt, um Reaktionsbedingungen, wie zum Beispiel die Eignung von Detergenzien, im zellfreien Proteinsynthese-System im *High-Throughput*-Verfahren zu evaluieren.

Dafür wurde zuerst die These der Detergens-abhängigen Faltung mittels Zirkulardichroismus geprüft. Auch musste natürlich der Nachweis erbracht werden, dass die Bedingungen, die für das Fusionsprodukt gelten, auch auf das nichtfusionierte Protein übertragbar sind. Ebenso sollte gezeigt werden, dass die Produktionsbedingungen, welche beim *GFP*-fusionierten Protein zur Fluoreszenz führen, beim nichtfusionierten Protein zur Funktionalität führen. Für die Anwendung im *High-Throughput*-Verfahren musste eine schnelle Auswertung der Fluoreszenzintensitäten direkt im Reaktionsansatz möglich sein. Eine aufwendige In-Gel-Fluoreszenzmessung ist für Schnellverfahren ungeeignet. Es wurde deshalb versucht, den Reaktionsansatz direkt im Fluorimeter zu vermessen.

4.5.1 Sekundärstrukturanalyse des zellfrei hergestellten *PfAQP*s

Um dem Hinweis auf Unterschiede in der Faltung genauer nachzugehen, wurde eine Sekundärstruktur-Analyse mittels Zirkulardichroismus (CD) von, in verschiedenen Detergenzien zellfrei hergestelltem, *PfAQP* vorgenommen (s. Abschnitt 3.5.3). Die Sequenz befand sich im pIVEX2.3w-Vektor. Als Detergenzien wurden BRIJ[®]35 und BRIJ[®]78 ausgewählt, weil sie beim Fusionsprotein in etwa gleiche Proteinmengen lieferten, beim BRIJ[®]78 jedoch hauptsächlich die untere, fluoreszierende Bande auftrat, beim BRIJ[®]35 hauptsächlich die obere, nicht fluoreszierende Bande. Dass es legitim ist, von mit dem Fusionsprotein erhaltenen Ergebnissen auf das unfusionierte Protein zu schließen, wird in Abschnitt 4.5.2 dargelegt. Abgesehen von den Detergenzien, wurde in zwei ansonsten identischen, präparativen Reaktionsansätzen das Protein hergestellt. Anschließend wurden die Ansätze aufgereinigt, der jeweilige Proteingehalt bestimmt und die Proben dann einer CD-Analyse unterzogen.

Das erhaltene Spektrum zeigte zunächst vor allem beim in BRIJ[®]78 produzierten *PfAQP* die typische W-Form α -helicaler Proteine mit den negativen Banden bei 208 und 222 nm (s. Abb. 4.15) [86, 87]. Bei dem in BRIJ[®]35 hergestellten *PfAQP* waren diese Banden weit weniger deutlich. Das Spektrum ähnelte eher einer Mischung aus α -Helix- und β -Faltblatt-Anteilen wie es auch bei Chow *et al.* 2003 gezeigt wurde [101]. Eine genaue Aussage über die Anteile von α -Helix und β -Faltblatt war allerdings auf-

grund der geringen Reichweite des Spektrums nicht möglich. Ein Vergleich mit den Werten der Kristallstruktur wurde deshalb nicht durchgeführt [30]. Trotz allem wurde im Bereich zwischen 210 nm und 225 nm ein Unterschied zwischen dem in BRIJ[®]35 und dem in BRIJ[®]78 produzierten *Pf*AQP deutlich.

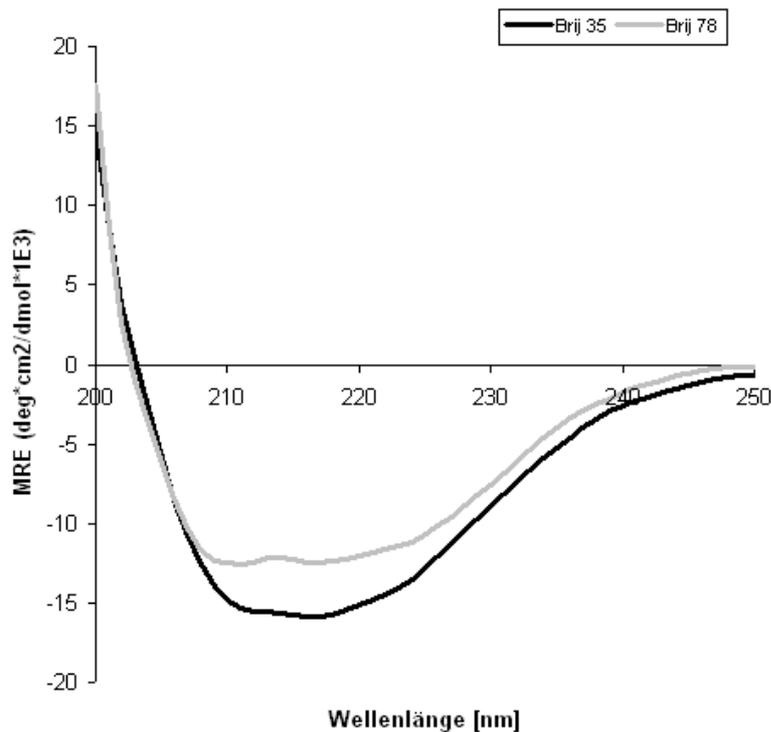


Abbildung 4.15: CD-Spektren von *Pf*AQP, welches in den Detergenzien BRIJ[®]35 und BRIJ[®]78 hergestellt wurde.

Einen wirklichen Aufschluss über die Strukturunterschiede hingegen gab die thermische Denaturierungs-Analyse (s. Abb. 4.16). Hier wurde bei einer festen Wellenlänge von 222 nm die Veränderung der *Mean Residue Ellipticity* über eine bestimmte Temperaturspanne gemessen. Das in BRIJ[®]78 produzierte *Pf*AQP zeigte eine für Membranproteine normale, sigmoidale Schmelzkurve, die zudem derjenigen des *humanen* AQP10 sehr ähnelte. Die dort erreichte Schmelztemperatur von ca. 55° C lag nahe der hier nachgewiesenen Schmelztemperatur des *Pf*AQP von ca. 53° C [102]. Das in

BRIJ[®]35 produzierte *PfAQP* zeigte keine eindeutige Schmelzkurve. Betrachtete man das HT-Signal, war erkennbar, dass es genau dort, wo das CD-Signal anstieg ($\approx 80^\circ\text{C}$), auch einen Anstieg zeigte. Dies war ein Hinweis auf eine eingetretene Trübung der Probe und damit Zeichen einer möglichen Aggregation (s. Abschnitt 3.5.3). Der Denaturierungsprozess an sich führt nicht zu einer Trübung der Probe und somit nur zu einer Änderung des CD-Signals [88, 101]. Es kann somit festgehalten werden, dass in BRIJ[®]78 produziertes *PfAQP* ein für ein richtig gefaltetes Membranprotein normales Verhalten bei der thermischen Denaturierung zeigte. In BRIJ[®]35 hergestelltes *PfAQP* jedoch ließ keinen Denaturierungsprozess erkennen, sondern gab ausschließlich Hinweise auf eine Aggregation des Proteins ab $\approx 80^\circ\text{C}$, die bei dem in BRIJ[®]78 produziertem Protein ebenfalls erkennbar waren. Ein Einfluss des Detergens auf die Faltung von *PfAQP* konnte hier eindeutig gezeigt werden.

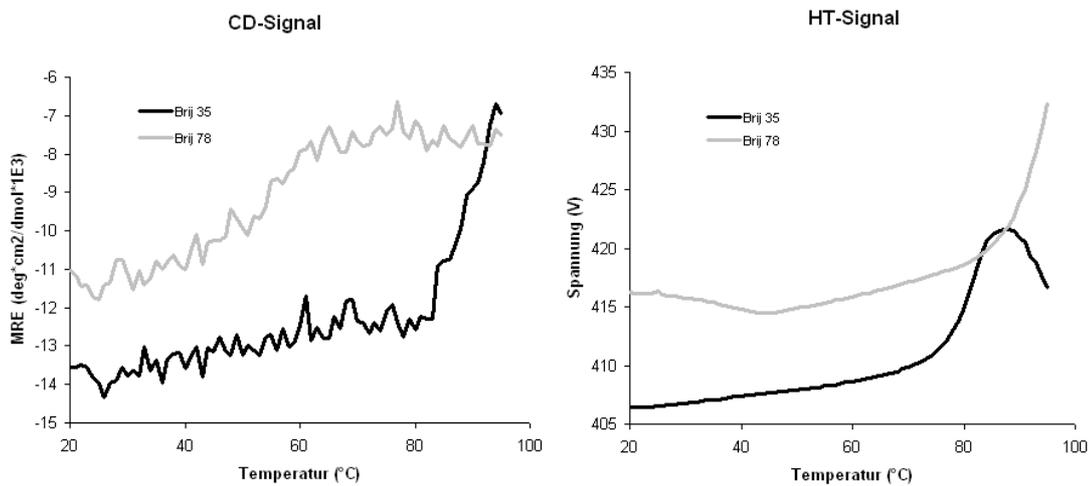


Abbildung 4.16: CD- und HT-Signal von in BRIJ[®]35 und in BRIJ[®]78 produziertem *PfAQP* über einen Temperaturbereich von 20–95°C und bei einer konstanten Wellenlänge von 222 nm. In BRIJ[®]78 hergestelltes *PfAQP* zeigt eine sigmoide Schmelzkurve mit einem Schmelzpunkt bei 53°C. Bei in BRIJ[®]35 produziertem *PfAQP* ist erst ab $\approx 80^\circ\text{C}$ ein Anstieg im CD-Signal erkennbar, welcher mit einem Anstieg im HT-Signal zusammenfällt. Das HT-Signal weist auf eine Proteinaggregation hin.

4.5.2 Anwendbarkeit auf das nicht fusionierte Protein

Für das Funktionieren dieser *Screening*-Methode ist es essentiell, dass die mit dem *GFP*-Fusionsprotein erhaltenen Parameter auch für das nicht fusionierte Protein gelten. Entsprechend wurde das *PfAQP* einem Detergenzien-*Screen* unterworfen und dieser mit dem des Fusionsproteins verglichen. Da bei dem nicht fusionierten Protein keinerlei Fluoreszenzmessung möglich war, mussten wir uns allein auf den Vergleich der Proteinausbeuten stützen. Der Western Blot des *PfAQP* zeigte erwartungsgemäß ein sehr ähnliches Signalmuster wie das Fusionsprotein (s. Abb. 4.17 und Abb. 4.18). Die gute Korrelation wurde auch durch einen Korrelationskoeffizienten von $R = 0,925$ bestätigt (s. Abb. 4.19). Ob sich nicht nur die Gesamtproteinmengen entsprachen, sondern auch die Anteile an richtig gefaltetem Protein, war leider nicht nachweisbar. Jedoch gab es einen Hinweis: Bei dem Fusionsprotein zeigten die Ansätze mit den Detergenzien BRIJ[®]58 und BRIJ[®]78 die stärkste Fluoreszenz. Bei dem nicht fusionierten Protein zeigte sich in eben diesen Ansätzen die höchste Menge an Dimer, welches offensichtlich auch nach der Behandlung mit SDS noch stabil war. Es ist bekannt, dass Aquaporine Homotetramere bilden, die teilweise resistent gegenüber der Desintegration durch SDS sind [103]. Eine starke Dimerisierung kann dabei Ausdruck von korrekter Proteinfaltung sein. Dies liegt darin begründet, dass ganz bestimmte Motive im Protein für die Multimerisierung verantwortlich sind. Damit diese miteinander in Wechselwirkung treten können, müssen sie zugänglich sein. Mutationen oder Änderungen in der Sekundärstruktur, zum Beispiel durch falsche Faltung, können dies verhindern und damit die Multimerisierung abschwächen oder unterbinden [104]. Während beim *PfAQP* bei den Detergenzien BRIJ[®]58 und BRIJ[®]78 das Verhältnis von Dimer zu Monomer 1,1–1,2 : 1 betrug, war bei allen weiteren Detergenzien nur ein Verhältnis von 0,3–0,5 : 1 zu beobachten. Eine Übertragbarkeit auf das nicht fusionierte Protein kann also als gegeben angenommen werden.

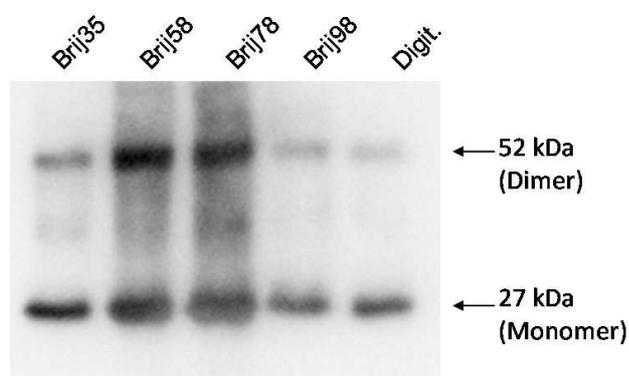


Abbildung 4.17: Western Blot des *PfAQP*-Detergenzien-Screens. Bei den Detergenzien BRIJ[®]58 und BRIJ[®]78 ist eine besonders starke Dimerisierung zu erkennen. Detektion durch Penta His-AK.

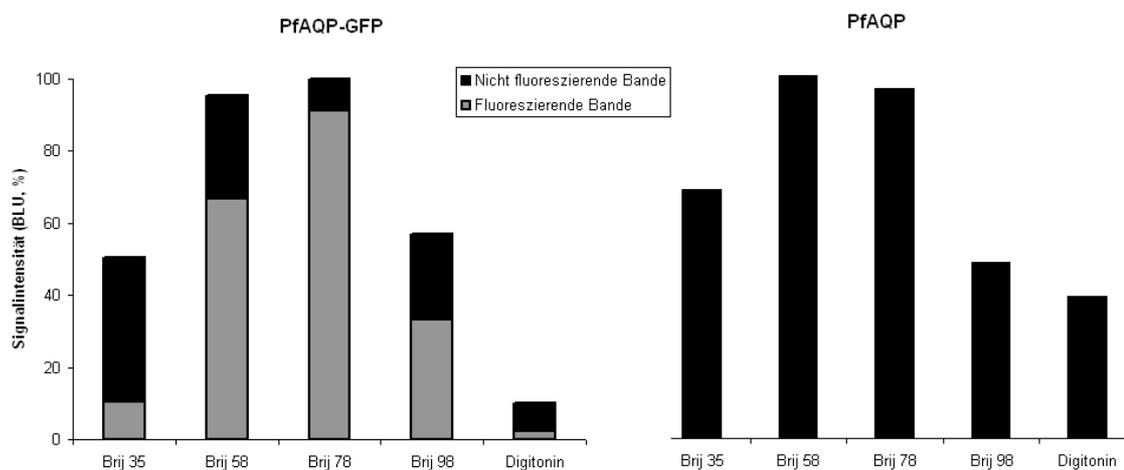


Abbildung 4.18: Vergleich der Signalintensitäten der Western Blots von *GFP*-fusioniertem und nicht fusioniertem *PfAQP*.

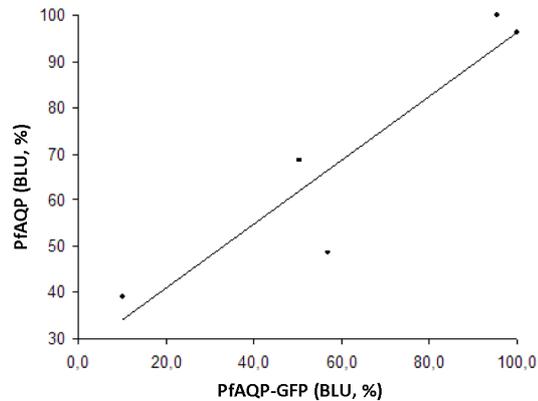


Abbildung 4.19: Korrelation der Signalintensitäten der Western Blots von *GFP*-fusioniertem und nicht fusioniertem *PfAQP*.

4.5.3 Präparative Herstellung und Rekonstitution von *PfAQP*

Um zu prüfen, ob tatsächlich eine korrekte Faltung des BRIJ[®]78-produzierten *PfAQP*s vorlag, wurde das Protein im präparativen Maßstab hergestellt, aufgereinigt und in Liposomen aus *E. coli*-Lipiden rekonstituiert.

