



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Protein-Protein- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen
beeinflussen die Oligomerisierung und Funktion des
E. coli Aquaglyceroporins GlpF

Dissertation zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.

Noreen Klein
geb. in Wiesbaden
Mainz, den 05.02.15

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

3. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.15

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Klein, N., N. Hellmann, and D. Schneider. 2015. Anionic lipids modulate the activity of the aquaglyceroporin GlpF. *Biophys J* (in Revision).

Klein, N., J. Neumann, J. D. O'Neil, and D. Schneider. 2015. Folding and stability of the aquaglyceroporin GlpF: Implications for human aqua(glycero)porin diseases. *Biochim Biophys Acta* 1848:622-633.

Neumann, J., **N. Klein**, D. E. Otzen, and D. Schneider. 2014. Folding energetics and oligomerization of polytopic alpha-helical transmembrane proteins. *Arch. Biochem Biophys.* 546:281-296.

Neumann, J., **N. Klein**, and D. Schneider. 2012. Wie falten Membranproteine? — Schritt für Schritt!? *Biospektrum* 18:146-148.

Veerappan, A., F. Cymer, **N. Klein**, and D. Schneider. 2011. The tetrameric alpha-helical membrane protein GlpF unfolds via a dimeric folding intermediate. *Biochemistry* 50:10223-10230.

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen in Vorbereitung:

Klein, N., J. Franz, H. Li, T. Weidner, V. Sourjik, und D. Schneider. 2015. The local anesthetic 2-phenylethanol modulates the structure and activity of transmembrane proteins by induction of ordered lipid domains.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1 Biologische Membranen und integrale Membranproteine.....	3
1.1.1 Aufbau biologischer Membranen.....	3
1.1.1.1 Lipidkomponenten biologischer Membranen.....	3
1.1.1.2 Lipidpolymorphismus und Organisation biologischer Membranen.....	5
1.1.2 Struktur von Membranproteinen.....	9
1.1.2.1 Faltung von Membranproteinen.....	10
1.1.2.1.1 Helix-Helix-Assoziationen in Lipidmembranen.....	11
1.1.3 Einfluss der Lipidumgebung auf die Struktur, Stabilität und Aktivität von integralen Membranproteinen.....	12
1.1.3.1 Lipidvermittelter Wirkmechanismus von Anästhetika.....	15
1.2 Aquaporine und Aquaglyceroporine.....	15
1.2.1 Humane Aquaporine.....	16
1.2.2 Aufbau und Struktur der Aquaporine.....	18
1.2.2.1 Tetramerisierung der Aquaporine in biologischen Membranen.....	20
1.2.2.2 Der Aquaporin-Kanal am Beispiel des bakteriellen Aquaglyceroporins GlpF.....	21
1.2.2.3 Stereoselektivität des Substratflusses und Inhibition des Protonenflusses.....	23
1.2.3 Aquaporine in Lipidmembranen.....	24
1.3 Motivation und Ziele der Arbeit.....	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Chemikalien.....	27
2.1.2 Enzyme.....	27
2.1.3 Kits und Größenstandards.....	27
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.5 Geräte.....	28
2.1.6 Puffer und Kulturmedien.....	30
2.1.7 Bakterienstämme.....	33
2.1.8 Antikörper.....	34
2.1.9 Plasmide.....	34
2.1.10 Oligonukleotide.....	35
2.1.11 Computerprogramme.....	35
2.2 Methoden.....	36
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	36

2.2.1.2	Präparativer und analytischer Restriktionsverdau	36
2.2.1.3	Agarosegelelektrophorese zur Analyse und Isolierung von Nukleinsäuren	36
2.2.1.4	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	37
2.2.1.5	DNA-Konzentrationsbestimmung	37
2.2.1.6	Ligation	37
2.2.1.7	DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion	37
2.2.1.8	Klonierungsstrategien	38
2.2.1.8.1	Ortspezifische Mutagenese	38
2.2.1.8.2	Klonierung der GlpF-Fusionskonstrukte	39
2.2.1.8.3	Klonierung von pVenus-GlpF	41
2.2.1.9	DNA-Sequenzierung.....	41
2.2.2	Mikrobiologische Methoden.....	42
2.2.2.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	42
2.2.2.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	42
2.2.2.3	Kultivierung von <i>E. coli</i>	43
2.2.3	Biochemische Methoden	43
2.2.3.1	SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)-Analyse	43
2.2.3.2	Coomassie-Färbung	44
2.2.3.3	Western Blot-Analyse und immunochemischer Nachweis	44
2.2.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	45
2.2.3.5	Membranpräparation	45
2.2.3.6	Proteinreinigung mittels immobilisierter Metallionen Affinitäts-Chromatographie	46
2.2.3.7	Präparative Gelpermeationschromatographie.....	46
2.2.3.8	Funktionelle Rekonstitution von GlpF in Proteoliposomen.....	47
2.2.3.9	SDS-Titration zur Untersuchung der Proteinstabilität.....	47
2.2.3.10	GALLEX.....	47
2.2.4	Biophysikalische Methoden	48
2.2.4.1	Aktivitäts-Test für GlpF	48
2.2.4.2	Laurdan Fluoreszenzspektroskopie.....	50
2.2.4.3	Dynamische Lichtstreuung zur Größenbestimmung der Proteoliposomen.....	51
2.2.4.4	Summenfrequenzerzeugungsspektroskopie	52
2.2.4.5	Brewster-Winkel-Mikroskopie	53
3	Ergebnisse.....	55
3.1	Funktion und Oligomerisierung fusionierter GlpF-Monomere.....	55
3.1.1	Die Aktivität von GlpF nimmt mit dem Grad der Fusion zu	55
3.1.2	Die Tetramer-Aktivität korreliert mit dem Anteil an Wildtyp-Monomeren	57
3.1.3	Die fusionierten GlpF-Homooligomere bilden intermolekulare Wechselwirkungen aus 60	
3.1.4	Die Stabilität des GlpF-Tetramers aus fusionierten GlpF-Dimeren ist unverändert.....	61
3.2	Einfluss definierter Phospholipide auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF	64

3.2.1	Eine minimale Acylkettenlänge ist notwendig für die GlpF-Aktivität.....	64
3.2.2	PE-induzierte Änderungen des lateralen Drucks in der Acylkettenregion beeinflussen die GlpF-Aktivität nicht.....	69
3.2.3	Die GlpF-Aktivität wird durch anionische Lipide eingeschränkt	70
3.3	<i>In vivo</i> Einfluss veränderter physikochemischer Membraneigenschaften auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF.....	74
3.3.1	2-PEtOH induziert die Bildung von Lipiddomänen	74
3.3.2	Physiologische Bedeutung der durch 2-PEtOH induzierten Lipiddomänen.....	77
3.4	GlpF als Modell für humane Aquaporine: Einfluss einer Punktmutation auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF.....	81
3.4.1	Strukturelle Voraussetzungen	81
3.4.2	Die <i>in vivo</i> Assemblierung der GlpF-Mutante V71M ist nicht beeinträchtigt	83
3.4.3	Die Mutation V71M beeinflusst die GlpF-Funktion nicht	84
4	Diskussion.....	87
4.1	Funktion und Oligomerisierung fusionierter GlpF-Monomere.....	87
4.1.1	Fusionierte GlpF-Homooligomere bilden Tetramere aus	87
4.1.2	Die kovalente Verknüpfung der GlpF C- und N-Termini erhöht die GlpF-Aktivität.....	89
4.1.3	Interaktion der GlpF-Monomere im Tetramer.....	90
4.2	Einfluss definierter Phospholipide auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF	93
4.2.1	Eine ausreichende Abschirmung der hydrophoben GlpF-Oberfläche ist wichtig für die GlpF-Funktion.....	93
4.2.2	Änderungen des lateralen Drucks in der Acylkettenregion beeinflussen die rigide GlpF-Tetramerstruktur und -Aktivität nicht.....	94
4.2.3	Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen anionischen Lipiden und basischen GlpF-Aminosäuren inaktivieren den Glycerolkanal	95
4.2.4	Weder für die GlpF-Tetramerisierung noch die GlpF-Aktivität ist eine spezielle Lipidumgebung erforderlich	97
4.3	<i>In vivo</i> Einfluss veränderter physikochemischer Membraneigenschaften auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF.....	99
4.3.1	2-PEtOH induziert die Bildung lateraler Lipiddomänen unterschiedlicher Ordnung	99
4.3.1.1	GlpF aggregiert in den Lipiddomänen höherer Ordnung.....	101
4.3.1.2	Lipiddomänenbildung als weiterer Aspekt des lipidvermittelten Wirkmechanismus von Anästhetika	102
4.4	GlpF als Modell für humane Aquaporine: Einfluss einer Punktmutation auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF.....	103

4.4.1	Strukturelle Anpassungen in GlpF gewährleisten vermutlich den unveränderten Substratfluss	103
4.4.2	Physiologische Relevanz der Ergebnisse	105
5	Literaturverzeichnis	107
6	Abkürzungsverzeichnis	121
7	Abbildungsverzeichnis	125
8	Tabellenverzeichnis	127
9	Anhang	129
9.1	Material und Methoden	129
9.2	Funktion und Oligomerisierung fusionierter GlpF-Monomere	131
9.3	Einfluss definierter Phospholipide auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF	134
9.4	<i>In vivo</i> Einfluss veränderter physikochemischer Membraneigenschaften auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF	137
9.5	GlpF als Modell für humane Aquaporine: Einfluss einer Punktmutation auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF	140
	Danksagung	142
	Lebenslauf	143

Zusammenfassung

Aquaporine sind hochselektive Transmembrankanäle, die in allen Lebensformen den Fluss von Wasser und kleinen, polaren Molekülen wie Glycerol über Lipidmembranen ermöglichen. Obwohl die Kanalpore für den Substratfluss im Monomer lokalisiert ist, liegen Aquaporine innerhalb biologischer Membranen als Homotetramere vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurden proteinbezogene und lipidmembranassoziierte Einflüsse auf die Oligomerisierung und Funktion des bakteriellen Aquaglyceroporins GlpF sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. *In vivo* ist durch die kovalente Verknüpfung der C- und N-Termini der Monomere die GlpF-Aktivität erhöht. Die eingeschränkte Konformationsfreiheit der GlpF-Termini unterstützt wahrscheinlich Interaktionen, die wichtig für die Stabilität bzw. Konformation der rigiden Aquaporinpore sind. Untersuchungen an fusionierten GlpF-Heterotetrameren, bestehend aus variierenden Anteilen an wildtypischen und mutierten Monomeren mit eingeschränkter Aktivität, zeigten, dass nicht jedes Monomer als unabhängiger Kanal im Tetramer fungiert.

In vitro im liposomalen Modellmembransystem wurde ersichtlich, dass weder für die GlpF-Oligomerisierung noch für die -Aktivität spezielle Lipide erforderlich sind. So lag GlpF in Membranen aus reinen Phosphatidylcholin-Lipiden, die nicht in der natürlichen Membrenumgebung von GlpF vorkommen, ab einer minimalen Acylkettenlänge von 27 Å hauptsächlich als Tetramer vor und hohe Substratflussraten wurden verzeichnet. Änderungen des lateralen Druckprofils der Membran beeinflussten weder die Tetramerisierung noch den Substratfluss. Anionische Lipide störten dagegen die GlpF-Funktion, ohne jedoch die GlpF-Oligomerisierung zu beeinflussen. Diese Resultate lassen die Schlussfolgerung zu, dass auch *in vivo* durch die selektive Anreicherung von anionischen Lipiden in der unmittelbaren Proteinumgebung, die Aktivität von GlpF reguliert werden kann.