Arten der Protein-Rekonstitution und Vorversuche

Es gibt verschiedene Methoden zur Rekonstitution von Membranproteinen in Liposomen: In allen Fällen werden die Liposomen zunächst mit einem Detergens destabilisiert, das hierbei am häufigsten eingesetzte ist TRITON[®]X 100 [105]. Anschließend wird das solubilisierte Membranprotein hinzugegeben und alle Detergenzien aus dem Ansatz entfernt. Dabei sind die Membranproteine durch ihre großen lipophilen Bereiche energetisch gezwungen, sich in die Liposomen zu integrieren. Das Entfernen der Detergenzien kann auf drei verschiedene Arten erfolgen: Entweder wird das Detergens unter seine kritische Mizellbildungskonstante (CMC) verdünnt oder es wird mittels Gelfiltration entfernt. Außerdem kann es durch polymerische Adsorbentien (sogenannte BIO-BEADS[®]) dem Ansatz entzogen werden [106]. Das Verdünnen unter die CMC kann durch Dialyse der Probe erfolgen oder durch zügige Injektion in eine größere Menge Probenpuffer ohne Detergens [107]. Da bei der Verdünnungsmethode nur Detergenzien mit sehr hoher CMC in Frage kommen, ist es notwendig, das

Membranprotein zuvor in ein solches zu überführen [106]. Das hierfür am häufigsten eingesetzte Detergens ist das n-Octyl- β -D-glucopyranosid (n-OG).

Leider scheiterten jegliche Versuche, das *PfAQP* aus dem DDM in das n-OG zu überführen. Lediglich sehr kleine Mengen an Protein in n-OG konnten gewonnen werden. Ein direkter Zusatz zu dem zellfreien Proteinsynthese-Ansatz führte ausschließlich zu präzipitiertem Protein. Auch eine Reinigung mit n-OG anstelle von DDM war erfolglos. Die mit den gewonnenen Mengen an Protein in n-OG durchgeführten Rekonstitutionsversuche mittels Dialyse oder Injektion führten zu Proteoliposomen mit extrem geringer Rekonstitutionseffizienz, die für keine weiteren Testungen einsetzbar waren. Einzig die Methode mittels BIO-BEADS[®] zeigte sich erfolgreich.

Präparative Herstellung von *PfAQP*

Das *PfAQP* wurde wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben im präparativen Maßstab hergestellt und aufgereinigt. Das SDS-Gel (s. Abb. 4.20) zeigte ab einer Imidazol-Konzentration von 120 mM so gut wie keine Proteinbanden mehr, welche nicht der Größe des *PfAQP* entsprachen. Anschließend wurde aus den reinen Fraktionen das Imidazol entfernt und das Protein aufkonzentriert.

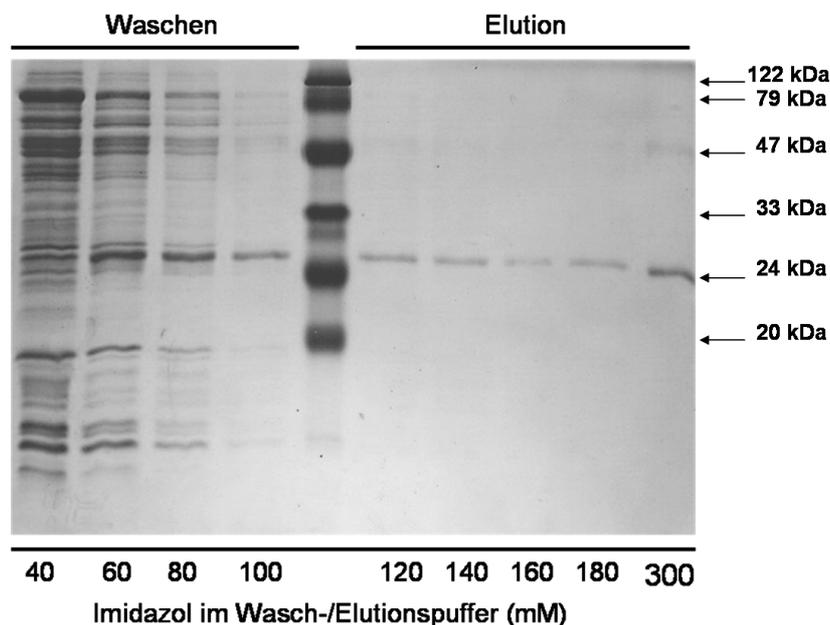


Abbildung 4.20: Mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel der *PfAQP*-Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose.

Herstellung und Destabilisierung der Liposomen

Die Liposomen wurden wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben hergestellt. Für die Rekonstitution wurden diese mit TRITONTMX-100 versetzt. Der Prozess der Destabilisierung der Liposomen bis hin zu ihrer Auflösung kann über die Messung der OD₆₀₀ mitverfolgt werden. Dafür wurden die Liposomen mit TRITONTMX-100 titriert und nach jedem Schritt die OD₆₀₀ bestimmt. Es ist in der Abbildung 4.21 erkennbar, dass bei 8–10 mM TRITONTMX-100 die Auflösung langsam begann. Für die Rekonstitution wurden 8 mM (5 %) TRITONTMX-100 verwendet.

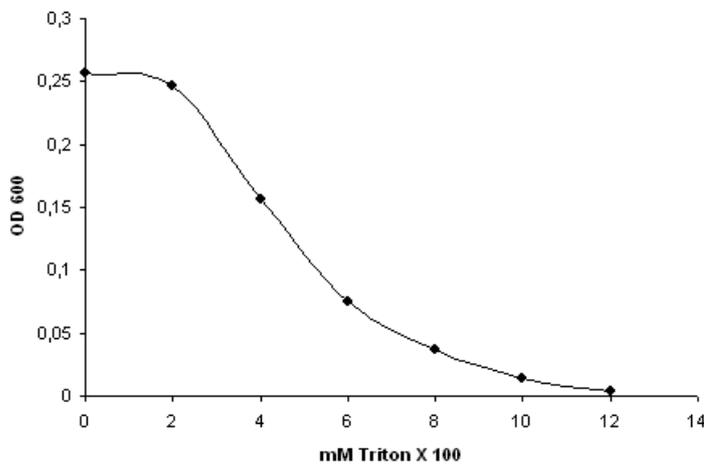


Abbildung 4.21: Titration von Liposomen (1 mg/ml) mit TRITONTMX-100

Rekonstitution von PfAQP

Das aufgereinigte Protein wurde anschließend wie in Abschnitt 3.6.2 beschrieben in Liposomen integriert. Dabei hat sich bei der Rekonstitution mittels BIO-BEADS[®] herausgestellt, dass bei allen Kontrollen streng beachtet werden musste, dass genau die gleiche Menge an Adsorbens verwendet wird. *Stopped-flow*-Untersuchungen haben gezeigt, dass bei einem zu hohen Einsatz der BIO-BEADS[®] die Wasserdurchlässigkeit der Liposomen erhöht wurde. Auch der Einsatz von zu geringen Mengen ließ die Membran durchlässig werden.

Um die optimale Menge an BIO-BEADS[®] zu ermitteln, wurden Liposomen zunächst mit jeweils der gleichen Menge TRITON[®]X 100 versetzt und dieses anschließend mit

verschiedenen Mengen BIO-BEADS[®] wieder entfernt. Die so behandelten Liposomen wurden in der *Stopped-flow*-Apparatur gegen einen 300 mM osmotischen Gradienten gemessen. Drei der erhaltenen Schrumpfkurven sind in der Abbildung 4.22 beispielhaft dargestellt. Die Auswertung erfolgte über die BIOKINE-Software, welche über eine Ratenkonstante ermittelte, wie schnell die entsprechenden Partikel schrumpften (s. Gleichung 3.4). Die daraus erhaltenen k-Werte sind der Abbildung 4.23 zu entnehmen. Die Kurve zeigte, dass wie vermutet sowohl der zu hohe als auch der zu niedrige Einsatz an BIO-BEADS[®] zu durchlässigen Liposomen führte. Das Minimum der Kurve zeigte die bei der eingesetzten Lipid-Menge optimale Zufuhr an BIO-BEADS[®] an (s. Abb. 4.23).

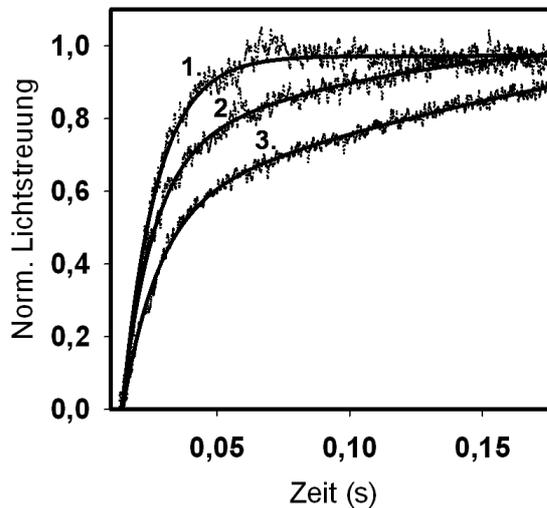


Abbildung 4.22: *Stopped-flow*-Daten von drei Wasserpermeabilitätsmessungen der mit TRITON[®]X-100 behandelten Liposomen in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an BIO-BEADS[®]. 1) 1600 mg BIO-BEADS[®], 2) 800 mg BIO-BEADS[®], 3) 400 mg BIO-BEADS[®].

Die Rekonstitutionseffizienz wurde mittels Saccharosegradienten-Zentrifugation untersucht (s. Abschnitt 3.6.3). Zu diesem Zweck wurden die Proteoliposomen in einem 30 % Saccharosepuffer in ein Ultrazentrifugationsröhrchen gegeben und mit 5 weiteren Schichten Puffer mit abnehmender Saccharosekonzentration überschichtet. Wurde die Probe nun zentrifugiert, schwammen die Proteoliposomen aufgrund ihrer geringeren Dichte soweit auf, bis sie diejenige Saccharosekonzentration mit derselben Dichte erreicht hatten. Dies war zwischen der 15 %- und der 20 %-Saccharosefraktionen der Fall.

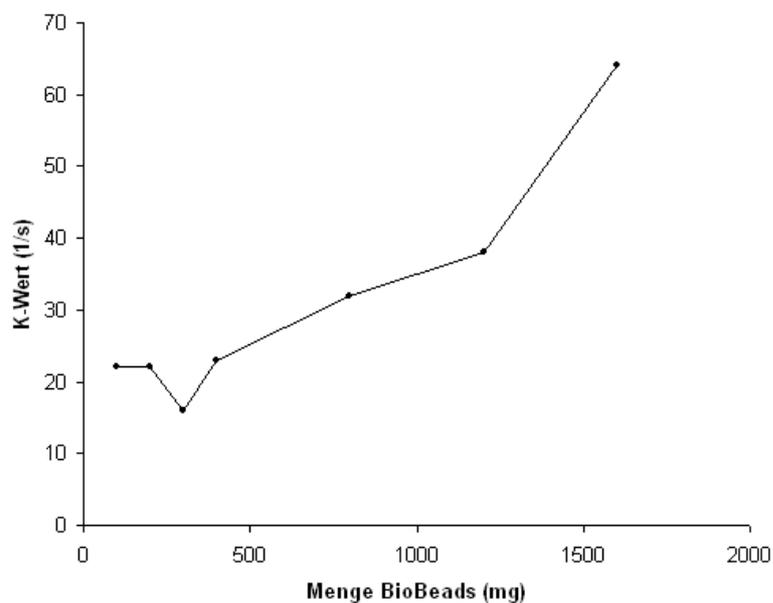


Abbildung 4.23: Auswertung der Wasserpermeabilitätsmessungen mittels *Stopped-flow* von mit TRITON[®]X-100 behandelten Liposomen in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an BIO-BEADS[®]. Die Ratenkonstante k zeigt an, wie schnell die Liposomen schrumpfen und dementsprechend wie schnell das Wasser über die Membran treten kann. Die Kurve bezieht sich auf einen 1 ml-Ansatz mit einer Lipid-Konzentration von 1 mg/ml.

Dort sammelten sie sich in einem sichtbaren weißlichen Ring an. Über diesem war ein zweiter Ring sichtbar, bei dem es sich wahrscheinlich um die leeren Liposomen handelte. Nicht rekonstituiertes Protein verblieb in der untersten Fraktion am Boden des Röhrchens. Anschließend konnte bestimmt werden, welcher Anteil des Proteins sich in Liposomen befunden hatte und welcher Teil nicht rekonstituiert wurde. Zur Überprüfung der vollständigen Migration der Proteoliposomen diente die Untersuchung derjenigen Fraktionen, die von diesen nur passiert wurden. Diese sollten nach Beendigung des Vorganges kein Protein mehr enthalten. Zu kurze Zentrifugationszeiten – in den ersten Versuchen wurde nur vier Stunden zentrifugiert statt sechs – führten dazu, dass sich ein Proteinschmier ausbildete, der sich über mehrere Saccharosefraktionen hinzog. Nach Evaluation der besten Zentrifugationsdauer konnte jedoch eine klare Trennung von Proteoliposomen und freiem Protein erreicht werden. Zwischen diesen Fraktionen war kein Protein detektierbar. Im Western Blot war wie erwartet in der 30 %-Fraktion das freie, nicht rekonstituierte Protein sichtbar. Sowohl in der 15 %- als auch in der 20 %-Saccharoseschicht befand sich rekonstituiertes Protein (s. Abb. 4.24). Die 25 %-Fraktion dazwischen war frei von Protein. Dementsprechend konnte man davon ausgehen, dass das Protein in den oberen Schichten tatsächlich durch die geringere Dichte der Liposomen nach oben befördert und nicht verschleppt wurde. Die erreichte Rekonstitutionseffizienz betrug ca. 80 %.

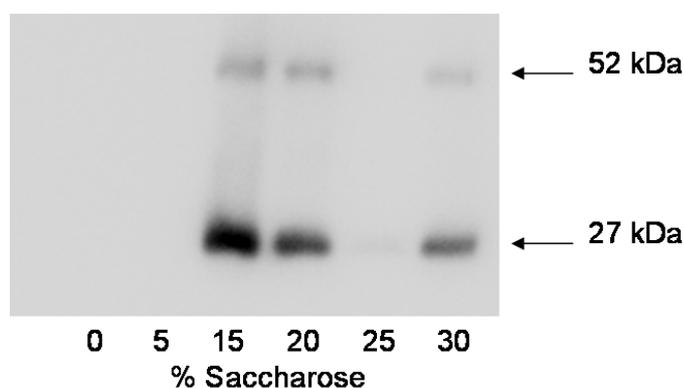


Abbildung 4.24: Western Blot der Überprüfung der Rekonstitution von *PfAQP* in Liposomen mittels Saccharosegradienten-Zentrifugation. Auf Höhe von 27 kDa befindet sich das Monomer, auf Höhe von 52 kDa das Dimer. Detektion durch Penta His-AK.

Größenmessung der Proteoliposomen

Um die Größe der entstanden Proteoliposomen einschätzen zu können, wurden Messungen am ZETASIZER NANO ZS vorgenommen (s. Abschnitt 3.6.4). Die Messung zeigte, dass die Proteoliposomen etwas größer waren als die leeren Liposomen. Die leeren Liposomen erreichten einen Durchmesser, angegeben als *Z-Average*, von ca. 64 nm, die Proteoliposomen von etwa 95 nm. Der PDI lag für die Proteoliposomen bei 0,245, für die Liposomen bei 0,206. Dies bedeutete eine geringfügig engere Verteilung der leeren Liposomen, die jedoch vernachlässigt werden konnte. Da beide PDIs knapp über 0,2 lagen, bestand eine breite Verteilung der Partikel (s. Tab. 3.8), die jedoch nicht so breit war, als dass keine Auswertung der Messung hätte erfolgen können.

4.5.4 Funktionalitätsnachweis des *PfAQP*s

Die Proteoliposomen wurden wie in Abschnitt 3.7.2 dargestellt in der *Stopped-flow*-Apparatur auf ihre Wasser- und Glycerolleitfähigkeit untersucht (s. Tab. 4.4 und Abb. 4.25). Die Versuche für die Wasserleitfähigkeit wurden vierfach, diejenigen für die Glycerolleitfähigkeit sechsfach wiederholt. Die für die Proteoliposomen erhaltenen Werte wurden dann mit den parallel durchgeführten Kontrollen verglichen und die Erhöhung der Permeabilität der Membran für Wasser oder Glycerol berechnet. Die Erhöhung der Wasserpermeabilität für die *PfAQP*-Proteoliposomen lag bei $3,8 \pm 1,0$. Auch die Glycerolleitfähigkeit zeigte eine Zunahme um $5,0 \pm 8,0$. Hier fällt die extrem hohe Standardabweichung auf, was bedeutet, dass die Messungen stark schwankten. Diesbezüglich wäre eventuell eine Optimierung der Rekonstitutions- und vor allem der Messparameter notwendig. Die Funktionalität, und damit die Gültigkeit der *GFP*-Fusion als Faltungskontrolle, konnte jedoch eindeutig nachgewiesen werden.

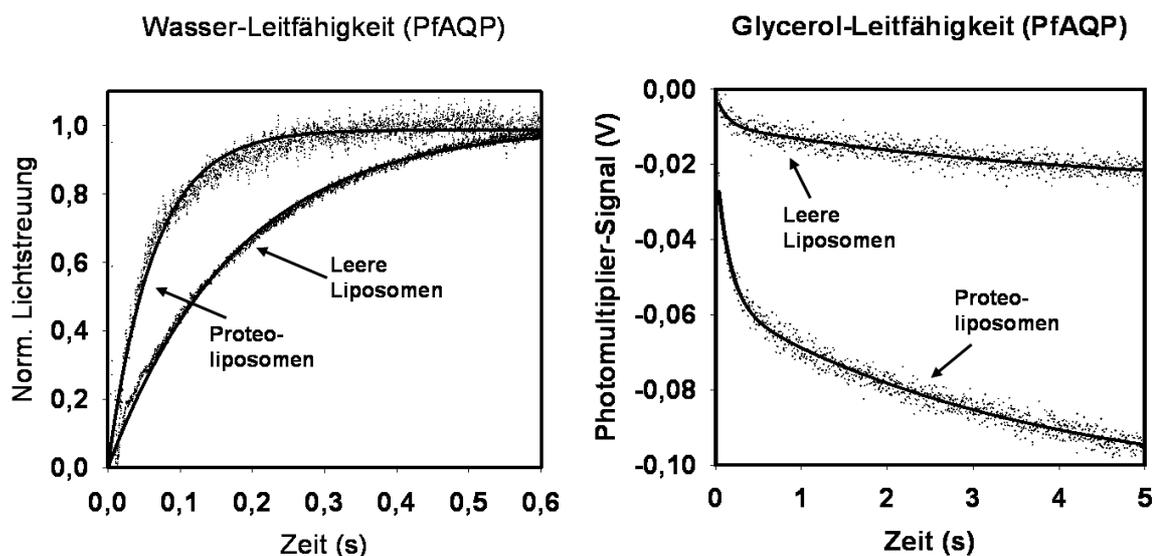


Abbildung 4.25: *Stopped-flow*-Analyse der PfAQP-Proteoliposomen. Dargestellt ist jeweils ein beispielhafter Versuch. Links: Wasserleitfähigkeits-Messung gegen einen hyperosmotischen Puffer. Rechts: Glycerolleitfähigkeits-Messung gegen einen isoosmotischen Puffer.

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Wasser- und Glycerolleitfähigkeitsmessungen von PfAQP. Angegeben sind die mittels BIOKINE-Software berechneten Ratenkonstanten (k-Werte).

Art der Messung	PfAQP (s^{-1})	Kontrolle (s^{-1})	$k_{PfAQP}/k_{Kontr.}$
Wasserleitfähigkeit	35,3	8,1	3,1
	42,1	8,3	5,1
	39,5	13,2	3,0
	41,0	11	3,7
Glycerolleitfähigkeit	0,17	0,01	21,3
	0,21	0,10	2,1
	0,15	0,10	1,5
	0,62	0,36	1,7
	0,29	0,15	1,9
	0,24	0,18	1,3

4.5.5 Schnelle Fluoreszenzmessung im Fluorimeter

Um nachzuweisen, dass ein *High-Throughput*-Verfahren anwendbar ist, wurden dieselben Proben, mit denen die In-Gel-Fluoreszenz gemessen wurde, in eine OTIPLATE™-96er-Mikrotiterplatte gegeben und im Fluorimeter vermessen (s. Abschnitt 3.5.2). Die Proben waren zuvor soweit verdünnt worden, dass die Signalintensität nicht außerhalb des messbaren Bereichs war. Wie der Korrelationsplot zeigte, waren die Ergebnisse der Fluorimeter-Messungen und die der In-Gel-Messungen mit einem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,984$ sehr gut vergleichbar (s. Abb. 4.26). Die Methode eignet sich also, um eine schnelle Einschätzung der Eignung des eingesetzten Detergens direkt aus der Reaktion zu treffen.

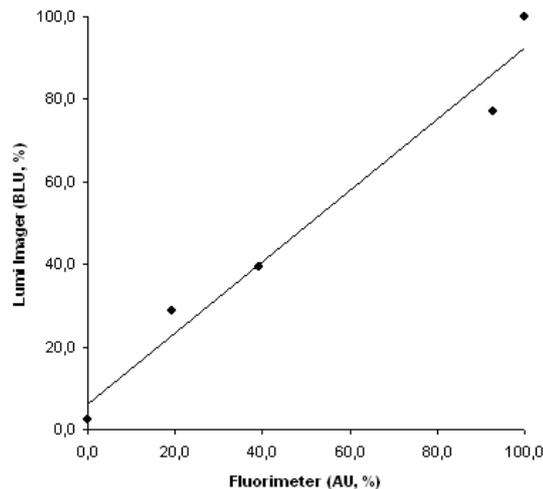


Abbildung 4.26: Korrelation der Fluorimeter-Messungen mit den In-Gel-Fluoreszenzmessungen. Als Proben dienten die Ansätze aus dem Detergenzien-Screen mit *PfAQP-GFP*.

4.5.6 Anwendung der *Screening*-Methode auf andere Proteine

Abschließend wurde geprüft, ob die *in-situ* Faltungskontrolle auch auf andere Proteine übertragbar ist. Dafür wurden drei weitere Membranproteine als *GFP*-Fusionen hergestellt: Der *humane* Harnstoff-Transporter B (*hUT-B*) [108] und die pflanzlichen *Arabidopsis thaliana* Equilibrativen Nukleosid-Transporter 1 und 3 (*AtENT1*, *AtENT3*) [109, 110]. *AtENT1* ist in der intrazellulären Vakuole lokalisiert [111], *AtENT3* hin-

gegen in der Plasmamembran [109]. Der *hUT-B* wurde ausgewählt, um die Anwendbarkeit auf menschliche Membranproteine zu testen. Die *AtENTs* wurden ausgesucht, weil sie einen extrazellulären C-Terminus besitzen. Die *GFP*-Faltungskontrolle ist für Membranproteine mit extrazellulärem C-Terminus in den *in vivo*-Systemen schwierig, entsprechend wenig Literatur existiert dazu [83]. Die Bedingungen außerhalb der Zelle scheinen in den meisten Fällen ungeeignet, um das Fluorophor auszubilden. Für das zellfreie Proteinsynthese-System hingegen ist ein extrazellulärer C-Terminus wahrscheinlich unproblematisch. Da im gesamten Ansatz cytosolische Bedingungen imitiert werden, vermuteten wir, dass dort das *GFP* genauso gut wie in der Zelle gebildet wird. Alle Sequenzen befanden sich im pIVEX2.3wGFPc.

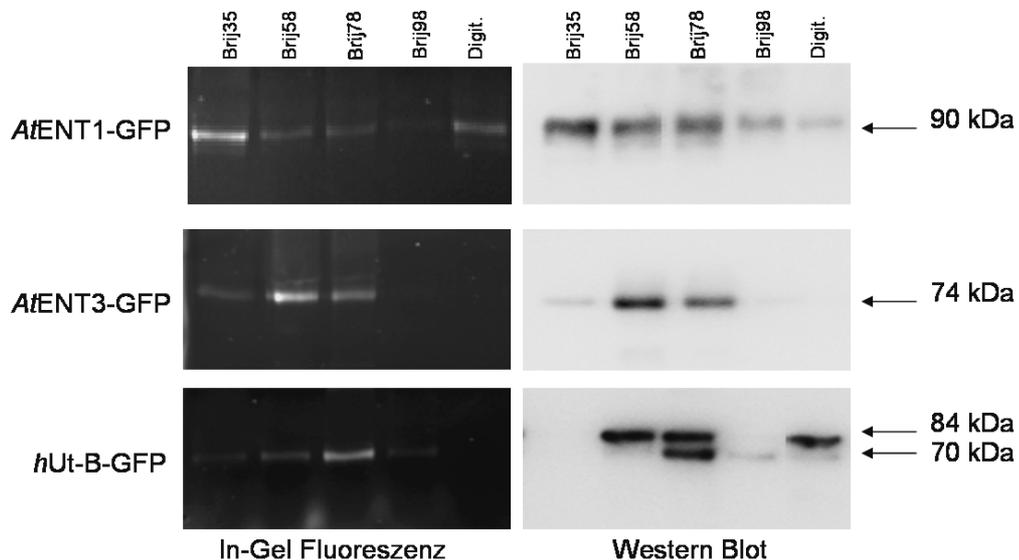


Abbildung 4.27: Zellfreie Produktion der *GFP*-Fusionsproteine von *hUT-B*, *AtENT1* und *AtENT2* in unterschiedlichen Detergenzien. Links: In-Gel-Fluoreszenz des SDS-Gels, rechts: Western Blot des entsprechenden SDS-Gels. Detektion durch GFP (FL)-AK.

Dass unsere Vermutung richtig war, wurde dadurch bestätigt, dass in jeweils einigen Reaktionsansätzen der *AtENTs* Fluoreszenz detektierbar war. Auch zeigten sich wie erwartet, abhängig vom jeweiligen Protein, verschiedene Muster in Bezug auf die Eignung des Detergens (s. Abb. 4.27). Sehr aufschlussreich war auch, dass für die recht ähnlichen Proteine *AtENT1* und *AtENT2* offensichtlich genau entgegengesetzte Produktionsbedingungen optimal waren. Während für *AtENT1* BRIJ[®]35 und Digi-

tonin zu einer fluoreszierenden Bande führten, waren es bei *AtENT3* BRIJ[®]58 und BRIJ[®]78. Bei beiden Nukleosid-Transportern trat im Western Blot keine Doppelbande auf. Desweiteren wurde deutlich, dass bei *AtENT3* die Proteinausbeute und die Menge an richtig gefaltetem Protein korrelierten, wohingegen bei *AtENT1* dies nicht der Fall war. Die Tatsache, dass das Digitonin-Fluoreszenzsignal bei *AtENT1* fast so stark war wie das bei BRIJ[®]35 ($1,4 \cdot 10^6$ BLU versus $1,8 \cdot 10^6$ BLU, s. Tab. 4.5), die Proteinmengen aber deutlich variierten ($0,4 \cdot 10^5$ BLU versus $1,8 \cdot 10^5$ BLU), ließ den Schluss zu, dass ein Großteil des mit BRIJ[®]35 produzierten Proteins falsch gefaltet war. Geht man davon aus, dass bei Digitonin alles Protein richtig gefaltet wurde, kann man diesen Anteil errechnen: Er läge dann bei ungefähr 80 % falsch gefalteten Proteins mit BRIJ[®]35 (s. Tab. 4.5). Auch BRIJ[®]58 und BRIJ[®]78 lieferten entsprechend große Proteinmengen, in ihrem Fall jedoch war der Anteil richtig gefalteten Proteins verschwindend gering. Das Beispiel dieser zwei Proteine unterstreicht deutlich die Wichtigkeit dieser Faltungskontrolle für das zellfreie Proteinsynthese-System. Das Bild, welches der Detergenzien-*Screen* des *hUT-B* lieferte, war dem des *PfAQP* sehr ähnlich. Im Western Blot war auch hier deutlich eine Doppelbande zu erkennen, deren untere Bande im SDS-Gel Fluoreszenz zeigte.

Desweiteren wurde auch der *humane* Monocarboxylat-Transporter *hMCT4* als *GFP*-Fusionsprotein produziert. Im Western Blot war deutlich eine Bande auf der erwarteten Höhe zu sehen (s. Abb. 4.28), jedoch war hier, ähnlich wie beim *DdAqpB*, im SDS-Gel keine Fluoreszenz detektierbar. Offensichtlich war auch in diesem Fall keines der Detergenzien geeignet. Auf den SDS-Gelen und Western Blots aller Fusionsproteine befand sich wie schon beim *PfAQP* zusätzlich die *GFP*-Bande auf Höhe von 27 kDa (nicht gezeigt).

Tabelle 4.5: Vergleich von Gesamtproteinmenge und Menge an richtig gefaltetem Protein von *AtENT1-GFP* bei zellfreier Synthese in den Detergenzien BRIJ[®]35 und Digitonin.

		Detergens	
		BRIJ [®] 35	Digitonin
Gesamtprotein (Western Blot-Signal, BLU)		$1,8 \cdot 10^5$	$0,4 \cdot 10^5$
Korrekt gefaltetes Protein (SDS Gel-Signal, BLU)		$1,8 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$

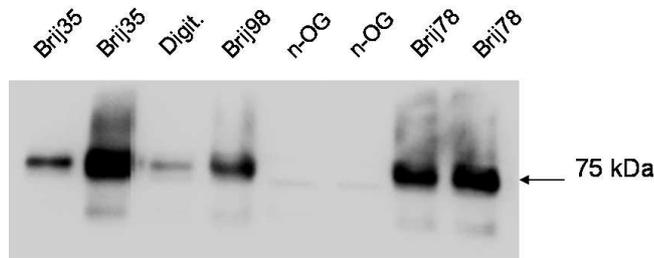


Abbildung 4.28: Western Blot des zellfrei hergestellten *hMCT4-GFP*. Detektion durch GFP (FL)-AK.

4.6 Zellfreie Herstellung und Funktionalitätsnachweis des *hAQP3*

Als weiteres Protein wurde das *humane* AQP3 (*hAQP3*) zellfrei hergestellt. Das Plasmid wurde uns von Guisepe Calamita (Universität Bari, Italien) zur Verfügung gestellt. Ein *Screen* zeigte auch hier kein Produkt, wenn das Detergens fehlte. Die Proteinausbeuten bei Zusatz verschiedener Detergenzien waren ähnlich (s. Abb. 4.29).

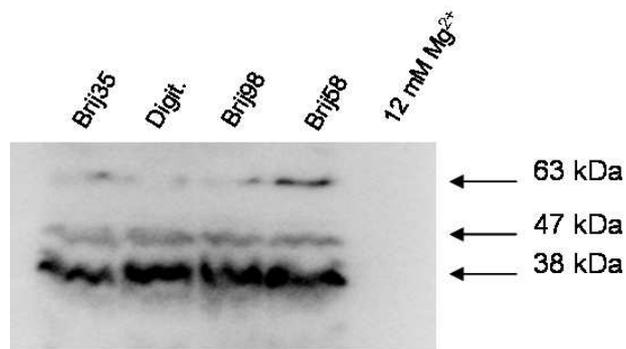


Abbildung 4.29: Western Blot des Detergenzien-*Screens* des *hAQP3*. Die Bande bei 38 kDa stellt vermutlich das Monomer da, die Bande bei 63 kDa das Dimer. Die Bande bei 47 kDa konnte nicht zugeordnet werden und ist vermutlich eine unspezifische Bande des Antikörpers. Detektion durch RGS-anti His-AK.

Das *hAQP3* wurde präparativ in BRIJ[®]98 hergestellt, aufgereinigt, in Liposomen rekonstituiert und in der *Stopped-flow*-Apparatur getestet (s. Abb. 4.30 und Tab. 4.6).