In vivo wurde der Einfluss von durch 2-Phenylethanol induzierten Änderungen der physikochemischen Membraneigenschaften auf die GlpF charakteristische Oligomerisierung und Funktion analysiert. Diese Untersuchungen zeigten, dass das Anästhetikum 2-Phenylethanol nicht nur, wie bisher beschrieben, die Ordnung von Lipidmembranen reduziert, sondern in *Escherichia coli*-Membranen die Bildung von Lipidomänen induziert, die sich im Ordnungsgrad der Acylketten unterscheiden. Das Aquaglyceroporin GlpF scheint in den phasenseparierten Lipidmembranen in den Domänen höherer Ordnung lokalisiert zu sein, in denen die GlpF-Tetramere möglicherweise aufgrund ungünstiger Interaktionen mit den umgebenden Lipiden oder der erhöhten lokalen Konzentration zu höheren Aggregaten mit signifikant reduzierter Aktivität assemblieren. Die durch 2-Phenylethanol induzierte laterale Reorganisation der Lipide in Systemen mit heterogener Lipidzusammensetzung weist darüber hinaus auf einen neuen Aspekt im lipidvermittelten Wirkmechanismus des Anästhetikums 2-Phenylethanol hin.

Die Konsequenzen der mit *nephrogenen Diabetes insipidus* assoziierten Aquaporin 2-Punktmutation V71M auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaporins wurden am homologen, bakteriellen Aquaglyceroporin GlpF untersucht. Grundlage dieser Untersuchung war die allgemein hochkonservierte Tertiär- sowie Quartärstruktur der Aquaporine und im Speziellen die hohe Konservierung der Primärstruktur im Bereich der Mutation. Da die Substitution des in die Translokationspore gerichteten Valins durch Methionin weder die Oligomerisierung noch die Aktivität des homologen, bakteriellen Aquaglyceroporins eingeschränkte, beruht der Krankheitsmechanismus der Aquaporin 2-Mutante V71M vermutlich auf einem defekten Transportmechanismus im Menschen.

Die erhöhte Stabilität der Aquaporinpore und die Interaktion zwischen den GlpF-Monomeren sind, basierend auf den Erkenntnissen dieser Arbeit, Triebkräfte der Aquaporin-Tetramerisierung. Ferner erfordern die Tetramerisierung und Aktivität des Aquaglyceroporins GlpF in der flüssig-kristallinen Phase, sowie bei Abschirmung der Ladung negativer Lipidkopfgruppen und einer bestimmten Membrandicke keine spezielle Lipidumgebung. Ungünstige Lipid-GlpF-Interaktionen können jedoch in Lipidumgebungen mit hoher Ordnung in der Acylkettenregion entstehen, die zu einer Aggregation der GlpF-Tetramere und reduzierten Aktivität führen.

1. Einleitung

2.1 Biologische Membranen und integrale Membranproteine

Alle lebenden Zellen sind von selektiv permeablen Membranen umgeben, die das Zellinnere von der Umgebung abgrenzen und in höheren Organismen unterschiedliche Reaktionsräume innerhalb der Zelle definieren. Die elementare Struktur biologischer Membranen ist die Lipiddoppelschicht, die für geladene und größere, polare Moleküle eine impermeable Barriere darstellt, während lipophile Substanzen durch eine Membran diffundieren können.

Ein wesentlicher Bestandteil biologischer Membranen sind Membranproteine, welche an einer großen Anzahl lebensnotwendiger Prozesse beteiligt sind. So kodieren etwa 20 bis 30% aller kodierenden Gene in jedem Lebewesen für Membranproteine (1, 2). Membranproteine beeinflussen in Form von Transportern, Rezeptoren und Kanälen selektiv die Permeabilität der Zelle bzw. der Kompartimente. Unter anderem ermöglichen sie den Transport von Ionen und Nährstoffen, die Signalübertragung sowohl nach Außen als auch in das Zellinnere, die Weiterleitung von elektrischen Signalen und die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Die relativen Protein- und Lipidanteile einer Membran können stark variieren und sind abhängig von der Zellfunktion. So weist die innere Mitochondrienmembran beispielsweise einen Proteinanteil von etwa 75% auf (3), die Myelinmembran dagegen besitzt nur einen Proteinanteil von etwa 20% (4).

Aufgrund der zentralen Bedeutung von Membranproteinen im Zellmetabolismus ist es nicht überraschend, dass Mutationen in Membranproteinen Ursache vieler Krankheiten sind. Diese Mutationen haben oft keinen direkten Einfluss auf die Proteinaktivität, sondern führen zur Fehlfaltung der betroffenen Proteine (5, 6). Überdies wird die physiologische Bedeutung der Membranproteine dadurch verdeutlicht, dass mehr als 50% der aktuell zugelassenen Medikamente an Membranproteinen wirken (7-9). Im Vergleich zu wasserlöslichen Proteinen sind die Kenntnisse über die Struktur und Funktionsweise von Membranproteinen jedoch gering (10, 11). So beträgt beispielsweise der Anteil an Membranproteinstrukturen in der Proteindatenbank (PDB, engl.: *Protein data bank*) nur etwa 2% (12). Im Folgenden sollen der generelle Aufbau biologischer Membranen, die Faltung von Membranproteinen und der Einfluss der Lipidmembran auf die Stabilität und Funktion von integralen Membranproteinen näher erläutert werden.

1.1.1 Aufbau biologischer Membranen

1.1.1.1 Lipidkomponenten biologischer Membranen

Die wesentlichen Lipidkomponenten einer biologischen Membran sind Glycerophospholipide, Sphingolipide, Glykolipide und Sterole. Die Glycerophospholipide, die auch einfach als Phospholipide bezeichnet werden, bestehen aus Glycerin-3-phosphat, das an den C1- und

C2-Stellen mit einer Fettsäure verestert ist (Phosphatidsäure) (vgl. Abbildung 1). Die Phospholipide Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylglycerol (PG) und Phosphatidylinositol (PI) entstehen durch Veresterung des Phosphatrests an der C3-Position mit einem weiteren Alkohol. Durch die Bindung eines zweiten Moleküls Phosphatidsäure an die PG-Glycerolkopfgruppe entsteht Diphosphatidylglycerin, das auch als Cardiolipin (CL) bezeichnet wird (Abbildung 1B). Während die Phosphat- und verschiedenen Kopfgruppen den polaren Teil des Lipids darstellen, bilden die Acylketten der Fettsäuren den unpolaren Teil eines Lipids (vgl. Abbildung 1A). Die Grenzfläche zwischen den hydrophoben Acylketten und den hydrophilen Lipidkopfgruppen wird durch Glycerol gebildet. Während PC und PE zwitterionische Lipide sind, stellen PS, PG, PI sowie CL anionische Lipide dar.

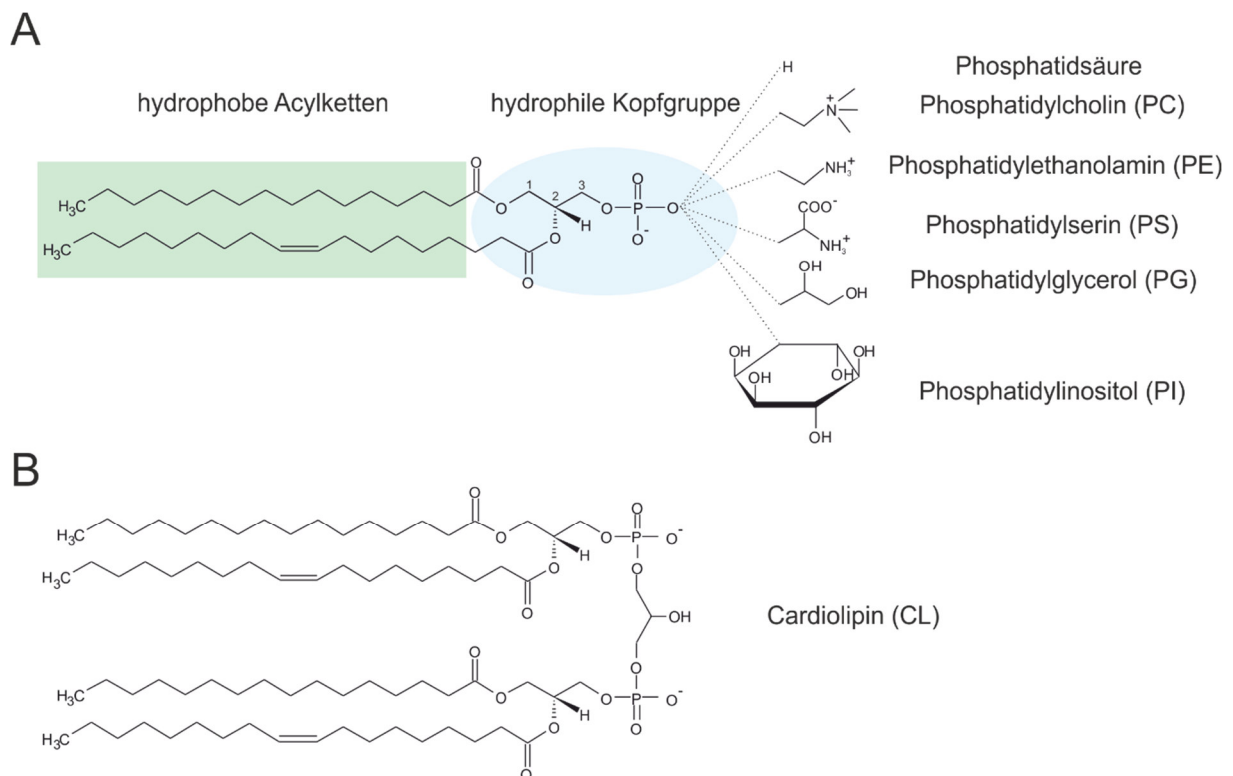


Abbildung 1: Struktur der Glycerophospholipide.

(A) Die Acylketten bilden den unpolaren Teil eines Lipids (grün hinterlegt) und die Phosphat- und verschiedenen Lipidkopfgruppen den polaren Teil des Lipids (blau hinterlegt). An der C1-Position der Phospholipide ist häufig eine gesättigte Acylkette zu finden, während die C2-Position mit einer ungesättigten Fettsäure verestert ist. Durch Veresterung des Phosphatrests an der C3-Position mit der Hydroxylgruppe der Aminoalkohole Cholin, Ethanolamin oder Serin entstehen die Phospholipide PC, PE bzw. PS. Die Veresterung mit dem dreiwertigen Alkohol Glycerol bzw. dem zyklischen Polyalkohol Inositol führt zu PG bzw. PI. (B) In Cardiolipin sind zwei Phosphatidyl-Reste durch ein Glycerolmolekül verknüpft.

Die Sphingolipide leiten sich von dem langkettigen Aminoalkohol Sphingosin ab, der über eine Amidbindung eine weitere Fettsäure binden kann. Sphingomyeline sind die häufigsten Sphingolipide und tragen entweder eine PC- oder PE-Kopfgruppe (vgl. Abbildung 1).

Die Acylketten der in Lipiden enthaltenen Fettsäurereste sind charakteristischerweise zwischen 10 und 24 Kohlenstoffatome lang und können gesättigt bzw. ungesättigt vorliegen. Acylketten in natürlichen Lipiden enthalten eine gerade Anzahl an Kohlenstoffatomen und Doppelbindungen liegen in der *cis*-Konformation vor. In der vollständig gestreckten Darstellung der Acylkette in Abbildung 1 beträgt der Torsionswinkel zwischen den gesättigten C-C-Bindungen 180° (*trans*-Konformation). Die *all-trans*-Konformation entspricht dem niedrigsten energetischen Zustand der Lipide. Neben der *trans*-Konformation können die gesättigten C-C-Bindungen auch die sogenannte *gauche*-Konformation mit einem Torsionswinkel von 60° einnehmen. Der *trans-gauche*-Übergang der Lipide ist temperaturabhängig. Phospholipide enthalten häufig an der C1-Position des Glycerols eine gesättigte Acylkette während an C2 eine ungesättigte Acylkette gebunden ist (13).

Neben den Glycerophospholipiden und Sphingolipiden kommen in biologischen Membranen auch Glykolipide vor. In diesen ist statt des Phosphats eine Kohlenhydratgruppe glykosidisch am Glycerol oder am Aminoalkohol Sphingosin gebunden.

Die vierte Gruppe der Lipidkomponenten einer eukaryotischen Membran sind die Sterole. So ist beispielsweise Cholesterol ein Hauptbestandteil tierischer Membranen. Im Gegensatz zu eukaryotischen Membranen sind in prokaryotischen Membranen im Allgemeinen keine Sterole vorhanden.

1.1.1.2 Lipidpolymorphismus und Organisation biologischer Membranen

Aufgrund des hydrophoben Effekts bilden die amphiphilen Lipidmoleküle in Wasser spontan höhermolekulare Aggregate aus. Diese Selbstaggregation führt abhängig von der Struktur der Lipide zu Doppelschichten, Mizellen oder invertierten Mizellen (vgl. Abbildung 2A/B). Die Struktur der Lipide wird durch das Verhältnis der Querschnittsflächen der Lipidkopfgruppe und der Acylketten bestimmt (14, 15). Zylindrische Typ 0-Lipide mit ähnlichen Querschnittsflächen der Lipidkopfgruppe und der Acylketten bilden Lipiddoppelschichten aus (15). Im Gegensatz dazu ist die Lipidkopfgruppe von Typ I-Lipiden im Vergleich zum Rest des Moleküls groß. Diese Lipide weisen eine invertiert konische Struktur auf und liegen bevorzugt in Mizellen mit einer positiven Krümmung vor (15). Die Struktur von Typ II-Lipide ist aufgrund verhältnismäßig kleiner Lipidkopfgruppen konisch. Daher bilden Typ II-Lipide invertierte Mizellen mit einer negativen Krümmung aus (15). Die mit diesen Aggregatstrukturen assoziierten Lipidphasen werden als lamellare Phase (L) und hexagonale Phase (H) I und II bezeichnet (Abbildung 2C). Darüber hinaus können Lipide in der kubischen Phase (Q) vorliegen, auf die hier nicht weiter eingegangen wird. Mittels der spontanen Krümmung (J_0) kann die Struktur-Aggregat-Beziehung der verschiedenen Lipide quantitativ erfasst werden (14). Die spontane Krümmung der Lipide stellt die Krümmung dar, die bei Selbstaggregation einer Lipidmonolage ohne Einwirkung weiterer Kräfte entsteht und kann experimentell mittels

Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS, engl.: *small-angle X-ray scattering*) bestimmt werden (16). Für zylindrische Typ 0-Lipide beträgt die spontane Krümmung etwa 0 und ist per Definition positiv für invertiert konische Typ I-Lipide und negativ für konische Typ II-Lipide. Im Allgemeinen liegt PC als Typ 0-Lipid in lamellaren Lipiddoppelschichten vor, während PE als Typ II-Lipid mit einer negativen spontanen Krümmung in der invers hexagonalen Phase vorliegt. Typ II-Lipide werden daher auch als nicht-doppelschichtenausbildende Lipide bezeichnet.

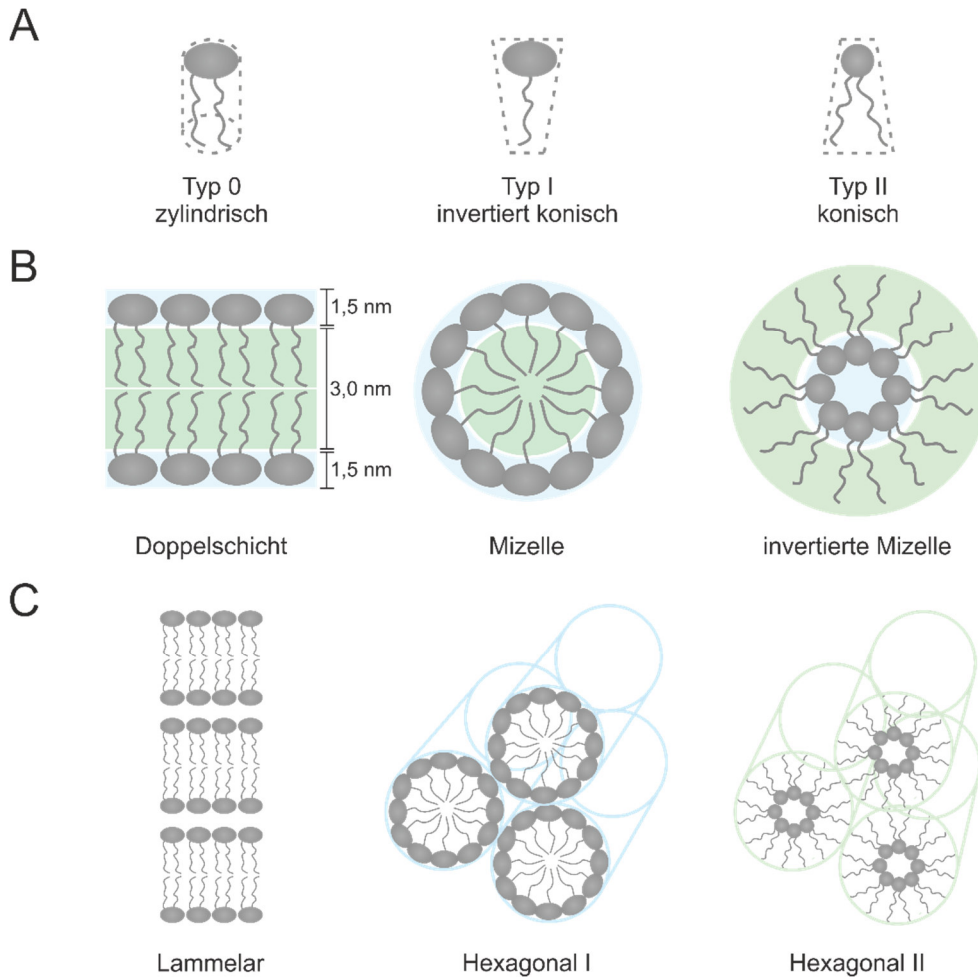


Abbildung 2: Lipidpolymorphismus und das korrespondierende Phasenverhalten.

(A) Basierend auf dem Verhältnis der Querschnittsfläche der polaren Lipidkopfgruppen und der unpolaren Acylketten werden zylindrische Typ 0-Lipide von invertiert konischen Typ I-Lipiden und konischen Typ II-Lipiden unterschieden. (B) Die Selbstaggregation von Typ 0-Lipiden führt zur Bildung von Lipiddoppelschichten. Typ I-Lipide aggregieren dagegen zu Mizellen mit einer positiven Krümmung und Typ II-Lipide zu invertierten Mizellen mit einer negativen Krümmung. Per Definition liegt eine positive Krümmung vor, wenn die Lipidmonolage vom wässrigen Milieu aus gesehen konvex ist und eine negative Krümmung, wenn die die Lipidmonolage von der wässrigen Phase aus gesehen konkav ist. (C) Die Aggregatstruktur bestimmt das Phasenverhalten der Lipide. Während Typ 0-Lipide in der lamellaren Phase (L) vorliegen, bilden Typ I-Lipide hexagonale (H_I) Phasen und Typ II-Lipide invertiert hexagonale (H_{II}) Phasen aus. In der hexagonalen Phase liegen Zylinder mit hydrophoben Kern vor, während die Zylinder in der invertiert hexagonalen Phasen eine hydrophobe Oberfläche aufweisen. Die Abbildung wurde nach Luckey erstellt (17).

Die Lipiddoppelschicht stellt das Grundgerüst biologischer Membranen dar. Den etwa 3 nm dicken, hydrophoben Kern der Membran bilden die Acylketten, und die hydrophilen

Lipidkopfgruppen bilden eine etwa 1,5 nm dicke, hydrophile Grenzschicht auf beiden Seiten der Membran (vgl. Abbildung 2B) (18). Die Lipiddoppelschicht kann grundsätzlich in zwei verschiedenen Phasenzuständen, der lamellaren flüssig-kristallinen Phase (L_α) und der lamellaren Gel-Phase (L_β), vorliegen (vgl. Abbildung 3) (19).

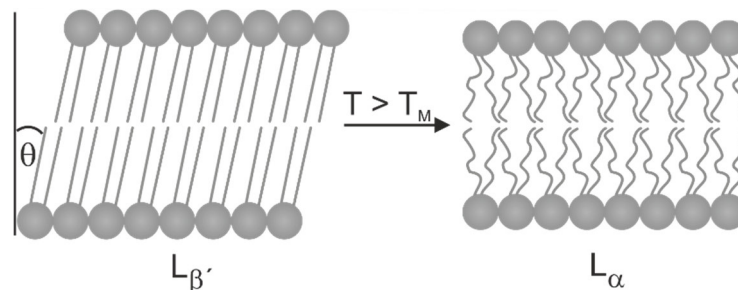


Abbildung 3: Strukturen unterschiedlicher lamellarer Lipid-Phasen.

In der gelförmigen L_β' -Phase sind die Acylketten in der vollständig gestreckten *all-trans*-Konformation. Der Apostroph in der Kennzeichnung der Phasen weist auf die Neigung (Winkel θ) der Lipidmoleküle zur Membrannormalen (senkrechte, schwarze Linie) hin. Oberhalb der Phasenübergangstemperatur (T_M) liegt die flüssig-kristalline L_α -Phase vor. Durch die erhöhte Temperatur kann die Energiebarriere zwischen der *all-trans* und der *gauche*-Konformation überwunden werden, sodass ein erhöhter Anteil der Methylgruppen in der *gauche*-Konformation vorliegt. Die Abbildung wurde nach Koynova *et al.* erstellt (19).