Der Versuch wurde insgesamt zweimal durchgeführt, wobei folgende Ergebnisse erhalten wurden: Die Glycerolpermeabilität wurde durch das *hAQP3* verdoppelt, die Wasserleitfähigkeit war um das 12- bis 19-fache erhöht (s. Tab. 4.6). Auch wenn die Erhöhung der Glycerolleitfähigkeit nicht signifikant war, konnte zumindest die Wasserleitfähigkeit des *hAQP3* eindeutig nachgewiesen werden. Allerdings zeigten die Wasserleitfähigkeitsmessungen recht große Schwankungen, so dass für eine genaue Berechnung der Permeabilitätserrhöhung weitere Messungen nötig sein werden. Jedoch wurde hiermit zum ersten Mal *humanes* AQP3 zellfrei hergestellt und funktionell charakterisiert.

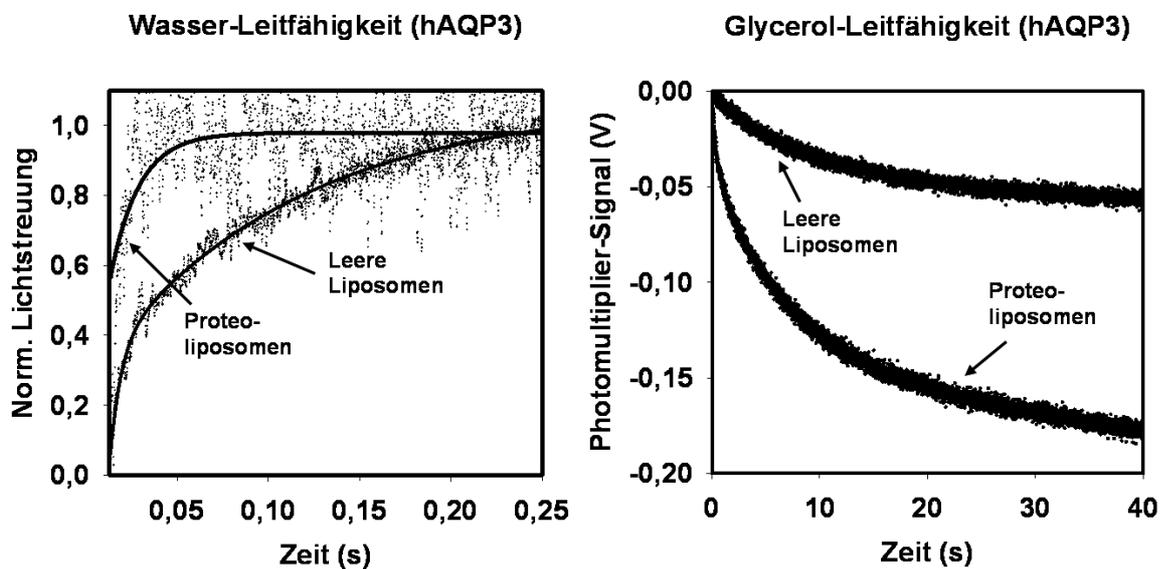


Abbildung 4.30: *Stopped-flow*-Analyse der *hAQP3*-Proteoliposomen. Dargestellt ist jeweils ein beispielhafter Versuch. Links: Wasserleitfähigkeits-Messung gegen einen hyperosmotischen Puffer. Rechts: Glycerolleitfähigkeits-Messung gegen einen isoosmotischen Puffer.

Tabelle 4.6: Ergebnisse der Wasser- und Glycerolleitfähigkeitsmessungen von *hAQP3*. Angegeben sind die mittels BIOKINE-Software berechneten Ratenkonstanten (k-Werte).

Art der Messung	<i>hAQP3</i> (s ⁻¹)	Kontrolle (s ⁻¹)	k _{<i>hAQP3</i>} /k _{Kontr.}
Wasserleitfähigkeit	156	13	12
	232	12	19
Glycerolleitfähigkeit	0,46	0,24	1,92
	0,36	0,14	2,57

5 Diskussion

5.1 Etablierung des zellfreien Proteinsynthese-Systems

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das zellfreie Proteinsynthese-System, welches in dieser Form von der Gruppe um Volker Dötsch und Frank Bernhard von der Universität Frankfurt veröffentlicht wurde [52], in diesem Arbeitskreis etabliert. Den größten Teil stellte dabei die Produktion von T7-RNA-Polymerase und S30-*E. coli*-Extrakt dar. Die T7-RNA-Polymerase war ohne weitere Schwierigkeiten herstellbar und zeigte eine hohe Aktivität (s. Abb. 4.4). Im Gegensatz dazu war die Herstellung des S30-*E. coli*-Extraktes weniger einfach. In einigen Fällen wurde trotz Einhaltung aller Herstellungsvorschriften ein minderwertiger oder sogar überhaupt nicht funktioneller Extrakt erhalten. Andere Chargen zeigten hingegen eine gute Aktivität. Als mögliche Ursache für schlechte Extrakte wurde unter anderem eine Phagen-Kontamination der *E. coli*-Kultur in Betracht gezogen – ein Problem, das auch aus anderen Laboren bekannt ist. Weil die *E. coli*-Zellen bei der S30-*E. coli*-Extrakt-Herstellung schon recht früh geerntet werden, ist es möglich, dass man die durch Phagen hervorgerufene Lyse oder Wachstumsverzögerung nicht erkennt [112]. Um dies zu überprüfen, wurde dieselbe Kultur, welche für die Extraktherstellung verwendet wurde, in einem weiteren Fermenteransatz bis zur stationären Phase wachsen gelassen (s. Abb. 4.5). Da die Zellen jedoch die erwartete Teilungsrates und eine sehr gute optische Dichte erreichten, konnte eine Kontamination mit Phagen ausgeschlossen werden. Natürlich sind auch andere Gründe für das Auftreten schlechter Chargen denkbar. Es könnte zum Beispiel eine Kontamination der Vorkultur mit einem anderen, im Labor verwendeten, Organismus oder mit gentechnisch veränderten *E. coli*-Bakterien stattgefunden haben. Ebenso ist eine Verunreinigung der verwendeten Chemikalien möglich, sowie eine zu nachlässige Kontrolle der Fermenterbedingungen. Letzten Endes blieb allerdings unklar, welcher Parameter die Qualität der Extrakte derart stark beeinflusst hat. Als Konsequenz wur-

den schlechte Chargen verworfen und neu produziert. Um Kosten und Zeit zu sparen, sollte dieses Problem in Zukunft aber weiter untersucht werden.

Im Zuge der Etablierung wurden auch zwei verschiedene Plasmid-Vektoren auf ihre Eignung für das zellfreie Proteinsynthese-System getestet (s. Tab. 4.3). Da jedoch beide Vektoren schon für dieses System optimiert waren und dementsprechend beide einen T7-Promotor besaßen, zeigten sich so gut wie keine Unterschiede in der Ausbeute an Testprotein. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da hauptsächlich die Promotorspezifität für die Transkriptionseffizienz verantwortlich ist.

5.2 Untersuchung des *DdAqpB*

5.2.1 Glykosylierungsanalyse

Um den Glykosylierungsstatus von *DdAqpB* zu untersuchen, wurde mit aus *D. discoideum* gewonnener Membranproteinfraction eine chemische Deglykosylierung durchgeführt, bei der sowohl N- als auch O-Glykoside vom Protein abgespalten wurden. Auf dem anschließend durchgeführten Western Blot war deutlich eine Abnahme derjenigen Bande zu sehen, welche als die glykosylierte Form des Proteins angenommen wurde (38 kDa)(s. Abb. 4.10). Da zuvor die Spezifität des Antikörpers vom Arbeitskreis nachgewiesen worden war [93], konnte so zunächst eine Glykosylierung mit hoher Wahrscheinlichkeit gezeigt werden. Nicht ganz ins Bild passte die Tatsache, dass die obere 38 kDa-Bande sehr deutlich und fokussiert war. Dies würde bedeuten, dass tatsächlich nur eine glykosylierte Form produziert wurde. Häufiger ist zu beobachten, dass Banden, die glykosylierte Spezies des entsprechenden Proteins darstellen, eher einen Schmier ausbilden. Dieser ist gleichbedeutend mit einer Vielzahl an verschiedenen Verzweigungen des Zuckerrestes [35]. In diesem Fall schien jedoch nur eine Glykosylierungsspezies vorzuliegen.

Bezüglich der möglichen Glykosylierungsstelle wurde eine O-Glykosylierungsvorhersage durchgeführt, da eine N-Glykosylierung zuvor ausgeschlossen worden war (s. Abschnitt 4.3.2) [93]. Die Vorhersage ergab, dass eine Glykosylierung am Serin 75 oder am Serin 244 möglich wäre. Das Serin 75 ist jedoch die wahrscheinlichere Glykosylierungsstelle, weil sie sich, für die Glykosyltransferasen frei zugänglich, mitten im extrazellulären *Loop A* befindet. Serin 244 hingegen befindet sich direkt am Ende der fünften Transmembranspanne und liegt vermutlich sehr dicht oder sogar in der Mem-

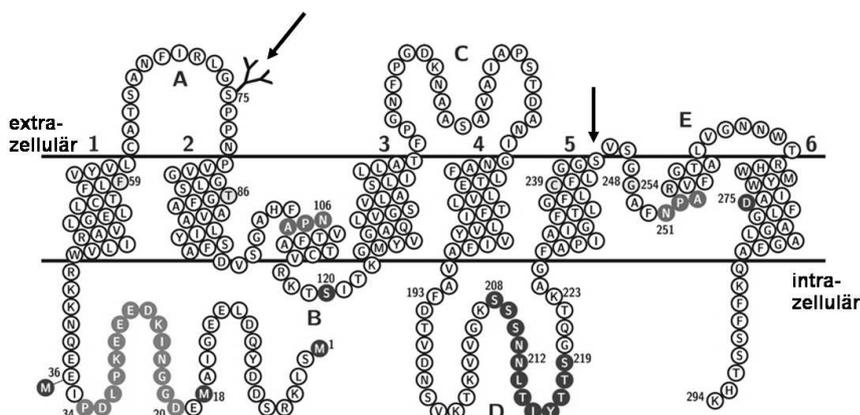


Abbildung 5.1: Topologie- und Strukturvorhersage von *DdAqpB*. Die möglichen Glykosylierungsstellen sind mit einem Pfeil markiert. Die wahrscheinlichste Glykosylierungsstelle ist am Serin 75. Abbildung verändert nach [39].

bran. Damit wäre es für die entsprechenden Enzyme eventuell schlechter erreichbar als das Serin 75 (s. Abb. 5.1).

Wie schon in Abschnitt 4.3.2 erwähnt, lassen neueste Erkenntnisse aus dem Arbeitskreis Zweifel an der Spezifität des Antikörpers und damit auch an einer möglichen Glykosylierung zu. Die Frage einer Sekundärmodifikation bleibt also weiterhin offen.

5.2.2 Vergleichende Untersuchung von *in vivo*- und *in vitro*-*DdAqpB*

DdAqpB wurde zellfrei hergestellt und mittels Western Blot analysiert. Parallel wurde die Membranproteinfraktion von *D. discoideum* mit einem Antikörper gegen dasselbe Protein geblottet. Dabei lieferte die zellfreie Synthese ein weiteres Indiz für das Vorhandensein einer Glykosylierung von *DdAqpB*. Auf dem Western Blot des zellfrei hergestellten Proteins war deutlich zu sehen, dass nur die erwartete 31 kDa-Bande vorhanden war, nicht jedoch die Bande des vermutlich glykosylierten Proteins bei 38 kDa, welche in der Membranproteinfraktion auftrat (s. Abb. 4.8). Dies verwundert nicht, da posttranslationale Modifikationen – abgesehen von der Ausbildung von Disulfidbrücken – im *E. coli*-basierten System nicht möglich sind.

Von einem weiteren Hinweis auf eine Glykosylierung abgesehen, konnte aber vor allem gezeigt werden, dass das Protein überhaupt zellfrei herstellbar ist. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass der S30-*E. coli*-Extrakt durchaus in der Lage ist, eukaryotische

Proteine zu produzieren. Desweiteren fiel eine zusätzliche Bande auf, die weit unterhalb der erwarteten Bande von 31 kDa bei 20 kDa auftrat. Folgende Möglichkeiten wurden in Betracht gezogen: Zunächst wurde vermutet, es handele sich um dasselbe Protein welches jedoch in einer falschen Faltung vorlag. Es ist bekannt, dass richtig und falsch gefaltete Proteinspezies unterschiedliche Migrationsgeschwindigkeiten im SDS-Gel haben können [82]. Jedoch zeigt das richtig gefaltete Protein meist eine höhere Migrationsgeschwindigkeit, weil es in seiner richtigen Faltung sehr kompakt vorliegt. Von falsch gefaltetem Protein nimmt man eine etwas sperrigere, da weniger kompakte Struktur an, die entsprechend langsamer durch das Gel wandern würde. Es wäre also eher unwahrscheinlich, wenn es in diesem Fall andersherum wäre. Auch der Größenunterschied von 11 kDa wäre für zwei Faltungen desselben Proteins doch sehr hoch. Trotzdem entschieden wir uns, die Frage der Faltung nicht ganz zu verwerfen und es wurde zur Überprüfung ein Fusionsprotein mit C-terminal angehängtem *GFP* erstellt (s. Abschnitt 5.3.1).

Parallel wurde das *in vitro*-*DdAqpB* ein weiteres Mal geblottet. Dieses Mal jedoch nicht mit einem gegen den C-Terminus gerichteten Antikörper, sondern mit einem gegen den N-Terminus (s. Abb. 4.12). Tatsächlich zeigte sich neben der erwarteten 31 kDa-Bande auch hier eine Bande darunter, jedoch auf Höhe von ungefähr 8 kDa. Diese Angabe ist nur grob, weil sich die unterste Markerbande bei 19 kDa befand und die Höhe für diese Bande extrapoliert werden musste. Ein Unterschied zur 20 kDa-Bande wurde trotzdem mehr als deutlich und somit war die Frage bezüglich der unteren Bande geklärt: Die Produktion des hydrophoben Membranproteins hatte, wie erwartet, zur Präzipitation und damit aber offensichtlich auch zu einer Destabilisierung geführt. Dies wiederum hatte zur Folge, dass das *DdAqpB* in einen 20 kDa und in einen 8 kDa-Teil zerbrochen ist. Berechnet man den Ort der Bruchstelle, befände sich diese im *Loop B*. Brüche in *Loops* finden eher statt als in den Transmembranspannen, was darin begründet liegt, dass die *Loops* freier beweglich und zudem eher dem Lösungsmittel zugänglich sind und dementsprechend weniger zur Gesamtstabilität beitragen [113]. Natürlich könnte auch eine Zersetzung durch Proteasen stattgefunden haben. Diese haben sicherlich im rein wässrigen Milieu leichteren Zugang zu dem Protein, als wenn dieses durch eine Mizelle geschützt ist. Vermutlich befindet sich die instabilste Stelle im Protein also im *Loop B*.

Zu diesen Erkenntnissen passend waren auch die Ergebnisse des anschließend durchgeführten Detergenzien-*Screens* (s. Abb. 4.9). In der Kontrolle ohne Detergens war

erneut das Bruchstück auf Höhe von 20 kDa sichtbar, diesmal sogar fast ausschließlich. Bei Detergenzienzusatz jedoch tauchte nur die erwartete Bande bei 31 kDa auf. Dies wies ebenso darauf hin, dass das *DdAqpB*, so wie vermutlich auch viele andere Membranproteine, in ausschließlich hydrophilen Milieus nicht nur präzipitiert, sondern auch destabilisiert und sogar zerstört werden kann.

Als später auch andere Membranproteine (zum Beispiel *PfAQP* und *hAQP3*) ohne Detergenzienzusatz produziert wurden, kam es sogar zu gar keinem nachweisbaren Reaktionsprodukt. Eine mögliche Erklärung ist, dass das Protein, noch bevor es vom Ribosom abdissoziieren konnte, mitsamt diesem präzipitiert ist und es sehr schnell zu einem Reaktionsabbruch kam. Einen C-terminalen *GFP*- oder Oligo-Histidin-*Tag* hätte man dann nicht nachweisen können. Um diese These zu überprüfen, könnten in Zukunft dieselben Proben ein weiteres Mal mit einem gegen den N-Terminus gerichteten Antikörper geblottet werden.

Interessanterweise lieferte auch die Synthese des Fusionskonstruktes *DdAqpB-GFP* kein nachweisbares Protein, wenn keine Detergenzien zugesetzt wurden. Dies widerspricht der Vorstellung, dass die Löslichkeit des Fusionsproteins aufgrund des löslichen *GFP*-Anteils im Gegensatz zum reinen *DdAqpB*, welches immerhin produziert wurde, erhöht sein sollte. Ein möglicher Grund könnte wie schon oben erwähnt sein, dass das fertig produzierte *DdAqpB* mitsamt Ribosom präzipitiert ist, bevor die *GFP*-Domäne translatiert werden konnte.

Allgemein lässt sich das Fazit ziehen, dass eine zellfreie Synthese von Membranproteinen ohne Zusatz von Stabilisatoren in Form von Detergenzien, Lipsomen oder anderem nicht sinnvoll ist.

5.3 Optimierung der zellfreien Proteinsynthese

5.3.1 *GFP*-Fusion als *in situ*-Faltungskontrolle

Aufschlussreiche Ergebnisse lieferte auch die zellfreie Produktion des Fusionsproteins *DdAqpB-GFP* (s. Abb. 4.11). Das Protein, welches in Anwesenheit verschiedener Detergenzien hergestellt wurde, zeigte in keinem Fall Fluoreszenz. Da im Western Blot eine deutliche Bande bei den erwarteten 58 kDa zu sehen war, muss zwar Protein entstanden sein, jedoch wurde dieses offensichtlich nicht korrekt gefaltet. Da im Reaktionsansatz keinerlei Präzipitat sichtbar war, kann man davon ausgehen, dass das

DdAqpB zwar solubilisiert wurde, doch trotzdem keine richtige Faltung ausbildete. Dass nicht alle Detergenzien, welche von dem zellfreien Proteinsynthese-System gut toleriert werden, auch für die Produktion von jedem Protein geeignet sind, konnten schon Klammt *et al.* 2005 zeigen [62]. Dies erscheint logisch in Anbetracht der Tatsache, dass nicht jedes Protein von jedem Detergens gleich gut solubilisiert werden kann. Wie dieser Versuch jedoch vermuten lässt, ist nicht alleine die Fähigkeit zur Solubilisation ausschlaggebend. Sie ist nur die erste Voraussetzung. Vielmehr müssen die Detergenzien im zellfreien Proteinsynthese-System drei Aufgaben erfüllen: Sie müssen zuerst mit dem gesamten System kompatibel sein und dürfen die verschiedenen Komponenten nicht inhibieren. Zweitens müssen sie dazu in der Lage sein, das Protein in die Mizelle aufzunehmen. Auch dies ist nicht bei allen Detergenzien der Fall. Bei späteren Versuchen führte vor allem der Zusatz von n-OG – welches bei der *in vivo*-Produktion von Membranproteinen sehr häufig erfolgreich eingesetzt wird, um diese zu solubilisieren – zur Präzipitation des Proteins. Drittens muss das Detergens offensichtlich dazu fähig sein, die natürliche Faltung des Proteins zu ermöglichen und zu bewahren. Diese Erkenntnis ist ein großer Fortschritt in der Weiterentwicklung und Etablierung der zellfreien Proteinsynthese als Produktionssystem. Bislang wurde bei den analytischen *Screenings* immer die reine Proteinausbeute als Maßstab für die Eignung der Reaktionszusätze gewählt. Wie jedoch die Ergebnisse dieses Versuches zeigten, ist darauf keinesfalls Verlass und hat sicherlich schon in vielen Fällen zu großer Enttäuschung durch letztendlich nicht funktionelles Protein geführt.

Die Tatsache, dass eine Faltungskontrolle im zellfreien Synthesesystem offensichtlich von großem Interesse sein könnte, war Anlass dazu, dieses Kontrollinstrument zu validieren. Da das *DdAqpB* als Testsystem aufgrund der anfangs negativen Ergebnisse und der noch wenigen Erfahrungen mit diesem Protein – inklusive des unbekanntem, potentiellen *Gating*-Mechanismus – zu unsicher war, entschieden wir uns für das gut charakterisierte *PfAQP* aus dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum*.

5.3.2 Validierung der Faltungskontrolle

Zellfreie Produktion und Analyse von *PfAQP-GFP*

Zuerst wurde das *PfAQP-GFP* einem Detergenzien-Screen unterzogen (s. Abb. 4.13). Hier war nun Fluoreszenz detektierbar. Desweiteren wurde erneut die Vermutung bestätigt, dass eine hohe Ausbeute an Gesamtprotein nicht gleichbedeutend ist mit einer

entsprechenden Menge an wahrscheinlich korrekt gefaltetem Protein. Dies wird vor allem bei einem Vergleich zwischen den Detergenzien BRIJ[®]35 und BRIJ[®]78 deutlich. Die Proteinausbeuten waren laut Western Blot-Analyse vergleichbar. Doch während bei BRIJ[®]78 fast ausschließlich fluoreszierendes Protein entstanden ist, war bei BRIJ[®]35 genau das Gegenteil der Fall. Im Western Blot waren auch die vorhin erwähnten zwei Banden der beiden Proteinspezies von vermutlich korrekt und falsch gefaltetem Protein erkennbar, wie es schon bei Geertsma *et al.* 2008 gezeigt wurde [82]. Es könnte nun kritisch angemerkt werden, dass ja eigentlich gar keine *GFP*-Fusion nötig wäre, um richtig und falsch gefaltete Proteinspezies auseinanderzuhalten, wenn doch im Western Blot stets zwei Banden auftreten. Das ist natürlich in gewisser Weise richtig, jedoch sei dazu auch angemerkt, dass nicht in allen Fällen zwei Banden entstehen. Vor allem bei den sehr großen Proteinen (zum Beispiel bei den in dieser Arbeit vorgestellten Equilibrativen Nukleosidtransportern, s. Abb. 4.27) und bei Proteinen, deren verschiedene Faltungsspezies gleiche Migrationsgeschwindigkeiten im SDS-Gel haben, wird man nur eine Bande erhalten. Desweiteren kann es durchaus sein, dass alle Detergenzien oder auch keines zu richtig gefaltetem Protein führt. Eine Zuordnung der Bande zu „richtig“ oder „falsch“ wäre dann schwierig. Das schwerwiegendste Argument dürfte jedoch sein, dass die *GFP*-Fusion schon nach wenigen Stunden durch ihre Fluoreszenz indizieren kann, ob korrekt gefaltetes Protein entstanden ist oder nicht, ohne dass aufwendige Aufarbeitungen mit SDS-PAGE und Western Blot notwendig wären.

Untersuchung mittels Zirkulardichroismus

Um der Vermutung genauer nachzugehen, dass die Detergenzien Einfluss auf die Sekundärstruktur haben können, wurde *PfAQP* in verschiedenen Detergenzien produziert und mittels CD-Analyse untersucht (s. Abb. 4.15 und 4.16). Dabei wurden BRIJ[®]35 und BRIJ[®]78 ausgesucht, weil ersteres laut *GFP*-Faltungskontrolle so gut wie ausschließlich die obere, nicht fluoreszierende Bande zeigte, letzteres jedoch fast nur die untere, fluoreszierende Bande (s. Abb. 4.13). Das erhaltene CD-Spektrum zeigte durchaus Unterschiede, die jedoch schwierig zu quantifizieren waren. Dies hatte verschiedene Gründe: Zum einen ist es für eine genaue Berechnung der α -Helix-Anteile notwendig, die exakte Proteinkonzentration zu bestimmen. Als Standardmethode wird

in diesem Fall eine quantitative Aminosäureanalyse empfohlen [114]. Hierbei erfolgt eine genaue Bestimmung der Mengen der einzelnen Aminosäuren nach deren Hydrolyse. Dieser Vorgang ist jedoch zeitlich und apparativ sehr aufwendig. Dementsprechend wurde hier auf die einfachere und schnellere Methode der Absorptionsmessung des nativen Proteins bei 280 nm zurückgegriffen. Eine Absorptionsmessung ist mit einem einfachen Photometer durchführbar, aber dafür auch recht anfällig für Fehler. Bestimmte Pufferzusätze können stören, desweiteren kann es problematisch sein, wenn die gemessenen Proteine in irgendeiner Art und Weise agglomeriert sind und dadurch Streulichtartefakte entstehen [87]. All dies muss man bei der Auswertung der CD-Spektren im Hinterkopf behalten, da diese letztendlich auf die Proteinmenge bezogen werden und daraus die Anteile an α -Helix und β -Faltblatt berechnet werden. Desweiteren muss bedacht werden, dass nur CD-Messungen, die bis unter 170 nm reichen, wirklich aussagekräftig sind. Dies ist in den meisten Fällen schwierig: Erstens fällt die Strahlungsintensität der Xenonbogenlampe bei den meisten Geräten ab 180 nm stark ab, zweitens absorbieren signifikant der zum Spülen des Gerätes verwendete Stickstoff und das sich im Puffer befindende Wasser [87]. Weiterhin störte in diesem niedrigen Wellenlängenbereich der hohe Natriumchloridgehalt des Probenpuffers deutlich. Leider konnte nicht auf den Zusatz verzichtet werden, da Natriumchlorid als antichaotrope Substanz den hydrophoben Effekt des Wassers verstärkt und damit die Proteinfaltung stabilisiert.

All diese Gründe machen deutlich, wie kompliziert eine wirkliche Sekundärstrukturanalyse von Proteinen mittels CD ist. Erschwerend kam auch noch hinzu, dass das *PfAQP* nicht nur einen Histidin-*Tag* sondern auch noch einen HA-*Tag* besaß. Nachgewiesenermaßen können schon einzelne zusätzliche Aminosäuren destabilisierend auf ein Protein wirken [115] und die *Tags* konnten in diesem Fall auch nicht entfernt werden. Deshalb wurde insgesamt darauf verzichtet, eine Einschätzung der α -Helix-Anteile zu machen, auch wenn für das *PfAQP* eine Kristallstruktur vorhanden ist und man dementsprechend sofort hätte sehen können, welches Detergens zu einer „korrekteren“ Faltung führt.

Nichtsdestotrotz ließ sich erkennen, dass bei dem in BRIJ[®]78 produzierten *PfAQP* die typische W-Form α -helicaler Proteine deutlich wurde, wohingegen die beiden Minima bei 208 und 222 nm bei dem mit BRIJ[®]35 hergestellten *PfAQP* weit weniger ausgeprägt waren. Es kann vermutet werden, dass in diesem Fall das Protein auch einen gewissen Anteil an β -Faltblatt-Struktur besaß. Chow *et al.* 2003 haben her-

ausgefunden, dass entstehende α -helicale Proteine mit wachsender Kettenlänge eine Umwandlung von zunächst nicht nativer β -Faltblatt-Struktur zur α -Helix vollziehen können [101]. Genau diese zwei Zustände waren möglicherweise in den beiden Spektren zu erkennen. Während im BRIJ[®]78 die Umwandlung zum nativen Protein vollzogen werden konnte, war dies bei BRIJ[®]35 möglicherweise nicht der Fall.

Sehr deutliche Ergebnisse lieferte eine anschließend durchgeführte thermische Denaturierungsanalyse. Dabei wurde die Veränderung der *Mean Residue Ellipticity* über einen Temperaturbereich von 20–95° C beobachtet. Letztendlich war erkennbar, dass eine solche Denaturierungsanalyse viel aussagekräftiger war als der Vergleich der beiden CD-Spektren. Das PfAQP, welches mit Zusatz von BRIJ[®]78 hergestellt worden war, zeigte eine für Membranproteine normale, sigmoidale Schmelzkurve mit einem Schmelzpunkt (Wendepunkt) bei 53° C. Dieser ähnelte sehr stark dem von Öberg *et al.* gefundenen Schmelzpunkt für das hAQP10 von 55° C [102]. Bei dem in BRIJ[®]35 produzierten PfAQP hingegen war kein Denaturierungsprozess zu beobachten, dafür jedoch eine Trübung der Probe bei etwa 80° C. Von dieser war stark zu vermuten, dass sie durch eine Aggregation des Proteins hervorgerufen wurde. Auch bei dem im BRIJ[®]78 produzierten PfAQP trat einige Zeit nach der Denaturierung eine Aggregation ein. Es ist daher die Annahme berechtigt, dass das in BRIJ[®]35 hergestellte Protein schon von Anfang an denaturiert vorlag.

Die thermische Denaturierungsanalyse wies somit recht eindeutig das Vorliegen von zwei PfAQP-Spezies nach, von denen nur die BRIJ[®]78-produzierte Variante einen für ein Membranprotein normalen Schmelzpunkt aufwies und somit vermutlich korrekt gefaltet war.

Anwendung auf das unfusionierte Protein

Zum Nachweis der Gültigkeit des Faltungskontrollsystems wurde zudem gezeigt, dass die Produktionsbedingungen von fusioniertem und nichtfusioniertem Protein übereinstimmten (s. Abb. 4.18). Dies bedeutet, dass dieselben Detergenzien im Vergleich zueinander sehr ähnliche Gesamtproteinausbeuten von PfAQP-GFP und PfAQP lieferten. Ein für ein biologisches System sehr guter Korrelationskoeffizient von 0,925 bestätigte dies [116]. Man kann an diesem Beispiel erkennen, dass die GFP-Domäne offensichtlich keinen großen Einfluss auf den Rest des Proteins und sein Verhalten bei der zellfreien Proteinsynthese hat. Natürlich war es nicht möglich zu überprüfen,

ob auch die Anteile an richtig gefaltetem Protein korrelierten. Es war allerdings interessant, dass der Zusatz derjenigen Detergenzien, die bei dem Fusionsprotein zu starker Fluoreszenz geführt hatten, bei dem unfusionierten Protein sehr starke Dimer-Banden erkennen ließen (s. Abb. 4.17). Zwar war auch bei den anderen Detergenzien eine zusätzliche Dimerbande zu erkennen, jedoch war diese im Verhältnis zur Monomer-Bande viel schwächer. Normalerweise denaturieren Proteine bei der Vorbehandlung im SDS-Ladepuffer, ebenso werden Oligomere zerstört. Teilweise können jedoch sehr stark zusammenhängende Oligomere die SDS-Behandlung überstehen. Dafür muss natürlich gewährleistet sein, dass die entsprechenden Stellen im Protein, welche für die Oligomerisierung verantwortlich sind, auch einander erkennen können. Dies geht nur, wenn das Protein in seiner natürlichen Faltung vorliegt oder zumindest diejenigen Stellen richtig gefaltet sind, die für die Interaktionen der Monomere verantwortlich sind. Bei dem menschlichen AQP1 ist auch bekannt, welche Domänen des Proteins dies sind: Zum einen interagieren Arg₁₂ und Asp₂₂₈, welche sich in der Nähe vom N-Terminus beziehungsweise vom C-Terminus benachbarter Monomere befinden. Desweiteren gibt es eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Gly₃₀ (Helix 1) und Tyr₁₈₆ (*Loop E*) [117]. Letztendlich ist es also durchaus legitim zu behaupten, dass eine im Western Blot auftretende, starke Dimerisierung ein Hinweis auf eine korrekte Faltung sein kann.

Rekonstitution und Testung von *PfAQP*

Um das Faltungskontrollsystem abschließend zu validieren, wurde *PfAQP* zellfrei hergestellt und in Liposomen rekonstituiert. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Arten der Rekonstitution getestet, von denen sich jedoch nur eine erfolgreich zeigte. Die Verdünnungsmethode mit n-OG brachte leider nicht das gewünschte Ergebnis. Bei dieser werden die Liposomen mit n-OG destabilisiert und anschließend das ebenfalls in n-OG solubilisierete Membranprotein hinzugegeben. Wird nun mit Hilfe eines Verdünnungsschritts das n-OG unter dessen CMC verdünnt, integriert sich das Membranprotein in das Liposom. Der Grund für das Scheitern dieser Methode ist in erster Linie darin zu sehen, dass das *PfAQP* sich so gut wie gar nicht in n-OG lösen ließ, auch wenn hohe Konzentrationen eingesetzt wurden. Diese Ergebnisse waren insofern unerwartet, als dass *in vivo* hergestelltes *PfAQP* sehr wohl in n-OG solubilisiert und auf diese Weise rekonstituiert werden konnte [30]. Vielleicht zeigt sich hier doch ein kleiner Unterschied zwischen zellfrei und nicht zellfrei hergestelltem Protein, der durch das Vorhandensein

eines zusätzlichen Histidin-*Tags* und eines HA-*Tags* im *in vitro*-Konstrukt begründet sein könnte.