In der lamellaren Gel-Phase liegen die Lipide hochgeordnet in der gestreckten *all-trans*-Konformation vor, weshalb der hydrophobe Kern einer Membran in der Gel-Phase dicker ist. Des Weiteren ist die Rate der lateralen Diffusion der Lipide in der Gel-Phase niedrig. Der Neigungswinkel (θ) der Lipide relativ zur Membrannormalen in der Gel-Phase unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Phospholipidspezies (vgl. Abbildung 3). Lipide mit kleinen Kopfgruppen weisen einen Neigungswinkel von etwa 30° auf, um eine bessere Abschirmung der hydrophoben Acylketten zu gewährleisten. Abhängig von der Temperatur sind für die Gel-Phase noch weitere Sub-Phasen beschrieben. So liegen bei tiefen Temperaturen die Lipide in der lamellar kristallinen Phase (L_C) vor. Diese Phase grenzt sich von der gelförmigen L_β -Phase durch einen höheren Ordnungsgrad in der Acylkettenregion ab (20). Außerdem wurde für reine Phospholipide vor dem Phasenübergang von der L_β - in die flüssig-kristalline L_α -Phase eine Gel-Phase mit gewellter Überstruktur (P_β) beobachtet. Diese Phase ist durch eine leichte Zunahme an *gauche*-Konformeren sowie der Neuordnung der Lipidkopfgruppen charakterisiert, und die Membran weist eine periodisch-gewellte Überstruktur auf (19). Oberhalb der Phasenübergangstemperatur (T_M), die von der Lipidzusammensetzung des Systems abhängt, liegen die Lipide in der lamellaren flüssig-kristallinen Phase vor. In dieser Phase ist aufgrund eines hohen Anteils an *gauche*-Konformeren der hohe Ordnungsgrad aufgehoben, das Lipidvolumen erhöht und die Raten der lateralen Diffusion der Lipide hoch. Der Widerstand gegenüber der lateralen Bewegung von Molekülen in der Membran wird als Fluidität bezeichnet (21). Dieser entsteht vor allem durch die Acylketten der Lipide und ist in hochgeordneten Phasen höher als in Phasen mit geringerer Ordnung.

In vivo befinden sich Membranen fast ausschließlich in der flüssig-kristallinen Phase, da nur in dieser Phase die laterale Bewegung der Moleküle innerhalb der Membran möglich ist. In den Membranen eukaryotischer Organismen ist darüber hinaus die flüssig-geordnete Phase (L_o) relevant, die aufgrund von Interaktionen zwischen Sterolen und Phospholipiden bzw. Sphingolipiden entsteht und die Rigidität der Membran erhöht. Charakteristisch für die flüssig-geordnete Phase ist die dichte Packung der Lipide und die gestreckten Acylketten, wie bereits für die Gel-Phase beschrieben. Die laterale Beweglichkeit der Moleküle entspricht jedoch den Diffusionsraten in der flüssig-kristallinen Phase.

Die physikochemischen Eigenschaften einer Membran werden durch die Lipidzusammensetzung bestimmt. Diese unterscheidet sich von Organismus zu Organismus und variiert auch zwischen den Kompartimenten höherer Organismen (22). Beispielsweise besteht die innere *Escherichia coli* (*E. coli*)-Membran zu 75% aus dem zwitterionischen Lipid PE und zu 15-20% bzw. 5-10% aus den anionischen Lipiden PG bzw. CL (23, 24). Membranen eukaryotischer Organismen enthalten im Allgemeinen neben PE als weiteres zwitterionisches Lipid PC und anstatt der anionischen Lipide PG und CL die negativ geladenen Lipide PI und PS sowie Sphingolipide (22). CL ist in eukaryotischen Organismen in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Außerdem ist in eukaryotischen Organismen die Zusammensetzung der Lipidschichten unterschiedlich. So sind in der äußeren Lipidschicht Sphingomyeline sowie PC angereichert und in der inneren Lipidschicht PE sowie Glycerophospholipide mit negativer Ladung. Glykolipide sind ausschließlich auf der Außenseite der Zellmembran zu finden.

Für die laterale Organisation von Lipidmembranen wurde 1972 von Singer und Nicholson das *fluid mosaic model* vorgeschlagen (25). In diesem Modell wurden monomere Membranproteine als „Eisberge“ aufgefasst, die in einem See aus Lipiden treiben mit einer zufälligen Verteilung der Lipide und Proteine. Heute ist bekannt, dass Biomembranen in Form von lateralen Domänen organisiert sind und viele Membranproteine oligomere Strukturen ausbilden (26). Diese segregierten Lipiddomänen unterscheiden sich sowohl in der Lipid- als auch in der Proteinkomposition vom Rest der Membran. Darüber hinaus weisen unterschiedliche Domänen in eukaryotischen Organismen verschiedene Sterol-Anteile auf. Da die dickeren sterolreichen Domänen in rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen als floßartige Strukturen auf der Membranoberfläche zu erkennen sind, werden diese als *lipid rafts* bezeichnet.

Auch bakterielle Membranen sind in Form von Domänen organisiert, die sich in der Lipidzusammensetzung und Ordnung unterscheiden (27). Insbesondere CL und PG reiche Domänen wurden für bakterielle Membranen beschrieben. Aber auch PE-reiche Domänen wurden bereits in der inneren *E. coli*-Membran detektiert (28, 29). Die Organisation der Lipidmembran in Form von Domänen ist wichtig für die Funktion der Membranproteine und

damit auch für die Funktion der Zelle. So kann in den Domänen durch die jeweils dominierenden Lipide die Aktivität der dort lokalisierten Transmembranproteine beeinflusst werden.

1.1.2 Struktur von Membranproteinen

Membranproteine sind entweder als periphere Membranproteine mit der Membranoberfläche assoziiert oder durchspannen als integrale Membranproteine die Membran komplett (vgl. Abbildung 4). Periphere Membranproteine können über elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen mit der Membran assoziiert sein oder sind über Lipid- bzw. Proteinanker mit der Membran verknüpft (Abbildung 4A). Die Transmembransegmente integraler Membranproteine liegen entweder in Form von α -Helices oder als β -Faltblätter vor, die sich zu α -Helix-Bündeln oder β -Fasstrukturen zusammenlagern können (Abbildung 4B/C). Viele Membranproteine assemblieren darüber hinaus zu höheren oligomeren Komplexen. Charakteristisch für α -Helices und β -Faltblätter ist, dass diese die gesamte Wasserstoffbrückenbindungskapazität ihrer Peptidbindungen ausnutzen (30) und so die Insertion des polaren Polypeptidrückgrats in die hydrophobe Membran ermöglichen. So werden in β -Faltblattstrukturen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen parallel oder antiparallel verlaufenden, benachbarten Polypeptidketten ausgebildet. In Membranproteinen lagern sich 8-22 dieser β -Faltblätter zu zylindrischen, fassartigen Strukturen zusammen. Hydrophobe Aminosäurereste weisen dabei nach außen und hydrophile Aminosäurereste in das Poreninnere (31). β -Fasstrukturen sind in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, der Mitochondrien und der Chloroplasten zu finden (31). Die Mehrheit der Transmembranproteine liegt in Form von α -Helices vor (18). Im Gegensatz zu den β -Faltblättern wird das Wasserstoffbrückenbindungspotential des Polypeptidrückgrats in α -Helices innerhalb der Polypeptidkette gesättigt. Die α -helikalen Transmembransegmente bestehen durchschnittlich aus 20 überwiegend hydrophoben Aminosäuren, welche den circa 3 nm dicken, hydrophoben Kern der Lipiddoppelschicht durchspannen (18, 32). Trotz der hydrophoben Membranumgebung sind in den α -Helices auch polare oder geladene Aminosäuren zu finden, die häufig von funktioneller Bedeutung sind (33). In polytopen Transmembranproteinen können solche polaren Reste von der hydrophoben Membranumgebung abgeschirmt werden (34). Positiv geladene Aminosäuren sind neben Tryptophan und Tyrosin auch verstärkt an den Enden der α -Helices, und damit an der Grenzfläche der unpolaren Acylketten und den polaren Kopfgruppen der Lipide lokalisiert (33). Die positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin sind überdies von topologischer Bedeutung. Sie kommen verstärkt in den cytoplasmatischen Schleifenregionen der Transmembransegmenten aller Membranproteine unabhängig vom Organismus vor und bestimmen damit die Orientierung der Transmembransegmente (35). Die Abhängigkeit der

Orientierung der α -Helices von positiv geladenen Aminosäuren ist auch als *positive inside rule* bekannt (36).

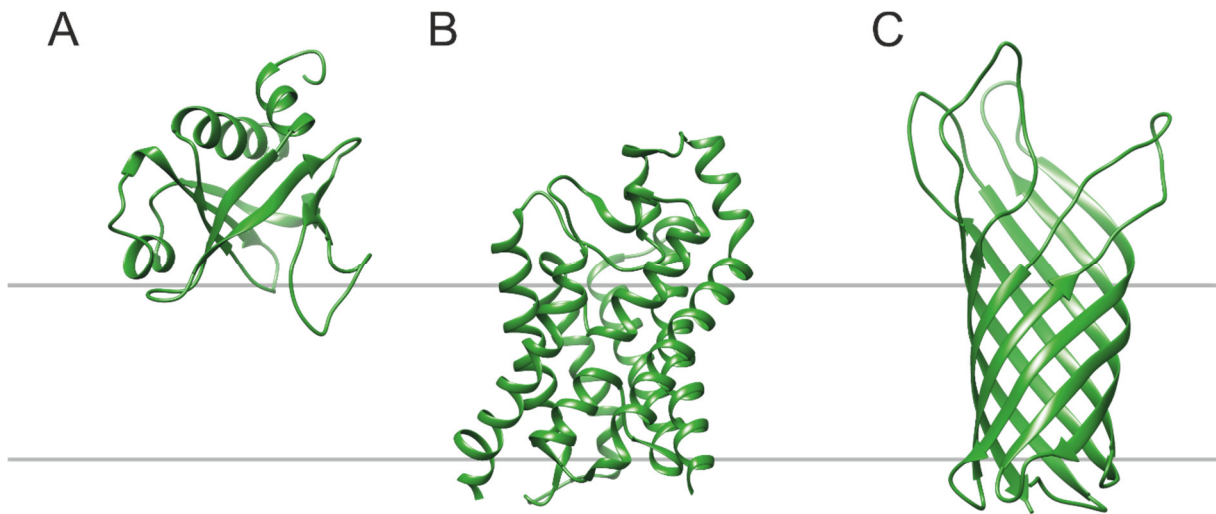


Abbildung 4: Periphere und integrale Membranproteine.

(A) Periphere Membranproteine sind über elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder Lipid- bzw. Proteinanker mit der Membran assoziiert. Gezeigt ist die Pleckstrin-Homologie-Domäne der Phospholipase C-delta1, die über elektrostatische Wechselwirkungen mit Inositol-(1,4,5)-trisphosphat mit der Membran assoziiert ist (PDB-ID: 1MAI). Integrale Membranproteine durchspannen die Lipidmembran entweder in Form von (B) α -Helix-Bündeln oder (C) β -Fasstrukturen vollständig. So liegen Aquaporine in Form von α -Helix-Bündeln in der Membran vor (PDB-ID: 1FX8) und die C-terminale Transmembrandomäne des Autotransporters NaIP aus *Neisseria meningitidis* bildet eine β -Fasstruktur aus (PDB-ID: 1UYN). Die Lipidmembran ist durch die grauen Linien angedeutet.

1.1.2.1 Faltung von Membranproteinen

Von entscheidender Bedeutung für die Funktion von Proteinen ist die korrekte dreidimensionale Struktur. Für die Faltung von Membranproteinen wurde bereits vor 25 Jahren das Zwei-Stufen-Modell beschrieben, das von zwei unabhängigen Stufen bei der Proteinfaltung ausgeht (siehe Abbildung 5) (37). In der ersten Stufe integrieren die Transmembransegmente einzeln in die Membran und bilden spontan α -helikale Strukturen aus. In der zweiten Stufe interagieren einzelne Transmembranhelices spezifisch zu höher geordneten Strukturen. 2003 wurde dieses Modell um eine dritte Stufe erweitert. Diese umfasst die Ausbildung der Quartärstruktur der Proteine zu oligomeren Komplexen und auch die Integration von Kofaktoren (38).