Die Rekonstitution mittels BIO-BEADS[®] jedoch zeigte sich erfolgreich. Dabei wurde die Beobachtung gemacht, dass eine nicht ausreichende Zugabe an BIO-BEADS[®] zu sehr wasserdurchlässigen Liposomen führte (s. Abb. 4.23). Dies liegt darin begründet, dass sich Detergenzien in die Liposomen einlagern und diese destabilisieren können [106]. Diesen Prozess kann man über die Messung der optischen Dichte bei 400–700 nm mitverfolgen [90], wie es auch in Abb. 4.21 schon gezeigt wurde. Jedoch zeigte sich, dass auch ein zu hoher Einsatz an BIO-BEADS[®] zu stark wasserdurchlässigen Liposomen führte. Je größer die Mengen an eingesetzten BIO-BEADS[®] waren, desto stärker war der Effekt. Über Gründe hierfür kann nur spekuliert werden. Eine mögliche Erklärung stellt die Theorie dar, dass durch die BIO-BEADS[®] bestimmte Phospholipide adsorbiert und damit den Liposomen entzogen werden. Dass dies durchaus der Fall sein kann, wurde auch schon von Lévy *et al.* 1989 experimentell nachgewiesen [118]. Über das Ausmaß dieses Effekts sind sich die verschiedenen Autoren jedoch uneins [118–120]. Desweiteren wurde in anderen Veröffentlichungen gezeigt, dass die Permeabilität von Liposomen extrem stark von ihrer Lipidzusammensetzung abhängt und sie sich bezüglich ihrer Wasserleitfähigkeiten bis zu einem 90-fachen unterscheiden können [121]. Es ist daher denkbar, dass mit steigendem Zusatz an BIO-BEADS[®] immer mehr diejenigen Phospholipide oder andere Bestandteile den Liposomen entzogen wurden, welche diesen Rigidität verliehen. Durch den Wegfall stabilisierender Komponenten könnte so die Permeabilität erhöht worden sein. Diese Erkenntnis ist insofern für die Rekonstitution von wasser- oder ionenleitenden Kanälen interessant, als dass die Permeabilitäten hier offensichtlich stark manipuliert werden können. Es war deshalb notwendig, bei allen Kontrollen stets auf den Einsatz exakter BIO-BEADS[®]-Mengen zu achten, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Um die Rekonstitutionseffizienz zu überprüfen, wurde eine Saccharosegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Die erreichte Einbaurate von Protein in das Liposom lag bei ca. 80 %. Andere Autoren, deren Protokolle als Basis für diesen Versuch dienten, erreichten mit Aquaporin-Proteoliposomen zwar eine Einbaurate bis zu 100 % [92], jedoch ist anzumerken, dass ihre Art des Proteinnachweises auch weniger sensitiv war. In diesen Fällen wurden nicht wie hier Western Blots des ausgefällten und damit aufkonzentrierten Proteins durchgeführt, sondern Silberfärbungen der stark verdünnten Probe. Geringe Proteinmengen wurden also wahrscheinlich gar nicht detektiert.

Um nun die Wasser- beziehungsweise Glycerolleitfähigkeit der Proteoliposomen im Vergleich zu den leeren Liposomen zu untersuchen, wurde zunächst geprüft, ob diese sich in ihrer Größe unterscheiden. Eine annähernd gleiche Größe ist wichtig, um die Ergebnisse der *Stopped-flow*-Untersuchungen vergleichen zu können. Die Partikelgröße wurde durch die Bestimmung der Brown'schen Molekularbewegung am ZETASIZER ermittelt. Die Messung ergab, dass die Proteoliposomen im Schnitt etwa ein Drittel größer waren als die leeren Liposomen (95 versus 64 nm Durchmesser). Folgende Gründe dafür sind denkbar: Einerseits könnte der Größenunterschied dadurch zustande kommen, dass das in die Lipiddoppelschicht integrierte PfAQP über diese hinausragt. Dieser Effekt dürfte jedoch bei einem ungefähr 95 nm großen Liposom und einem Protein, das in etwa 2,5 nm groß ist [30], sehr gering ausgeprägt sein. Viel eher dürfte andererseits der Dichteunterschied eine Rolle gespielt haben. Streng genommen dürften mittels ZETASIZER-System nur Partikel verglichen werden, die aus den gleichen Komponenten aufgebaut sind. Denn Unterschiede in der Dichte der Partikel führen dazu, dass die Brown'sche Molekularbewegung verändert ist und die Aussagen über die Partikelgrößen verzerrt werden. Wie in der Saccharosegradienten-Zentrifugation sichtbar wurde, haben Liposomen und Proteine durchaus sehr unterschiedliche Dichten. Die Liposomen mit integriertem Protein dürften also um einiges schwerer sein und würden damit einen größeren Partikeldurchmesser suggerieren.

Es war dementsprechend leider nicht möglich, Absolutaussagen bezüglich der Größe von Liposomen und Proteoliposomen zu machen. Eine Berechnung der Membranpermeabilitäten aus den *Stopped-flow*-Daten (P_f -Werte) unter Einbeziehung der Partikelgröße wurde dementsprechend als nicht sinnvoll erachtet. Es wurden daher nur die Ratenkonstanten (k -Werte) verglichen. Dies ist unproblematisch, wenn die Kontroll-Liposomen kleiner als die Proteoliposomen sind, da somit die erhaltenen Permeabilitäts erhöhungen durch das eingebaute Protein eher etwas zu gering, aber auf keinen Fall zu hoch eingeschätzt würden. Würde man für Proteoliposomen und Liposomen P_f -Werte berechnen wollen, müsste man die Partikelgrößen aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen berechnen, so wie es auch bei den meisten anderen Autoren erfolgte [92, 107].

Letztendlich konnte eine etwa viermal schnellere Wasserleitfähigkeit der Proteoliposomen im Vergleich zu den leeren Liposomen festgestellt werden und damit die Funktionalität des PfAQP eindeutig nachgewiesen werden. Diese Werte stimmen auch mit anderen Literaturwerten überein [30]. Auch die Glycerolleitfähigkeit war im Schnitt

fünffach erhöht, jedoch zeigten die Messungen sehr starke Schwankungen. Vermutlich lag dies daran, dass die Messmethode noch nicht optimal etabliert war. Bei der isoosmotischen Messung sollte die Ratenkonstante der Kontrolle theoretisch null oder annähernd null betragen. Dies ist hier jedoch nicht immer der Fall gewesen. Daraus kann man schließen, dass neben der Glyceroleitfähigkeit auch osmotische Effekte mit-erfasst wurden. In Zukunft müsste eine Methode gefunden werden, um die Osmolarität von Probenlösung und Gegenpuffer möglichst genau abzugleichen, zum Beispiel durch den Einsatz eines Osmometers oder durch Titrieren des Gegenpuffers [96]. Auch eine Übereinstimmung mit anderen Literaturwerten ist hier nicht gegeben. Während andere Autoren für das PfAQP bis zu 240-fach höhere Glyceroleitfähigkeiten im Vergleich zur Negativkontrolle gefunden haben [30], konnte hier nur eine Verfünffachung derselben festgestellt werden. Die Gründe hierfür sind wahrscheinlich auch in den noch nicht optimierten Messbedingungen zu finden. Da die Wasserleitfähigkeit technisch um einiges einfacher zu messen ist als die Glyceroleitfähigkeit, und die Funktionalität des Proteins eindeutig bewiesen werden konnte, wurde auf die Optimierung der Glyceroleitfähigkeitsmessungen jedoch verzichtet.

Es wäre zugegebenermaßen sehr interessant gewesen, nicht nur das in BRIJ[®]78 hergestellte PfAQP auf dessen Funktionalität zu überprüfen, sondern auch zu testen, ob das in BRIJ[®]35 erzeugte PfAQP nicht funktionell ist. Damit hätte endgültig bewiesen werden können, dass der Zusatz von BRIJ[®]35 zu falsch gefaltetem Protein führt. Dies war jedoch leider aus folgenden Gründen nicht möglich: Zum einen ist es stets kritisch, einen Negativbeweis zu erbringen. Ein anderer Grund ist das Rekonstitutionsprotokoll, das für ein bestimmtes Detergens, nämlich das DDM, optimiert ist. Aus diesem Grund müssen alle Proteine, welche rekonstituiert werden sollen, in DDM überführt werden. Dieser Schritt kann jedoch Einflüsse auf die Faltung haben und eine Aussage über die ursprünglichen Detergenzien wäre verfälscht. Auch auf einen Versuch, die Rekonstitution mit den Synthesedetergenzien durchzuführen, wurde verzichtet, weil auch hier keine Vergleichbarkeit gegeben wäre. Zum einen können sich die Rekonstitutionseffizienzen unterscheiden, zum anderen können auch Überreste der entsprechenden Detergenzien in den Liposomen unterschiedliche Effekte auf deren Durchlässigkeit haben, da die verschiedenen Detergenzien von den BIO-BEADS[®] auch zu einem unterschiedlichem Ausmaß aus dem Ansatz entfernt werden. Auf einen Negativbeweis dieser Art wurde also bewusst verzichtet, zumal die Daten aus der CD-Messung diesbezüglich eindeutig waren.

Übertragung auf andere Membranproteine

Zum Schluss wurde die Anwendung der Methode an einem Satz anderer Proteine getestet, wobei diese so ausgewählt wurden, dass verschiedene Eigenschaften abgedeckt wurden: Größe (6–11 Transmembranspannen), Wirtsorganismus (Pflanze, Mensch), Lokalisation in der Zelle (intrazellulär oder zellmembranständig) und Lokalisation des C-Terminus (intra- oder extrazellulär)(s. Abb. 4.27). Das System zeigte breite Anwendung auf alle verschiedenen Membranproteinarten aus unterschiedlichen Organismen, wobei außer bei dem *hMCT4* immer zumindest einige geprüfte Detergenzien zur richtigen Faltung führten. Die *AtENTs* mit den extrazellulären C-Termini waren besonders interessant. Auch wenn die Faltung von extrazellulärem *GFP in vivo* gezeigt werden konnte, bleibt diese im lebenden System kritisch und scheint von Faktoren wie der Zelllinie oder dem eingesetzten Protein abhängig zu sein [83]. Über Gründe hierfür kann nur spekuliert werden: Vermutlich sind die Bedingungen in einigen Zellmedien nicht geeignet für die chemische Reaktion bei der Fluorophorbildung, zudem könnte der *GFP-Tag* die Translokation einiger Membranproteine stören. Im zellfreien System ist dieses Problem, wie hier gezeigt werden konnte, hinfällig, so dass das *in vitro*-Faltungskontrollsystem auf alle Arten von Proteinen angewendet werden kann. Wie die Beispiele von *hMCT* und *DdAqpB* zeigen, kann durchaus viel Protein produziert werden, ohne dass die richtige Faltung entsteht (s. Abb. 4.11). Damit zeigt sich, dass die standardmäßig eingesetzten Detergenzien durchaus nicht immer dazu in der Lage sind, das gewünschte Produkt zu liefern und unterstreicht die Bedeutung eines faltungsbasierten *Screenings*. Unterstützt wird diese Aussage durch das Beispiel des *AtENT1*, welches ebenfalls deutlich macht, dass Proteinausbeute und Anteil an korrekter Faltung nicht korrelieren müssen, sondern auch das Gegenteil der Fall sein kann, und kleine Proteinmengen mehr richtig gefaltetes Protein enthalten können als große (s. Abb. 4.27). Der allein auf Proteinausbeuten basierende *Screening*-Ansatz dürfte mit diesen Erkenntnissen absolut überholt sein.

5.4 *h*AQP3: Zellfreie Herstellung und Funktionstest

Zum ersten Mal konnte das *h*AQP3 zellfrei hergestellt und die Wasserleitfähigkeit eindeutig nachgewiesen werden. Überhaupt stellen diese Ergebnisse die ersten Untersuchungen von isoliertem *h*AQP3 dar, das bislang nur in der Zelle untersucht wurde. Eine Aufreinigung und Rekonstitution von *h*AQP3 hat bislang noch nicht stattgefunden. Dementsprechend schwierig ist der Vergleich dieser Ergebnisse mit denen der anderen Autoren. Nichtsdestotrotz korrelieren die hier gefundenen Wasserleitfähigkeitswerte (12- bis 19-fach erhöht im Gegensatz zur Kontrolle) gut mit denen von Echevarria *et al.* 1996, die eine etwa zehnfach höhere Wasserleitfähigkeit von *h*AQP3 in Oozyten im Vergleich zur Kontrolle gefunden haben [122]. Es ist anzumerken, dass die Wasserleitfähigkeit nur zweimal gemessen wurde und die Werte dementsprechend noch stark schwankten. Die von anderen Autoren, auch in Oozyten, gefundenen Glyceroleitfähigkeiten bewegen sich in einem Bereich zwischen 4- bis 20-facher Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle [122, 123]. In dieser Arbeit wurde nur eine Verdopplung der Glyceroleitfähigkeit gemessen. Dies hängt aber wahrscheinlich mit den schon oben beschriebenen Problemen der Messmethode zusammen. Aufgrund der Eindeutigkeit der Ergebnisse der Wasserleitfähigkeitsmessungen konnte jedoch bewiesen werden, dass die zellfreie Herstellung zu einem funktionellen Protein geführt hat.

5.5 Ausblick

Eine interessante zukünftige Anwendung würde das *in vitro*-Faltungskontrollsystem in der *High-throughput*-Analyse finden. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist es egal, ob die Fluoreszenz im SDS-Gel gemessen wird oder ob der gesamte Reaktionsansatz im Fluorimeter erfasst wird. Da die zellfreie Proteinsynthese auch im *Batch*-Verfahren, also in nur einem Kompartiment, durchgeführt werden kann, wäre es möglich, auf einer 96-*Well*-Platte 96 verschiedene zellfreie Ansätze mit jeweils unterschiedlichen Detergenzien zu testen. Die Reaktion würde zwar nur einige Stunden laufen können, aber die Proteinausbeuten müssten – bei Funktionieren des Detergens – für die sensitive Fluorimetermessung ausreichend sein. Würde man anstelle des normalen *GFP*-Restes eine faltungs- und fluoreszenzoptimierte Proteinvarinate [124] als Fusionspartner wählen, könnte schon nach ein bis zwei Stunden ein Ergebnis vorliegen. Die 96-*Well*-Platte könnte ganz unproblematisch in bestimmten Zeitabschnitten

dem Inkubator entnommen und im Fluorimeter vermessen werden. Noch geeigneter wäre natürlich ein Fluorimeter, welches selbständig die Platte inkubieren und vermessen könnte. Eine solche Anwendung dürfte vor allem auch für die pharmazeutische Industrie von großem Interesse sein, da es möglich wäre, innerhalb kürzester Zeit die optimalen Reaktionsbedingungen zu evaluieren. Den Ansatz mit dem besten Ergebnis könnte man aufreinigen, bei Bedarf den *GFP*-Rest abverdauen und das Protein direkt auf seine Funktion untersuchen. Somit wäre eine schnelle Untersuchung und Charakterisierung von Proteinen aller Art möglich.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *DdAqpB* aus *D. discoideum* untersucht. Zu diesem Zweck wurde Membranproteinfraktion aus *D. discoideum* gewonnen und das *DdAqpB* mittels Western Blot nachgewiesen. Da auf diesem stets zwei Banden auftraten, wurde eine chemische Deglykosylierung der Membranproteinfraktion vorgenommen. Dies führte zum Verschwinden der oberen Bande, was vermuten ließ, dass das *DdAqpB* *in vivo* glykosyliert vorliegt. Desweiteren wurde *DdAqpB* zellfrei hergestellt. Dafür wurde zunächst das zellfreie Proteinsynthese-System in diesem Arbeitskreis etabliert, sowie S30-*E. coli*-Extrakt und T7-RNA-Polymerase hergestellt. Wurde das *DdAqpB* ohne weitere Zusätze zellfrei produziert, trat eine Zersetzung des Proteins ein. Durch Zusatz von Detergenzien konnte dies vermieden werden. Anschließend wurde für das *DdAqpB* eine mögliche Faltungskontrolle durch C-terminale Fusion von *GFP* erstellt. Diese lieferte in der zellfreien Synthese zwar Proteinprodukt, jedoch war keine Fluoreszenz sichtbar. Der Versuch wurde mit dem *PfAQP* aus *P. falciparum* wiederholt. Hier zeigte sich, dass Gesamtproteinmenge und Stärke der Fluoreszenz nicht zwangsläufig korrelieren müssen und zudem beide je nach Detergens-Zusatz sehr unterschiedlich sein können. Entsprechend wurden Sekundärstrukturanalysen von in verschiedenen Detergenzien hergestelltem *PfAQP* mittels Zirkulardichroismus durchgeführt, die einen Einfluss der Reaktionszusätze auf die Faltung deutlich machten. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Produktionsparameter des Fusionsproteins auf das nicht fusionierte Protein übertragen werden können, wurde *PfAQP* präparativ hergestellt und dessen Funktionalität nachgewiesen. Da eine schnelle Messung des Reaktionsansatzes im Fluorimeter möglich war, wurden weitere *GFP*-Fusionsproteine zellfrei hergestellt: Die pflanzlichen Equilibrativen Nukleosid-Transporter *AtENT* 1 und 3, der menschliche Harnstoff-Transporter *hUT-B* und der menschliche Monocarboxylat-Transporter *hMCT4*. Nur bei dem *hMCT4* war in keinem Reaktionsansatz Fluoreszenz detektierbar. Zusätzlich konnte das menschliche *AQP3* zellfrei hergestellt und dessen Wasserleitfähigkeit nachgewiesen werden.