Die Faltung polytooper Transmembranproteine kann jedoch nicht ausreichend durch das Drei-Stufen-Modell beschrieben werden, da die Struktur α -helikaler Membranproteine komplexer ist als früher angenommen wurde. Polytope Transmembranproteine sind häufig keine Bündel idealer α -Helices, sondern weisen vielfältige Strukturelemente auf. So wurden in Kristallstrukturen α -Helices identifiziert, die die Membranen nur halb durchspannen oder annähernd waagrecht in der Membran liegen. Diese komplexen Strukturelemente sind im Drei-Stufen-Modell nicht berücksichtigt. Auch die Insertion α -helikaler Segmente mit polaren bzw.

geladenen Aminosäuren in die Membran kann eine Wechselwirkung zwischen Helices erfordern und ist daher nicht als unabhängig anzusehen. Darüber hinaus folgt die Oligomerisierung einzelner Proteinuntereinheiten nicht zwingend als unabhängiger dritter Schritt, denn die Faltung einzelner Untereinheiten und die Oligomerisierung können zeitgleich verlaufen (39).

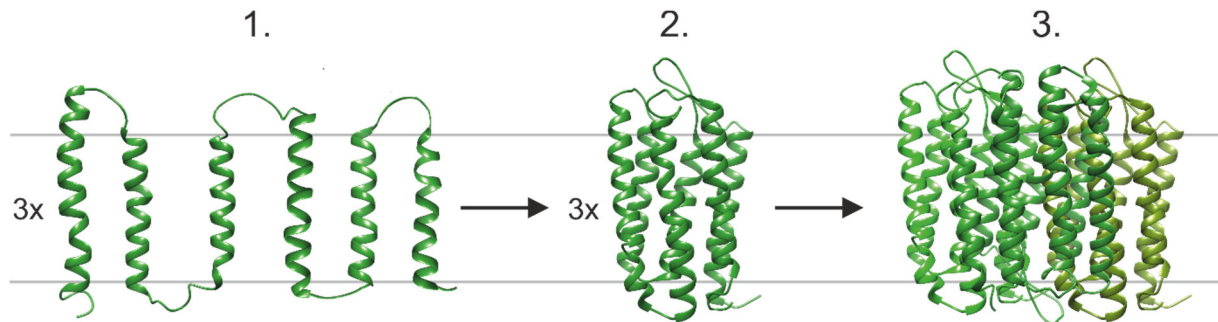


Abbildung 5: Stufen-Modell zur Faltung von α -helikalen Transmembranproteinen.

In der ersten Stufe integrieren Transmembranhelices unabhängig voneinander in die Membran. Durch spezifische Helix-Helix-Interaktionen wird in der zweiten Stufe die Tertiärstruktur des Proteins ausgebildet. Die Faltung des Transmembranproteins wird durch die Ausbildung der Quartärstruktur in der dritten Stufe abgeschlossen. Zu dieser Stufe zählen die Bindung von Kofaktoren oder, wie hier dargestellt, die Oligomerisierung monomerer Proteine. Die Abbildung wurde nach Engelman *et al.* erstellt (38).

1.1.2.1.1 Helix-Helix-Assoziationen in Lipidmembranen

Entscheidend für die Faltung von Membranproteinen sind Helix-Helix-Interaktionen. In Membranen werden Helix-Helix-Interaktionen vor allem durch Van-der-Waals-Kräfte stabilisiert, aber auch elektrostatische Wechselwirkungen sind von Bedeutung (18). Bei optimal dichter Packung zweier Helices sind die Van-der-Waals-Kräfte zwischen Helices stärker als zwischen Helices und Lipidmolekülen. Es wird daher die Helix-Helix-Interaktion begünstigt. Die dichte Packung der Helices kann nach dem *knobs-into-holes*-Modell beschrieben werden, das von komplementären Oberflächen der interagierenden Helices ausgeht (40). So füllen Ausbuchtungen auf der einen Helix Vertiefungen auf einer zweiten Helix aus (41). Helix-Helix-Interaktionen werden auch durch die Zunahme der Entropie des Gesamtsystems begünstigt, die auf den erhöhten Translations- und Konformationsfreiheitsgraden der Lipidmoleküle beruht (42).

Die *knobs-into-holes*-Packung wird unter anderem durch das GxxxG-Motiv vermittelt, das in Transmembranhelices weit verbreitet ist (43). Dieses Motiv wurde erstmals in der α -helikalen Transmembrandomäne von Rezeptortyrosinkinasen identifiziert (44) und anhand des Glykophorin A (GpA) Dimers detailliert untersucht (45). Das GxxxG-Motiv besteht aus zwei Glycinresten, die durch drei beliebige Aminosäuren voneinander getrennt sind. Da die Windung einer Helix 3,6 Aminosäuren einschließt, sind die beiden Glycinreste in unmittelbarer Nähe auf der gleichen Helixseite lokalisiert. Auch GxxxG-ähnliche-Motive, in denen ein oder

beide Glycinreste gegen kleine Aminosäuren wie Serin oder Alanin ersetzt sind, ermöglichen analoge Wechselwirkungen (46). Allgemein gilt, dass kleine Aminosäuren einen engen Kontakt zwischen zwei interagierenden Helices erlauben. Glycin kommt hier wegen der fehlenden Seitenkette eine besondere Bedeutung zu, da der Seitenkettenentropieverlust bei interhelikaler Assoziation geringer ist als bei Aminosäuren, die eine Seitenkette tragen.

Aufbauend auf das GxxxG-Motiv ist für α -helikale Transmembranproteine das Glycin-*Zipper*-Motiv GxxxGxxxG, bzw. Varianten dieses Motivs, in dem die äußeren Glycinreste gegen die Aminosäuren Alanin, Serin oder Threonin ausgetauscht sind (47). Dieses Motiv ist insbesondere in homooligomeren Kanalproteinen überrepräsentiert und vermittelt starke, rechtsgängige Helix-Helix-Interaktionen.

Neben der bereits erwähnten funktionalen Bedeutung von polaren Aminosäuren in Transmembransegmenten können diese auch durch elektrostatische Wechselwirkungen die Assoziation von Helices in Membranen vermitteln (48, 49). So können durch die Aminosäuren Aspartat, Glutamat, Asparagin, Glutamin und Histidin, die gleichzeitig als Protonendonator und -akzeptor fungieren, starke Helix-Helix-Interaktionen erreicht werden. Die weniger polaren Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin können zwar keine Interaktionen dieser Stärke vermitteln, stellen jedoch die häufigsten polaren Aminosäuren in Transmembransegmenten dar. Als Bestandteil von GxxxG-ähnlichen Motiven unterstützen Serin und Threonin nicht nur die dichte Packung der Helices, sondern stabilisieren diese zusätzlich über Wasserstoffbrückenbindungen.

Weitere Faktoren, die die Interaktion zweier Helices beeinflussen, sind Einflüsse von extramembranären Schleifenregionen und die Bindung von Kofaktoren (50).

1.1.3 Einfluss der Lipidumgebung auf die Struktur, Stabilität und Aktivität von integralen Membranproteinen

Interaktionen zwischen integralen Membranproteinen und Lipidmolekülen können von wesentlicher Bedeutung für die Struktur, Stabilität und Funktion der Proteine sein. Wechselwirkungen zwischen Membranproteinen können sowohl auf spezifischen Protein-Lipid-Interaktionen als auch auf den physikochemischen Eigenschaften der Lipidmembran, wie der Membranheterogenität, der Ladung sowie der Dicke und der Ordnung der Acylketten, basieren (21, 51-53). Lipide, die essentiell für die Aktivität von Proteinen sind, werden auch als Kofaktoren bezeichnet. Diese Lipide sind charakteristischerweise zwischen Transmembranhelices bzw. zwischen verschiedenen Proteinuntereinheiten gebunden (21). Beispielsweise hängt die Ionenleitfähigkeit des tetrameren Kaliumionenkanals KcsA von PG-Molekülen ab, die an den Monomerkontaktflächen gebunden sind (54, 55). Auch CL dient als Lipid-Kofaktor für verschiedene Proteine der Atmungskette, wie der NADH-Dehydrogenase, dem Cytochrom-bc₁-Komplex, der ATP-Synthase, der Cytochrom-c-Oxidase und der

ATP/ADP-Translokase (56-58). Lipide, welche wichtig für die Faltung von Transmembranproteinen sind, werden als nicht-proteinogene Chaperone bezeichnet. Beispielsweise ist PE als molekularer Chaperon für die korrekte Faltung der *E. coli* Laktose Permease LacY essentiell (59, 60). Neben diesen spezifischen Wechselwirkungen können Lipide die Struktur, Stabilität und Funktion von integralen Membranproteine auch unspezifisch beeinflussen. Lipide, die an unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Transmembranproteinen und der Lipidmembran beteiligt sind, sind im Allgemeinen weniger stark an das Protein assoziiert. So sind die Austauschraten zwischen den annularen Lipiden, die das Membranprotein unmittelbar umgeben, und den freien Lipiden der Membran, die nicht in Kontakt mit Membranproteinen stehen, hoch (61, 62).

Ein Aspekt, der die Struktur und Funktion von integralen Membranproteinen unspezifisch beeinflusst, beruht auf Unterschieden in der Dicke des hydrophoben Membrankerns und der hydrophoben Proteinoberfläche. Dieses Phänomen wird als hydrophobe Diskrepanz (engl.: *hydrophobic mismatch*) bezeichnet und ist aufgrund der Exposition hydrophober Acylketten oder hydrophober Aminosäuren mit der wässrigen Umgebung an einen hohen energetischen Aufwand gekoppelt. Die hydrophobe Diskrepanz zwischen der Membran und einem Protein führt daher zu strukturellen Anpassungen der Membran oder des Proteins, um den Unterschied der hydrophoben Oberflächen zu minimieren (51, 63, 64). Die meisten Theorien gehen von strukturellen Anpassungen der Membran an eine rigide Proteinoberfläche aus (21, 63, 65). Es sind jedoch auch Anpassungen der Proteinstruktur durch Änderung des Neigungswinkels der Transmembranhelices möglich (66, 67). Wie für verschiedene Transmembranproteine gezeigt wurde, können die beschriebenen Anpassungen die Struktur und damit die Aktivität von Membranproteinen signifikant beeinflussen (51). Allgemein zeigten die Studien, dass der Effekt der hydrophoben Diskrepanz auf die Aktivität der verschiedenen Membranproteine unterschiedlich ist und daher einer individuellen Untersuchung bedarf (21, 68, 69).

In vielen biologischen Membranen sind große Anteile an Typ II-Lipiden enthalten, die in wässrigen Lösungen keine Lipiddoppelschichten ausbilden, sondern in der invertierten hexagonalen (H_{II}) Phase mit negativer Krümmung vorliegen (14, 15). Die Inkorporation eines Typ II-Lipids in eine Lipiddoppelschicht erhöht aufgrund der Abstoßung der Acylketten die Tendenz zur Krümmung in den Monolagen. In der Doppelschicht wird die Krümmung jedoch durch den hydrophoben Effekt unterbunden, und es entsteht eine Krümmungs-Frustration in den Monolagen (15). Ein Modell, um die Auswirkung der Insertion von Typ II-Lipiden in die Doppelschicht auf integrale Membranproteine zu beschreiben, ist die Theorie des lateralen Drucks (70, 71). Der laterale Druck (π) einer Lipidmembran variiert mit der Membrantiefe (z) und ist über die gesamte Membran ausgeglichen (vgl. Abbildung 6). An der Grenzfläche der Acylketten und der Lipidkopfgruppen herrscht aufgrund der Grenzflächenspannung ein hoher

negativer Druck. Hier dominieren anziehende Kräfte, um die energetisch ungünstigen Exposition der Acylketten mit Wassermolekülen zu vermeiden (vgl. Abbildung 6). Diesem negativen Druck steht aufgrund abstoßender Kräfte ein positiver Druck in der Acylketten- und Lipidkopfguppenregion gegenüber. Die Abstoßungen in der Acylkettenregion beruhen auf der thermischen Bewegung der Acylketten und in der Lipidkopfguppenregion auf sterischen und elektrostatischen Effekten (15). Die Insertion der Typ II-Lipide in die Doppelschicht erhöht den lateralen Druck in der Acylkettenregion bzw. reduziert diesen in der Lipidkopfguppenregion (vgl. Abbildung 6B).

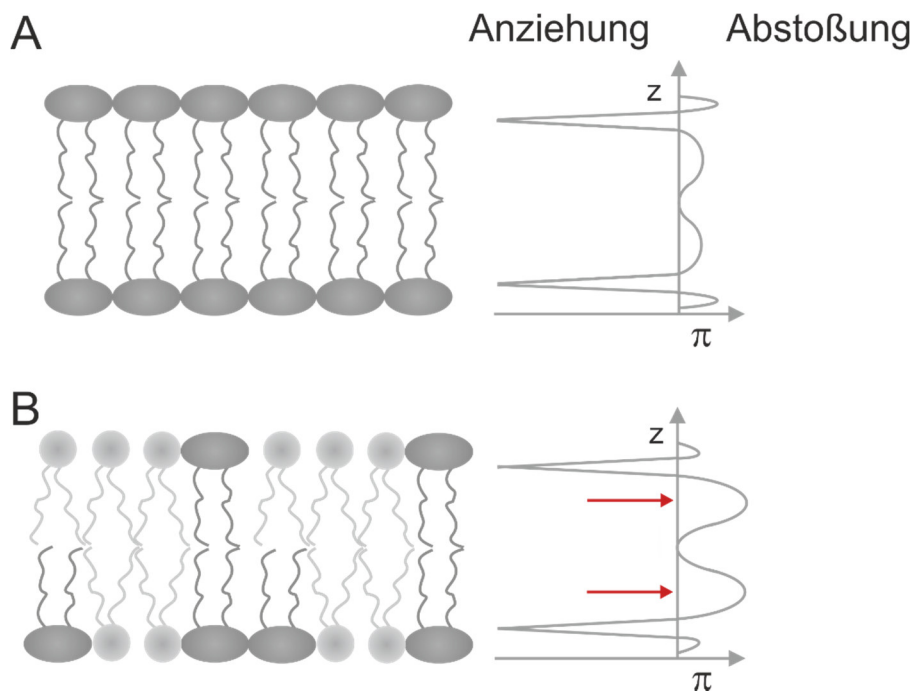


Abbildung 6: Laterales Druckprofil einer Lipiddoppelschicht.

(A) Schematische Darstellung des lateralen Druck Profils in einer Lipiddoppelschicht. Der laterale Druck (π) ist in Abhängigkeit der Tiefe der Membran (z) dargestellt. Aufgrund des hydrophoben Effekts herrschen an der Grenzfläche der hydrophoben Acylketten und der hydrophilen Lipidkopfguppen anziehende Kräfte, um Kontakte der Acylketten mit der wässrigen Umgebung zu minimieren. In der Acylkettenregion kommt es aufgrund der thermischen Bewegung der Acylketten zu Abstoßungen. Auch in der Lipidkopfguppenregion dominieren aufgrund sterischer und elektrostatischer Effekte abstoßende Kräfte. Der negative Druck an der Grenzfläche polar/unpolar wird somit durch einen positiven Druck in der Acylketten- und Lipidkopfguppenregion kompensiert. (B) Die Insertion eines Typ II-Lipids in die Lipiddoppelschicht führt zur Erhöhung des lateralen Drucks in der Acylkettenregion (rote Pfeile). Die abstoßenden Kräfte zwischen den Lipidkopfguppen nehmen dagegen aufgrund der kleineren Lipidkopfguppe ab. Das laterale Druck Profil ist nach Cantor dargestellt (70).

In biologischen Membranen ist das Gleichgewicht zwischen Typ 0- und Typ II-Lipiden streng reguliert (72). Da außerdem Typ II-Lipide essentiell für eine Zelle sind (73), ist von einer funktionalen Bedeutung dieser Lipide auszugehen (14, 74). Wie bereits für die hydrophobe Diskrepanz beschrieben, ist auch die Abhängigkeit der Funktion verschiedener integraler Membranproteine von Änderungen des lateralen Drucks individuell. So ist die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (75) und der *E. coli* Diacylglycerol-Kinase (76) in Gegenwart von PE reduziert, die Aktivität von Rhodopsin ist dagegen gesteigert (77).

Die Oligomerisierung von Membranproteinen kann ebenfalls durch Änderungen des lateralen Druckprofils moduliert werden. Beispielsweise wird die Stabilität des KcsA Tetramers durch das Typ II-Lipid PE erhöht (74). Vermutlich können Änderungen im lateralen Druckprofil die Aktivität von Membranproteinen nur dann beeinflussen, wenn die Aktivität der Proteine von Konformationsänderungen abhängig ist, die die Fläche des Proteins in der Membran modulieren (70, 78).

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Acylketten-Zusammensetzung die Aktivität von Membranproteinen beeinflussen kann. Beispielsweise wurde für die *E. coli* Laktose Permease LacY ein Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der Lipidkopfguppen und der Acylketten beschrieben (79). So war der energieabhängige Transport von Laktose entgegen des Konzentrationsgradienten nur in Membransystemen mit ungesättigten Acylketten möglich (79).

1.1.3.1 Lipidvermittelter Wirkmechanismus von Anästhetika

Wie in Abschnitt 1.1.3 aufgezeigt wurde, können die physikochemischen Eigenschaften einer Lipidmembran die Struktur und damit die Funktion von integralen Membranproteinen modulieren. Während z.B. dem Lokalanästhetikum Lidocain primär ein proteinspezifischer Wirkmechanismus durch Blockierung der Natriumionenkanäle der Nervenzelle zu Grunde liegt (80), wird für andere Anästhetika ein lipidvermittelter Mechanismus angenommen. So scheint aufgrund der vielfältigen Strukturen der Moleküle mit anästhetischer Wirkung ein einheitlicher proteinspezifischer Wirkmechanismus unwahrscheinlich. Die Annahme des lipidbasierten Wirkmechanismus ist, dass Anästhetika die Lipidorganisation in der Membranen stören und dabei die Struktur und Funktion integraler Membranproteine modulieren. So wurde beispielsweise beschrieben, dass Anästhetika die Lipidordnung in der Membran reduzieren, und auch Änderungen des lateralen Druckprofils der Membran werden als Wirkmechanismus diskutiert (71). Aber auch für die Lokalanästhetika Lidocain, Bupivacain, Prilocain und Procain, die spezifisch Natriumionenkanäle blockieren, wurde bereits gezeigt, dass diese die Ordnung der Lipidmembran reduzieren (81). Der Wirkmechanismus der Moleküle mit anästhetischer Wirkung wird bis heute kontrovers diskutiert (82).

2.2 Aquaporine und Aquaglyceroporine

Die Existenz von wasserselektiven Kanälen in Zellmembranen wurde schon lange vor der Entdeckung des ersten Aquaporins (AQP) postuliert (83, 84). So konnte die hohe Wasserpermeabilität und die Selektivität des Wasserflusses über die Erythrozytenmembran nicht durch einfache Diffusion erklärt werden. 1992 gelang es schließlich Peter Agre, das damals noch als *Channel forming Integral membrane Protein of 28 kDa* (CHIP28) bezeichnete Protein, als den langgesuchten Wasserkanal zu identifizieren (85). CHIP28 exprimierende

Oozyten des Krallenfroschs *Xenopus laevis* platzten in einer hypotonischen Lösung deutlich schneller als die nicht transfizierten Kontrollzellen.

Aquaporine sind hochselektive, polytope Transmembrankanäle mit einem Molekulargewicht von 26-34 kDa und erleichtern die bidirektionale Permeation von Wasser über die Lipidmembranen aller Lebensformen. Während in *E. coli* nur die Aquaporine AqpZ und GlpF vorkommen, sind im Menschen bisher 13 Aquaporine bekannt und in einigen Pflanzen konnten sogar über 30 verschiedene Aquaporine identifiziert werden.

Basierend auf der Aminosäuresequenz im Bereich der hochkonservierten NPA-Motive, bestehend aus den drei Aminosäuren Asparagin, Prolin und Alanin (vgl. 1.2.2), werden die Aquaporine in drei Unterfamilien eingeteilt (86, 87). So werden die klassischen Aquaporine, die ausschließlich für Wasser permeabel sind, von den Aquaglyceroporinen, die zusätzlich den Fluss kleiner, ungeladener Moleküle wie Glycerol ermöglichen, und von den unorthodoxen Aquaporinen unterschieden.

Über den Wasser- und Glycerolfluss hinaus sind verschiedene Aquaporine auch permeabel für weitere Substanzen, wie Harnstoff, Nitrat, Ammoniak, Wasserstoffperoxid, Arsen-, Silizium- sowie Antimonsalze, und sogar für Ionen (88-90). Die Permeabilität einiger Aquaporine für diese Substanzen ist wahrscheinlich nicht von physiologischer Relevanz. Diese basiert vermutlich alleine auf dem Vorkommen dieser im umgebenden Medium, da die Entwicklung stringenter Inhibitionsmechanismen gegen den Protonen- und Ionentransport physiologisch wichtiger war als die Selektion gegen kleine, neutrale Moleküle (88). Dagegen ist beispielsweise die Permeabilität des humanen AQP6 für Anionen von physiologischer Relevanz (89). Die unterschiedlichen Substratpermeabilitäten der Aquaporine sind nicht auf schwerwiegende strukturelle Änderungen zurückzuführen, sondern können bereits durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure verursacht werden (91).

Für verschiedene Aquaporine wird darüber hinaus angenommen, dass diese die Permeation von gasförmigen Molekülen wie CO₂ und NO über Lipidmembranen ermöglichen (92, 93). Die Permeation von gasförmigen Molekülen durch Aquaporine ist jedoch noch unzureichend charakterisiert und wird gegenwärtig kontrovers diskutiert (94).

In Eukaryoten wird die Aktivität der Aquaporine unter anderem durch Phosphorylierung konservierter Threonin- bzw. Serinreste, durch Änderungen des pH-Wertes und Änderungen der Konzentration an divalenten Kationen und Änderungen in der Osmolalität reguliert (95).