7 Summary

When *DdAqpB* was detected in the membrane protein fraction of *D. discoideum* by Western blotting, it was hypothesized that the protein might be glycosylated *in vivo*. This assumption was supported by the fact that a chemical deglycosylation led to the disappearance of the Western Blot band that was earlier suspected to be the glycosylated species of the protein.

DdAqpB was also produced cell free. For this purpose the cell free protein synthesis technique was established in this work group, as well as T7-RNA-polymerase and S30-*E. coli*-extract were produced. However, cell free production of the *DdAqpB* lead to the destruction of the protein when no solubilizing detergents were added. In the following step, a possible folding control for the *DdAqpB* was constructed by c-terminal fusion of GFP to the protein. The *DdAqpB*-GFP fusion protein was then produced in the cell free system. As a result, protein was in fact made, but no fluorescence was detectable. The experiment was repeated with the *PfAQP* from *P. falciparum* and evidence was provided that total protein yield and fluorescence intensity do not necessarily show a correlation. Besides, both of them were strongly dependent on the detergent added. Accordingly, secondary structure analyses using circular dichroism were carried out on *PfAQP* that was produced in different detergents. It was proven that reaction mixture components can have an impact on the protein folding. After demonstration of transferability of the production parameters of the GFP-fusion to the unfused protein, *PfAQP* was produced in preparative scale, and functionality was shown.

As high throughput measurements in the fluorometer were possible, more GFP-fusion proteins were produced in the cell free system: The plant equilibrative nucleoside transporters *AtENT* 1 and 3, as well as the human urea transporter *hUT-B* and the human monocarboxylate transporter *hMCT4*. Only *hMCT4* exhibited no fluorescence in all reactions. Apart from that, the human *AQP3* was produced cell free, and its water permeability was confirmed.

Literaturverzeichnis

- [1] G. C. Terstappen and A. Reggiani. In silico research in drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(1):23 – 26, 2001.
- [2] J. Davey. G-protein-coupled receptors: New approaches to maximise the impact of gpcrs in drug discovery. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 8(2):165–170, 2004.
- [3] J. N. Langley. On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *The Journal of Physiology*, 33(4-5):374–413, 1905.
- [4] J. Drews. Drug discovery: A historical perspective. *Science*, 287(5460):1960–1964, 2000.
- [5] A.-H. Maehle, C.-R. Prull, and R. F. Halliwell. The emergence of the drug receptor theory. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(8):637–641, 2002.
- [6] A. J. Clark. The mode of action of drugs on cells. *E. Arnold Co.*, London, 1933.
- [7] M. Noda, H. Takahashi, T. Tanabe, M. Toyosato, Y. Furutani, T. Hirose, M. Asai, S. Inayama, T. Miyata, and S. Numa. Primary structure of α -subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature*, 299(5886):793–797, 1982.
- [8] A. Krogh, B. Larsson, G. von Heijne, and E. L. Sonnhammer. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3):567 – 580, 2001.
- [9] G. Von Heijne. The membrane protein universe: What’s out there and why bother? *Journal of Internal Medicine*, 261(6):543–557, 2007.

- [10] G. W. Abbott. Molecular mechanisms of cardiac voltage-gated potassium channelopathies. *Current Pharmaceutical Design*, 12(1):3631–3644, 2006.
- [11] S. Hirose. A new paradigm of channelopathy in epilepsy syndromes: Intracellular trafficking abnormality of channel molecules. *Epilepsy Research*, 70:206 – 217, 2006.
- [12] M. T. Nelson, S. M. Todorovic, and E. Perez-Reyes. The role of t-type calcium channels in epilepsy and pain. *Current Pharmaceutical Design*, 12(18):2189–2197, 2006.
- [13] J. J. Gargus. Ion channel functional candidate genes in multigenic neuropsychiatric disease. *Biological Psychiatry*, 60(2):177 – 185, 2006.
- [14] A. M. Spiegel. Defects in g protein-coupled signal transduction in human disease. *Annual Review of Physiology*, 58(1):143–170, 1996.
- [15] L. S. King, D. Kozono, and P. Agre. From structure to disease: The evolving tale of aquaporin biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(9):687–698, 2004.
- [16] S. G. Dahl and I. Sylte. Molecular modelling of drug targets: The past, the present and the future. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 96(3):151–155, 2005.
- [17] P. Agre, S. Sasaki, and M. J. Chrispeels. Aquaporins: A family of water channel proteins. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 265(3):F461, 1993.
- [18] M. L. Zeidel, S. V. Ambudkar, B. L. Smith, and P. Agre. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry*, 31(33):7436–7440, 1992.
- [19] D. Kozono, M. Yasui, L. S. King, and P. Agre. Aquaporin water channels: Atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine. *Journal of Clinical Investigation*, 109(11):1395–1399, 2002.
- [20] A. S. Verkman. Mechanisms and regulation of water permeability in renal epithelia. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 257(5):C837–C850, 1989.

- [21] M. Echevarria, E. E. Windhager, S. S. Tate, and G. Frindt. Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(23):10997–11001, 1994.
- [22] Y. Wang, K. Schulten, and E. Tajkhorshid. What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF. *Structure*, 13(8):1107–1118, 2005.
- [23] R. Zardoya. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biology of the Cell*, 97(6):397–414, 2005.
- [24] K. Nozaki, D. Ishii, and K. Ishibashi. Intracellular aquaporins: Clues for intracellular water transport? *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 456(4):701–707, 2008.
- [25] E. Beitz and J. E. Schultz. Aquaporine - Zelluläre Wasserkanäle als therapeutisches Target? *Pharmazie in unserer Zeit*, 28(2):67–73, 1999.
- [26] J. S. Jung, G. M. Preston, B. L. Smith, W. B. Guggino, and P. Agre. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *Journal of Biological Chemistry*, 269(20):14648–14654, 1994.
- [27] K. Murata, K. Mitsuoka, T. Hirai, T. Walz, P. Agre, J. B. Heymann, A. Engel, and Y. Fujiyoshi. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 407(6804):599–605, 2000.
- [28] B. L. de Groot, A. Engel, and H. Grubmüller. A refined structure of human aquaporin-1. *FEBS Letters*, 504(3):206 – 211, 2001.
- [29] B. V. Daniels, J.-S. Jiang, and D. Fu. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the Escherichia coli water channel AqpZ. *Acta Crystallographica Section D*, 60(3):561–563, 2004.
- [30] Z. E. Newby, J. O’Connell III, Y. Robles-Colmenares, S. Khademi, L. J. Miercke, and R. M. Stroud. Crystal structure of the aquaglyceroporin PfAQP from the malarial parasite Plasmodium falciparum. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(6):619–625, 2008.

- [31] A. R. Schäffner. Aquaporin function, structure, and expression: Are there more surprises to surface in water relations? *Planta*, 204(2):131–139, 1998.
- [32] M. Fischer and R. Kaldenhoff. On the pH regulation of plant aquaporins. *Journal of Biological Chemistry*, 283(49):33889–33892, 2008.
- [33] E. Beitz, B. Wu, L. M. Holm, J. E. Schultz, and T. Zeuthen. Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(2):269–274, 2006.
- [34] H. Sui, B.-G. Han, J. K. Lee, P. Walian, and B. K. Jap. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*, 414(6866):872–878, 2001.
- [35] B. Wu, C. Steinbronn, M. Alsterfjord, T. Zeuthen, and E. Beitz. Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel. *The EMBO Journal*, 28(15):2188–2194, 2009.
- [36] B. N. Mitra, R. Yoshino, T. Morio, M. Yokoyama, M. Maeda, H. Urushihara, and Y. Tanaka. Loss of a member of the aquaporin gene family, *aqpa* affects spore dormancy in *dictyostelium*. *Gene*, 251(2):131–139, 2000.
- [37] K. M. Flick, G. Shaulsky, and W. F. Loomis. The *waca* gene of *dictyostelium discoideum* is a developmentally regulated member of the *mip* family. *Gene*, 195(2):127–130, 1997.
- [38] H. Urushihara. The cellular slime mold: Eukaryotic model microorganism. *Experimental Animals*, 58(2):97–104, 2009.
- [39] J. von Bülow, A. Müller-Lucks, L. Kai, F. Bernhard, and E. Beitz. Functional characterization of a novel aquaporin from *dictyostelium discoideum* amoebae implies a unique gating mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10):7487–7494, 2012.
- [40] R. Gupta, E. Jung, A. A. Gooley, K. L. Williams, S. Brunak, and J. Hansen. Scanning the available *Dictyostelium discoideum* proteome for O-linked GlcNAc glycosylation sites using neural networks. *Glycobiology*, 9(10):1009–1022, 1999.

- [41] S. Wopereis. Mechanisms in protein o-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein o-glycan biosynthesis defects: A review. *Clinical Chemistry*, 52(4):574–600, 2006.
- [42] T. A. Schwetz, S. A. Norring, A. R. Ednie, and E. S. Bennett. Sialic acids attached to o-glycans modulate voltage-gated potassium channel gating. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6):4123–4132, 2011.
- [43] C. A. Ecelbarger, J. Terris, G. Frindt, M. Echevarria, D. Marples, S. Nielsen, and M. A. Knepper. Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 269(5):F663–F672, 1995.
- [44] S. Nielsen, L. S. King, B. M. Christensen, and P. Agre. Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 273(5):C1549–C1561, 1997.
- [45] L. N. Nejsum, T.-H. Kwon, U. B. Jensen, O. Fumagalli, J. Frøkiaer, C. M. Krane, A. G. Menon, L. S. King, P. C. Agre, and S. Nielsen. Functional requirement of aquaporin-5 in plasma membranes of sweat glands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1):511–516, 2002.
- [46] S. Hamann, T. Zeuthen, M. La Cour, E. A. Nagelhus, O. P. Ottersen, P. Agre, and S. Nielsen. Aquaporins in complex tissues: Distribution of aquaporins 1–5 in human and rat eye. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 274(5):C1332–C1345, 1998.
- [47] M. Boury-Jamot, J. Daraspe, F. Bonté, E. Perrier, S. Schnebert, M. Dumas, and J.-M. Verbavatz. Skin aquaporins: Function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis: Aquaporins. volume 190 of *Handbook of Experimental Pharmacology*, pages 205–217. Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- [48] A. Verkman, M. Hara-Chikuma, and M. Papadopoulos. Aquaporins - new players in cancer biology. *Journal of Molecular Medicine*, 86(5):523–529, 2008.
- [49] M. W. Nirenberg and J. H. Matthaei. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 47:1588–1602, 1961.

- [50] F. Katzen, G. Chang, and W. Kudlicki. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends in Biotechnology*, 23(3):150–156, 2005.
- [51] L. Jermutus, L. A. Ryabova, and A. Plückthun. Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(5):534–548, 1998.
- [52] D. Schwarz, F. Junge, F. Durst, N. Frölich, B. Schneider, S. Reckel, S. Sobhanifar, V. Dötsch, and F. Bernhard. Preparative scale expression of membrane proteins in Escherichia coli-based continuous exchange cell-free systems. *Nature Protocols*, 2(11):2945–2957, 2007.
- [53] B. Schneider, F. Junge, V. A. Shirokov, F. Durst, D. Schwarz, V. Dötsch, and F. Bernhard. Membrane protein expression in cell-free systems. *Methods in Molecular Biology*, 601:165–186, 2010.
- [54] A. R. Goerke and J. R. Swartz. Development of cell-free protein synthesis platforms for disulfide bonded proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(2):351–367, 2008.
- [55] M. Arduengo, E. Schenborn, and R. Hurst. Cell free expression. Landes Bioscience, 2007.
- [56] D. Schwarz, C. Klammt, A. Koglin, F. Löhr, B. Schneider, V. Dötsch, and F. Bernhard. Preparative scale cell-free expression systems: New tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. *Methods*, 41(4):355–369, 2007.
- [57] F. Junge, S. Haberstock, C. Roos, S. Stefer, D. Proverbio, V. Dötsch, and F. Bernhard. Advances in cell-free protein synthesis for the functional and structural analysis of membrane proteins: Advances in cell-free protein expression. *New Biotechnology*, 28(3):262–271, 2011.
- [58] C. Klammt, D. Schwarz, F. Löhr, B. Schneider, V. Dötsch, and F. Bernhard. Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein. *The FEBS journal*, (18):4141–4153, 2006.

- [59] S. Sobhanifar, S. Reckel, F. Junge, D. Schwarz, L. Kai, M. Karbyshev, F. Löhr, F. Bernhard, and V. Dötsch. Cell-free expression and stable isotope labelling strategies for membrane proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, 46:33–43, 2010.
- [60] K. Ozawa, K. V. Loscha, K. V. Kuppan, C. T. Loh, N. E. Dixon, and G. Otting. High-yield cell-free protein synthesis for site-specific incorporation of unnatural amino acids at two sites. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418(4):652–656, 2012.
- [61] L. Kai, R. Kaldenhoff, J. Lian, X. Zhu, V. Dötsch, F. Bernhard, P. Cen, and Z. Xu. Preparative scale production of functional mouse aquaporin 4 using different cell-free expression modes. *PLoS ONE*, 5(9):e12972, 2010.
- [62] C. Klammt, D. Schwarz, K. Fendler, W. Haase, V. Dötsch, and F. Bernhard. Evaluation of detergents for the soluble expression of α -helical and β -barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *The FEBS journal*, (23):6024–6038, 2005.
- [63] N. T. Hovijitra, J. J. Wu, B. Peaker, and J. R. Swartz. Cell-free synthesis of functional aquaporin Z in synthetic liposomes, 2009.
- [64] E. N. Lyukmanova, Z. O. Shenkarev, N. F. Khabibullina, G. S. Kopeina, M. A. Shulepko, A. S. Paramonov, K. S. Mineev, R. V. Tikhonov, L. N. Shingarova, L. E. Petrovskaya, D. A. Dolgikh, A. S. Arseniev, and M. P. Kirpichnikov. Lipid-protein nanodiscs for cell-free production of integral membrane proteins in a soluble and folded state: Comparison with detergent micelles, bicelles and liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(3):349–358, 2012.
- [65] O. Shimomura, F. H. Johnson, and Y. Saiga. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59(3):223–239, 1962.
- [66] H. Morise, O. Shimomura, F. H. Johnson, and J. Winant. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry*, 13(12):2656–2662, 1974.