1.1.4 Humane Aquaporine

Im Menschen konnten bisher 13 Aquaporine identifiziert werden, die sich hinsichtlich der individuellen Substratselektivität, der Permeationsraten sowie der gewebespezifischen Expression unterscheiden (96). Dazu zählen die klassischen Aquaporine AQP0, 1, 2, 4, 5, 6, und 8 sowie die Aquaglyceroporine 3, 7, 9 und 10 und die unorthodoxen Aquaporine AQP11

und 12. Während die meisten Aquaporine in der Plasmamembran zu finden sind, konnten Aquaporine auch in intrazellulären Organellen, wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und den Mitochondrien, nachgewiesen werden. Auch die Funktionen der Aquaporine sind vielfältig. Zu einer der wesentlichen Aufgaben der Aquaporine zählt die Regulation des Flüssigkeitshaushaltes, die essentiell für das Überleben eines Organismus ist. So sind humane Aquaporine in Zellen verschiedener Organe und Gewebe zu finden, die in Flüssigkeitstransportprozesse involviert sind. Aquaporine regulieren unter anderem die Wasser-Homöostase in der Niere, in den roten Blutkörperchen, in der Augenlinse, den Speicheldrüsen und im Gehirn. Neben Vorgängen, die unmittelbar mit dem Wasserfluss verbunden sind, konnte auch eine Beteiligung an Prozessen gezeigt werden, welche nicht in direktem Zusammenhang mit dem Wasserfluss stehen. Dazu zählen Zelladhäsion, -migration, -proliferation sowie -differenzierung (97). Studien an Aquaporin *knockout* Mäusen zeigten auch eine Beteiligung verschiedener Aquaporine an der Tumorgenese (97). Während die Funktion einiger humaner klassischer Aquaporine bereits gut untersucht wurde, ist die physiologische Bedeutung der Aquaglyceroporine und vor allem der unorthodoxen Aquaporine bisher weniger detailliert beschrieben. Im Folgenden sollen beispielhaft unterschiedliche Funktionen verschiedener klassischer Aquaporine des Menschen näher erläutert werden. Die physiologische Relevanz und Funktionen der Aquaporine gehen jedoch weit über diese beispielhaften Erläuterungen hinaus.

In den Linsenfaserzellen stellt AQP0 den Hauptproteinanteil der Plasmamembran dar. Interessanterweise dient hier AQP0 nicht primär als Wasserkanal sondern vermittelt enge Zell-Zellkontakte zwischen benachbarten Zellen (98, 99). Die AQP0-AQP0-Wechselwirkungen werden durch Prolinreste in den extrazellulären Schleifen vermittelt, die zwischen AQP0-Proteinen verschiedener Spezies konserviert sind, nicht jedoch zwischen unterschiedlichen Aquaporinen. Mutationen, die die Proteinstruktur beeinflussen, können diese entscheidenden Zell-Zellkontakte in der Linsenfaserzelle nicht mehr gewährleisten und die Transparenz der Linse wird beeinträchtigt. Linsentrübungen (Katarakte) sind die Folge (100).

In der Niere wird durch das Zusammenspiel verschiedener Aquaporine die effiziente Urinkonzentrierung gewährleistet (101). AQP1 wird konstitutiv in der Plasmamembran der proximalen Tubuluszellen exprimiert, in denen täglich etwa 180-200 L Wasser resorbiert werden. AQP2, AQP3 und AQP4 werden in den Epithelzellen des Sammelrohrs exprimiert, wo diese für die Konzentrierung des Primärharns von etwa 12-15 L auf circa 1 L verantwortlich sind. AQP2, das ausschließlich in den Zellen des Sammelrohrs der Niere vorzufinden ist, wird hierfür durch das antidiuretische Hormon Arginin-Vasopressin (AVP) aus intrazellulären Vesikeln zur apikalen Plasmamembran transportiert. AQP3 und 4 hingegen werden konstitutiv in der basolateralen Membran exprimiert. Demzufolge wird durch AQP2 das Wasser aus dem Primärharn resorbiert und durch AQP3 und 4 wieder dem Blutkreislauf zugeführt. Während

Mutationen in AQP1 nur in extremen Ausnahmefällen phänotypisch relevant sind, führen Mutationen in AQP2 zu *nephrogenem Diabetes insipidus* (NDI) (102-104). In der Niere sind darüber hinaus die Aquaporine AQP6, 8, 9 und 10 zu finden. Deren genaue Lokalisation und physiologische Bedeutung sind jedoch noch unbekannt (101).

Im zentralen Nervensystem ist AQP4 das am häufigsten vorkommende Aquaporin. Hier wird es vor allem in den Astrozyten-Endfüßen nahe der Blut-Hirnschranke exprimiert und ist maßgeblich an der Flüssigkeitsregulation im Gehirn und der Elektrolyt-Homöostase beteiligt (105, 106). Aufgrund der Nähe zur Blut-Hirnschranke ist AQP4 auch am Flüssigkeitsaustausch zwischen Blut und Gehirn verantwortlich. AQP4 ist auch an der Entstehung und dem Abklingen von Hirnödemen beteiligt. Ferner wurden gegen AQP4-gerichtete Antikörper als Ursache für *Neuromyelitis optica* identifiziert (107), einer Autoimmunstörung die zu Entzündungen im zentralen Nervensystem führt.

In Speichel- und Tränendrüsen und auch im Gewebe des Atemtrakts sind Aquaporine in die Bildung von Speichel, Tränenflüssigkeit und pulmonalen Flüssigkeiten involviert (108). So ist AQP5 an der Entstehung des Sjögren-Syndroms beteiligt, einer Autoimmunerkrankung der Speichel- und Tränendrüsen (109). Eine Störung des AQP5-Transports in die Membranen der sekretorischen Zellen scheint bei diesem Krankheitsbild zur verringerten Flüssigkeitssekretion dieser Zellen beizutragen.

Die Funktion und physiologische Bedeutung der humanen Aquaglyceroporine sind dagegen weniger gut charakterisiert. Für AQP3, das in den Keratinozyten der Epidermis lokalisiert ist und dort den Glycerolfluss vermittelt (110), wurde beispielsweise eine Beteiligung in der Tumorgenese von epidermalem Gewebe gezeigt (111). AQP7 ermöglicht während Fastenperioden die Abgabe von Glycerol, einem Produkt der Lipolyse, in den Blutkreislauf (112). In der basolateralen Membran der Leber gewährleistet AQP9 die Aufnahme von Glycerol für die Gluconeogenese aus der Pfortader (113).

1.1.5 Aufbau und Struktur der Aquaporine

Etwa zehn Jahre nach der Charakterisierung des ersten Aquaporins (114) konnten bereits die ersten hochauflösenden Strukturen des klassischen Aquaporins AQP1 (115) und des Aquaglyceroporins GlpF (116) aufgeklärt werden. Bis heute existieren etwa 40 Strukturen von insgesamt 14 Aquaporinen aus unterschiedlichen Organismen (MPSTRUC Datenbank (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/exp/list>, Stephen White Lab at UC Irvine). Aquaporine aller Unterfamilien liegen in biologischen Membranen als Homotetramere vor (116-118), der Substratfluss erfolgt jedoch ausschließlich durch eine sanduhrenförmige, amphiphatische Pore des Monomers (119). Diese amphiphatische Pore wird durch sechs Transmembranhelices (TMH1, TMH2, TMH4, TMH5, TMH6, TMH8) und zwei Helices, welche die Membran nur halb durchspannen (Halbhelices MH3 und MH7), definiert (Abbildung 7A).

Die Transmembranhelices sind durch 5 extramembranäre Schleifenregionen (A-E) verbunden und bilden ein rechtsgängiges α -Helixbündel aus (120, 121). Sowohl der Amino (N)- als auch der Carboxy (C)-Terminus der Aquaporine sind intrazellulär lokalisiert. Jeweils drei Transmembranhelices und eine Halbhelix bilden eine von zwei strukturell homologen Domänen aus, die in einem Winkel von 180° zueinander in der Membran orientiert sind. Diese beiden repetitiven Proteindomänen sind auf eine frühe Genduplikation zurückzuführen (122, 123).

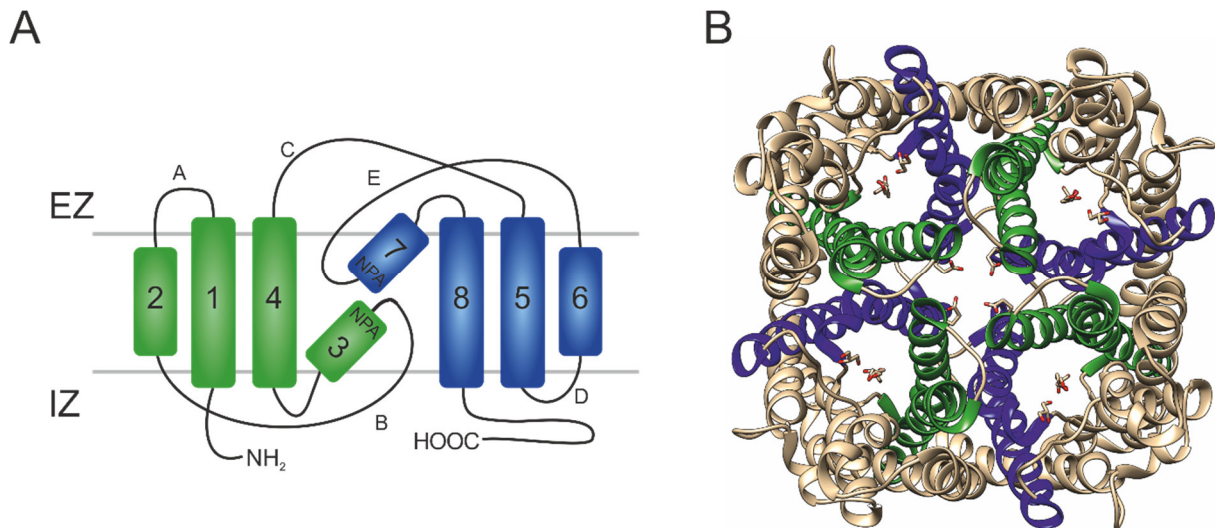


Abbildung 7: Topologie und Struktur der Aquaporine.

(A) Im Topologie-Modell der Aquaporine sind die zwei repetitiven Domänen, die in der Membran in einem Winkel von 180° zueinander orientiert sind, in grün und blau dargestellt. Jede Domäne besteht aus je drei Transmembranhelices (1, 2, 4 bzw. 5, 6, 8) und je einer Halbhelix (3 bzw. 7). Die Transmembranhelices werden durch die extra- und intrazellulären Schleifen A-E verbunden. Die Schleifen B und E beinhalten die beiden die Membran halb durchspannenden Helices 3 und 7. An den N-Termini der Halbhelices sind die NPA-Motive lokalisiert. (B) Kristallstruktur des Aquaglyceroporins GlpF (PDB-ID: 1FX8). Dargestellt ist das GlpF-Tetramer mit Aufsicht von der periplasmatischen Seite mit jeweils drei Molekülen Glycerol in der Kanalpore. Die an der Aquaporin-Tetramerisierung beteiligten Transmembranhelices 1 und 2 sowie 5 und 6 eines Monomers sind in grün bzw. blau dargestellt. Ferner ist die Seitenkette von Glu43, die in Transmembranhelix 2 lokalisiert ist und in die zentrale Pore des Tetramers weist, aufgezeigt. IZ = intrazellulär und EZ = extrazellulär.