- [67] A. B. Cubitt, R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, and R. Y. Tsien. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(11):448–455, 1995.
- [68] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, and M. J. Cormier. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2):229–233, 1992.
- [69] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148):802–805, 1994.
- [70] S. Inouye and F. I. Tsuji. *Aequorea* green fluorescent protein: Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Letters*, 341(2–3):277–280, 1994.
- [71] R. Y. Tsien. The green fluorescent protein. *Annual Reviews Biochemistry*, 67(1):509–544, 1998.
- [72] Y. Takeuchi, G. Yoshizaki, and T. Takeuchi. Green fluorescent protein as a cell-labeling tool and a reporter of gene expression in transgenic rainbow trout. *Marine Biotechnology*, 1(5):448–457, 1999.
- [73] B. Ju, Y. Xu, J. He, J. Liao, T. Yan, C. L. Hew, T. J. Lam, and Z. Gong. Faithful expression of green fluorescent protein (gfp) in transgenic zebrafish embryos under control of zebrafish gene promoters. *Developmental Genetics*, 25(2):158–167, 1999.
- [74] Y. A. Yu, K. Oberg, G. Wang, and A. A. Szalay. Visualization of molecular and cellular events with green fluorescent proteins in developing embryos: A review. *Luminescence*, 18(1):1–18, 2003.
- [75] M. Zernicka-Goetz, J. Pines, S. Hunter McLean, J. P. Dixon, K. R. Siemering, J. Haseloff, and M. J. Evans. Following cell fate in the living mouse embryo. *Development*, 124(6):1133–1137, 1997.
- [76] V. A. Romoser, P. M. Hinkle, and A. Persechini. Detection in living cells of ca^{2+} -dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of

- two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 272(20):13270–13274, 1997.
- [77] B. A. Pollok and R. Heim. Using gfp in fret-based applications. *Trends in Cell Biology*, 9(2):57–60, 1999.
- [78] Kazuya Kikuchi. Design, synthesis and biological application of chemical probes for bio-imaging. *Chemical Society Reviews*, 39:2048–2053, 2010.
- [79] F. Yang, L. G. Moss, and G. N. Phillips. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 14(10):1246–1251, 1996.
- [80] G. S. Waldo, B. M. Standish, J. Berendzen, and T. C. Terwilliger. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 17(7):691–695, 1999.
- [81] D. Drew, M. Lerch, E. Kunji, D.-J. Slotboom, and J.-W. de Gier. Optimization of membrane protein overexpression and purification using gfp fusions. *Nature Methods*, 3(4):303–313, 2006.
- [82] E. R. Geertsma, M. Groeneveld, D.-J. Slotboom, and B. Poolman. Quality control of overexpressed membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15):5722–5727, 2008.
- [83] Y. Ashikawa, M. Ihara, N. Matsuura, Y. Fukunaga, Y. Kusakabe, and A. Yamashita. Gfp-based evaluation system of recombinant expression through the secretory pathway in insect cells and its application to the extracellular domains of class c gpcrs. *Protein Science*, 20(10):1720–1734, 2011.
- [84] M. N. Chekulayeva, O. V. Kurnasov, V. A. Shirokov, and A. S. Spirin. Continuous-exchange cell-free protein-synthesizing system: Synthesis of HIV-1 antigen Nef. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(3):914–917, 2001.
- [85] Akira Nozawa, Tomio Ogasawara, Satoko Matsunaga, Takahiro Iwasaki, Tatsuya Sawasaki, and Yaeta Endo. Production and partial purification of membrane proteins using a liposome-supplemented wheat cell-free translation system. *BMC Biotechnology*, 11(1):35, 2011.

- [86] N. J. Greenfield. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6):2876–2890, 2007.
- [87] S. M. Kelly, T. J. Jess, and N. C. Price. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins & Proteomics*, 1751(2):119–139, 2005.
- [88] O. Gursky, Ranjana, and D. L. Gantz. Complex of human apolipoprotein C-1 with phospholipid: Thermodynamic or kinetic stability? *Biochemistry*, 41(23):7373–7384, 2002.
- [89] S. Benjwal, S. Verma, K.-H. Röhm, and O. Gursky. Monitoring protein aggregation during thermal unfolding in circular dichroism experiments. *Protein Science*, 15(3):635–639.
- [90] E. R. Geertsma, N. A. Nik Mahmood, G. K. Schuurman-Wolters, and B. Poolman. Membrane reconstitution of abc transporters and assays of translocator function. *Nature Protocols*, 3(2):256–266, 2008.
- [91] L. Verdoucq, A. Grondin, and C. Maurel. Structure-function analysis of plant aquaporin AtPIP2;1 gating by divalent cations and protons. *Biochemical Journal*, 415(3):409–416, 2008.
- [92] K. Yakata, Y. Hiroaki, K. Ishibashi, E. Sohara, S. Sasaki, K. Mitsuoka, and Y. Fujiyoshi. Aquaporin-11 containing a divergent npa motif has normal water channel activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768(3):688–693, 2007.
- [93] J. von Bülow. *Sind Aquaporine an der Zellwanderung beteiligt?* PhD thesis, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2012.
- [94] A. S. Edge, C. R. Faltynek, L. Hof, L. E. Reichert, and P. Weber. Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. *Analytical Biochemistry*, 118(1):131–137, 1981.
- [95] H. T. Sojar and O. P. Bahl. A chemical method for the deglycosylation of proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 259(1):52–57, 1987.

- [96] J. Song, A. Almasalmeh, D. Krenc, and E. Beitz. Molar concentrations of sorbitol and polyethylene glycol inhibit the Plasmodium aquaglyceroporin but not that of E. coli: Involvement of the channel vestibules. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(5):1218–1224, 2012.
- [97] T. Zeuthen, B. Wu, S. Pavlovic-Djuranovic, L. M. Holm, N. L. Uzcategui, M. Duszenko, J. F. Kun, J. E. Schultz, and E. Beitz. Ammonia permeability of the aquaglyceroporins from Plasmodium falciparum, Toxoplasma gondii and Trypanosoma brucei. *Molecular Microbiology*, 61(6):1598–1608, 2006.
- [98] S. Pavlovic-Djuranovic, J. F. Kun, J. E. Schultz, and E. Beitz. Dihydroxyacetone and methylglyoxal as permeants of the plasmodium aquaglyceroporin inhibit parasite proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(8):1012 – 1017, 2006.
- [99] E. Beitz, S. Pavlovic-Djuranovic, M. Yasui, P. Agre, and J. E. Schultz. Molecular dissection of water and glycerol permeability of the aquaglyceroporin from Plasmodium falciparum by mutational analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(5):1153–1158, 2004.
- [100] M. Hansen, J. F. Kun, J. E. Schultz, and E. Beitz. A Single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage Plasmodium falciparum malaria parasites. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7):4874–4882, 2002.
- [101] C. C. Chow, C. Chow, V. Raghunathan, T. J. Huppert, E. B. Kimball, and S. Cavagnero. Chain length dependence of apomyoglobin folding: A structural evolution from misfolded sheets to native helices. *Biochemistry*, 42(23):7090–7099, 2003.
- [102] F. Öberg, J. Sjöhamn, G. Fischer, A. Moberg, A. Pedersen, R. Neutze, and K. Hedfalk. Glycosylation increases the thermostability of human aquaporin 10 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(36):31915–31923, 2011.
- [103] A. Veerappan, F. Cymer, N. Klein, and D. Schneider. The tetrameric α -helical membrane protein GlpF unfolds via a dimeric folding intermediate. *Biochemistry*, 50(47):10223–10230, 2011.

- [104] Y. Tong, D. Hughes, L. Placanica, and M. Buck. When monomers are preferred: A strategy for the identification and disruption of weakly oligomerized proteins. *Structure*, 13(1):7 – 15, 2005.
- [105] J. Knol, K. Sjollem, and B. Poolman. Detergent-mediated reconstitution of membrane proteins. *Biochemistry*, 37(46):16410–16415, 1998.
- [106] J.-L. Rigaud, D. Lévy, and D. Nejat. Reconstitution of membrane proteins into liposomes. In *Methods in Enzymology*, volume Volume 372, pages 65–86. Academic Press, 2003.
- [107] M. J. Borgnia, D. Kozono, G. Calamita, P. C. Maloney, and P. Agre. Functional reconstitution and characterization of AqpZ, the E. coli water channel protein. *Journal of Molecular Biology*, 291(5):1169–1179, 1999.
- [108] N. Lucien, F. Sidoux-Walter, N. Roudier, P. Ripoché, M. Huet, M.-M. Trinh-Trang-Tan, J.-P. Cartron, and P. Bailly. Antigenic and functional properties of the human red blood cell urea transporter hUT-B1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37):34101–34108, 2002.
- [109] M. Traub, M. Flörchinger, J. Piecuch, H.-H. Kunz, A. Weise-Steinmetz, J. W. Deitmer, H. Ekkehard Neuhaus, and T. Möhlmann. The fluorouridine insensitive 1 (fur1) mutant is defective in equilibrative nucleoside transporter 3 (ENT3), and thus represents an important pyrimidine nucleoside uptake system in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 49(5):855–864, 2007.
- [110] T. Möhlmann, Z. Mezher, G. Schwerdtfeger, and H. E. Neuhaus. Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from *Arabidopsis thaliana* (ENT1,At). *FEBS Letters*, 509(3):370 – 374, 2001.
- [111] C. Bernard, M. Traub, H.-H. Kunz, S. Hach, O. Trentmann, and T. Möhlmann. Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) is critical for pollen germination and vegetative growth in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 62(13):4627–4637, 2011.
- [112] F. D’Herelle. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: Brief note by Mr. F. D’Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Research in Microbiology*, 158(7):553 – 554, 2007.

- [113] T. Alber, D. P. Sun, J. A. Nye, D. C. Muchmore, and B. W. Matthews. Temperature-sensitive mutations of bacteriophage T4 lysozyme occur at sites with low mobility and low solvent accessibility in the folded protein. *Biochemistry*, 26(13):3754–3758, 1987.
- [114] N.C. Price. *The determination of protein concentration*. Enzymology Labfax. Bios Scientific Publishers, Oxford, 1996.
- [115] T. K. Chaudhuri, K. Horii, T. Yoda, M. Arai, S. Nagata, T. P. Terada, H. Uchiyama, T. Ikura, K. Tsumoto, H. Kataoka, M. Matsushima, K. Kuwajima, and I. Kumagai. Effect of the extra n-terminal methionine residue on the stability and folding of recombinant α -lactalbumin expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 285(3):1179–1194, 1999.
- [116] M. Udovicic, K. Bazdaric, L. Bilic-Zulle, and M. Petrovecki. What we need to know when calculating the coefficient of correlation? *Biochemia Medica*, 17(1):10–5, 2007.
- [117] F. Zhu, E. Tajkhorshid, and K. Schulten. Molecular dynamics study of aquaporin-1 water channel in a lipid bilayer. *FEBS Letters*, 504(3):212 – 218, 2001.
- [118] D. Lévy, A. Bluzat, M. Seigneuret, and J.-L. Rigaud. A systematic study of liposome and proteoliposome reconstitution involving Bio-Bead-mediated Triton X-100 removal. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1025(2):179 – 190, 1990.
- [119] J. R. Philippot, S. Mutaftschiev, and J. P. Liautard. Extemporaneous preparation of large unilamellar liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 821(1):79–84, 1985.
- [120] M. Ueno, C. Tanford, and J. A. Reynolds. Phospholipid vesicle formation using nonionic detergents with low monomer solubility. Kinetic factors determine vesicle size and permeability. *Biochemistry*, 23(13):3070–3076, 1984.
- [121] W. G. Hill and M. L. Zeidel. Reconstituting the barrier properties of a water-tight epithelial membrane by design of leaflet-specific liposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(39):30176–30185, 2000.

- [122] M. Echevarria, E. E. Windhager, and G. Frindt. Selectivity of the renal collecting duct water channel aquaporin-3. *Journal of Biological Chemistry*, 271(41):25079–25082, 1996.
- [123] T. Ma, A. Frigeri, H. Hasegawa, and A. S. Verkman. Cloning of a water channel homolog expressed in brain meningeal cells and kidney collecting duct that functions as a stilbene-sensitive glycerol transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 269(34):21845–21849, 1994.
- [124] G.-J. Kremers, J. Goedhart, E. B. van Munster, and T. W. Gadella. Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Förster radius. *Biochemistry*, 45(21):6570–6580, 2006.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die Abhandlung, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist. Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ein großer Teil dieser Arbeit wurde unter den folgenden Titeln publiziert:

- Annika Müller-Lucks, Sinja Bock, Binghua Wu und Eric Beitz. Fluorescent *in situ* folding control for rapid optimization of cell-free membrane protein synthesis. *PLoS One*, 7(7): e42186, 2012
- Julia von Bülow, Annika Müller-Lucks, Lei Kai, Frank Bernhard und Eric Beitz. Functional characterization of a novel aquaporin from *Dictyostelium discoideum* amoebae implies a unique gating mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10): 7487-94, 2012

Die Arbeit ist entstanden unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Annika Müller-Lucks

Kiel, Oktober 2012

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Annika Müller-Lucks

Geburtsdatum 29.09.1983

Geburtsort Preetz/Plön

Nationalität Deutsch

Schule und Studium

Jun. 2003 Abitur an der Hebbelschule Kiel

Okt. 2003 - Mai 2008 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Sep. 2006 - Feb. 2007 Auslandssemester an der Faculté de Pharmacie der Université Henri Poincaré in Nancy, Frankreich

Mai 2008 - Okt. 2008 Pharmaziepraktikum bei der Condor Apotheke Kiel

Nov. 2008 - Apr. 2009 Pharmaziepraktikum am Bayer HealthCare Research Center, Wuppertal

Jul. 2009 Approbation als Apothekerin

Promotion

Seit Sep. 2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der CAU zu Kiel und Promotion zum Thema: „Optimierung der zellfreien Proteinsynthese durch Etablierung einer schnellen *in-situ* Faltungskontrolle mittels GFP-Fusion“ unter der Leitung von Prof. Dr. Eric Beitz; Betreuung des 5. Fachsemesters Pharmazie (Arzneibuchanalytik).

Vorträge

„Rapid optimization of cell-free expression and functional characterization of the *Plasmodium falciparum* aquaglyceroporin“, 8th Transport Colloquium, Rauschholzhausen

Publikationen

- Annika Müller-Lucks, Sinja Bock, Binghua Wu und Eric Beitz. Fluorescent *in situ* folding control for rapid optimization of cell-free membrane protein synthesis. *PLoS One*, 7(7):e42186, 2012
- Julia von Bülow, Annika Müller-Lucks, Lei Kai, Frank Bernhard und Eric Beitz. Functional characterization of a novel aquaporin from *Dictyostelium discoideum* amoebae implies a unique gating mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10):7487-94, 2012

Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Eric Beitz unter dessen Leitung diese Arbeit entstanden ist, dafür dass er mir dieses spannende Thema überlassen hat und nachhaltig mein Interesse an der zellfreien Proteinsynthese geweckt hat. Ebenso sei ihm gedankt für die stets offene Tür und spannende Diskussionen.

Vielen Dank auch an Dr. Frank Bernhard und Lei Kai von der Uni Frankfurt für die Einführung in die zellfreie Proteinsynthese und geduldige Beantwortung aller meiner Fragen.

Meinem gesamten Arbeitskreis möchte ich für die schöne Zeit in stets freundschaftlicher Atmosphäre und die vielfältige Unterstützung danken. Dabei ganz besonderer Dank an Sinja für das Korrekturlesen der Arbeit und an Julia für die Betreuung während meiner ersten Wochen im neuen Arbeitskreis und vor allem für ihre Hilfe in 1000 kleinen Dingen, sowie für stets ermunternde Worte.

Ina, Danilo und Jie vielen Dank für die nette Zeit im Praktikum und für viele durchlittene Stunden vor kaputten HPLCs.

Vielen Dank an meine lieben Freunde, die stets viel Verständnis hatten, immer interessiert und immer da waren. Ganz besonders vielen Dank an Steffi für die viele Unterstützung, sowohl mental als auch in Form von Care-Paketen;-)

Einen großen Dank auch an Mira und Erik, die die besten Geschwister der Welt sind. Sowie an meine Eltern Birthe und Benedikt für die riesige Unterstützung, ihre beständige Liebe und ihr aufrichtiges Interesse. Meiner Mutter zusätzlich vielen Dank für die akribische Durchsicht dieser Arbeit. Mein größter Dank gilt Henning, der in jeder Minute für mich da war und so viel für mich getan hat, dass man es hier nicht auflisten kann.