Für die Faltung der individuellen Proteindomänen sind Interaktionen zwischen den parallelen Transmembranhelices 1 und 4 sowie 5 und 8 über Interaktionsmotive, wie GxxxA oder SxxxGxxxA, wichtig, die Interaktion der antiparallelen Transmembranhelices 2 und 6 verbindet die beiden Domänen. An den N-Termini der beiden Halbhelices, die von unterschiedlichen Seiten in die Membran eintreten, sind die hochkonservierten NPA-Motive lokalisiert. Die NPA-Motive treffen in der Porenmitte aufeinander, wo die beiden Prolinreste zwischen den Seitenketten des Prolin- und Alaninrestes der jeweils gegenüberliegenden Halbhelix zum Liegen kommen. So wird durch Van-der-Waals-Interaktionen zwischen den Prolinresten der NPA-Motive die enge Kontaktfläche zwischen den Halbhelices stabilisiert. Durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen werden die Asparaginreste des NPA-Motivs zur Ausrichtung der Aminogruppen in den Seitenketten in Richtung des passierenden Substrats gezwungen.

1.1.5.1 Tetramerisierung der Aquaporine in biologischen Membranen

In biologischen Membranen assemblieren Aquaporine unter Entstehung einer zentralen Pore zu einem Homotetramer (vgl. Abbildung 7B) (116-118). An der Oligomerisierung sind Wechselwirkungen zwischen den Transmembranhelices 1 und 2 eines Monomers und den Transmembranhelices 5 und 6 eines benachbarten Monomers wesentlich beteiligt. Demgemäß sind in GlpF die Transmembranhelices 1 und 5 sowie 2 und 6 in einem für α -helikale-Interaktionen annähernd optimalen Winkel von etwa -20° zueinander angeordnet (124). Weiterhin sind in GlpF polare Wechselwirkungen an der Oligomerisierung der GlpF-Monomere involviert (125). So ist in Transmembranhelix 2 an Position 43 ein Glutamat lokalisiert, welches in die zentrale Pore des GlpF-Tetramers weist (Abbildung 7B). Während der Austausch von Glu43 gegen eine polare Aminosäure die Oligomerisierung nicht beeinflusste, führte die Substitution von Glutamat durch Alanin zu einer deutlich eingeschränkten Oligomerisierung (125). Da auch die Aktivität der GlpF-Mutante E43A im Vergleich zum GlpF-Wildtyp (wt) um etwa 30% reduziert war, scheinen die GlpF-Aktivität und die Tetramerisierung des Proteins zu korrelieren (125). Auch an der AQP1-Tetramerisierung sind Wechselwirkungen zwischen polaren Aminosäuren an der Monomerkontaktfläche beteiligt (126). Da diese Aminosäuren jedoch zwischen verschiedenen humanen Aquaporinen nicht konserviert sind, ist anzunehmen, dass die Tetramerisierung der Aquaporine auf keinem konservierten Interaktionsmotiv basiert (126). Die Monomerkontaktfläche der Aquaporine scheint vielmehr Aquaporin-spezifisch zu sein und verhindert folglich die Bildung von Heterotetrameren (127). Die Tetramerisierung der Aquaporine wird jedoch nicht nur durch Aminosäuren beeinflusst, die unmittelbar an der Monomerkontaktfläche lokalisiert sind. So schränkten auch Mutationen in den nicht-helikalen Bereichen der Schleifen B und E in AQP1 die Oligomerisierung ein (128).

Da in Aquaporinen der Kanal für den Substratfluss bereits durch das Monomer definiert ist, stellen Aquaporine sogenannte fakultative Oligomere dar (129). Neben der kontrovers diskutierten Möglichkeit, dass gasförmige Moleküle durch die zentrale Pore des Tetramers passieren können, wird angenommen, dass die Oligomerisierung entscheidend für die Stabilität und Funktion der Aquaporine ist. Durch die Tetramerisierung wird wahrscheinlich die Rigidität des Kanals erhöht und damit auch die Kanalstabilität. So weisen vor allem Aminosäuren, die in der Kanalpore lokalisiert sind eine hohe Rigidität auf (vgl. Abbildung 8). Darüber hinaus scheint die Oligomerisierung die *in vivo* Stabilität von GlpF zu erhöhen (125).

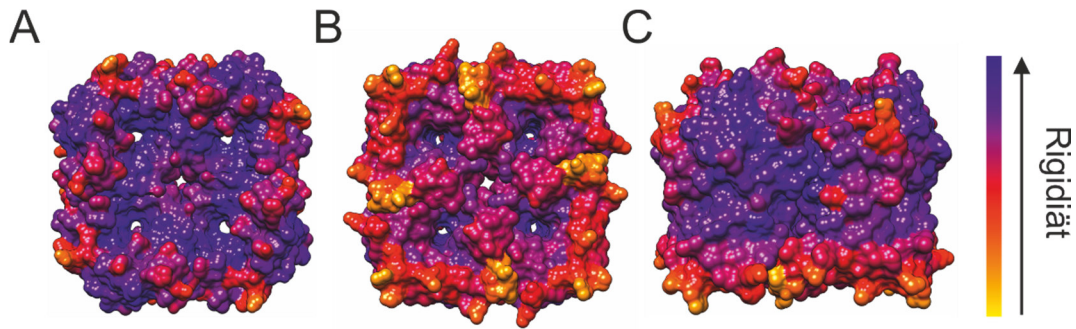


Abbildung 8: Rigidität des GlpF-Tetramers.

Darstellung der GlpF-Oberfläche (PDB-ID: 1FX8). Die Farbmarkierung der Aminosäurereste zeigt die Rigidität der einzelnen Aminosäuren an. Diese nimmt von gelb nach blau zu. (A) Aufsicht auf die Proteinoberfläche vom Periplasma aus. (B) Proteinoberfläche vom Cytoplasma aus gesehen. (C). Seitliche Sicht auf das GlpF-Tetramer.

Des Weiteren gibt es Hinweise auf kooperative Effekte zwischen den Aquaporin-Monomeren im assemblierten Tetramer (127, 130, 131). So wurde für AQP0 gezeigt, dass die Regulation der Proteinaktivität durch Zn^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen, den pH-Wert und Calmodulin kooperativ erfolgt. Außerdem sind für ein AQP1-Heterodimer Beobachtungen beschrieben, die auf nicht unabhängig funktionierende Monomere schließen lassen (128). In AQP1 führte die Fusion eines wildtypischen Monomers und eines durch die Mutation A73M inaktiven Monomers zu einem vollständigen Funktionsverlust des fusionierten Proteins (128). Auch Untersuchungen an den pflanzlichen Aquaporinen NtAQP1 und NtPIP2;1 weisen auf eine Kooperativität zwischen den Monomeren hin (132). So wurde für das heterotetramere Fusionskonstrukt, bestehend aus zwei wasserleitenden NtPIP2;1- und zwei nichtleitenden NtAQP1-Monomeren (2NtAQP1-2NtPIP2;1), ein Wasserfluss detektiert, der dem Niveau des NtPIP2;1 Homotetramers entsprach (132). Eine Kooperation der NtPIP2;1- mit den NtAQP1-Monomeren innerhalb des Tetramers scheint eine Konformationsänderung der NtAQP1-Monomere zu induzieren, sodass diese Kanäle auch den Wasserfluss ermöglichen (132).

1.1.5.2 Der Aquaporin-Kanal am Beispiel des bakteriellen Aquaglyceroporins GlpF

Die Struktur des *E. coli* Aquaglyceroporins GlpF wurde im Jahr 2000 durch Röntgenkristallographie mit einer Auflösung von 2,20 Å aufgeklärt (116). GlpF kristallisierte als Homotetramer mit drei Glycerolmolekülen in jeder Pore eines Monomers (vgl. Abbildung 7B). Basierend auf der Kristallstruktur von GlpF, das bis heute eines der am besten untersuchten Aquaporine darstellt, soll im Folgenden der charakteristische Porenaufbau der Aquaporine erläutert werden.

Auf einen etwa 15 Å breiten, periplasmatischen Kanaleingang folgt in GlpF eine erste Engstelle mit einem Durchmesser von 2,8 Å (133, 134). Der Durchmesser dieser Engstelle ist folglich gerade groß genug, dass die CH-OH-Gruppen dehydratisierter Polyalkohole passieren können. Die Engstelle stellt den amphipatischen Selektivitätsfilter, bestehend aus den vier

Aminosäuren Trp48, Gly199, Phe200 und Arg206, dar (Abbildung 9B). Im Selektivitätsfilter bilden die zwei aromatischen Ringe von Trp48 und Phe200 eine hydrophobe Tasche, in die das Glycerol-Kohlenstoffgerüst des Substrats eingebettet werden kann. Das Wasserstoffbrückenbindungspotential der Hydroxylgruppen des Substrats wird durch zwei Aminogruppen aus Arg206, die als Protonendonatoren fungieren, und den Carbonylgruppen der Gly191- und Phe200-Peptidbindungen, die als Protonenakzeptoren dienen, gesättigt.

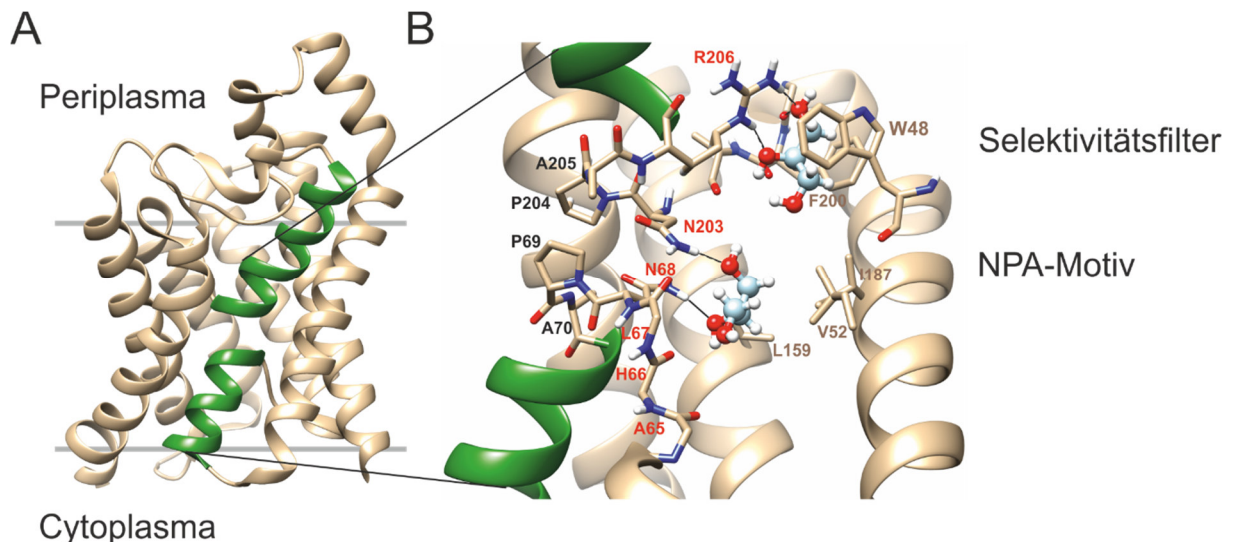


Abbildung 9: Glycerolfluss durch die amphiphatische Aquaglyceroporin Pore.

(A) Im GlpF-Monomer sind die beiden Halbhelices 3 und 7, an deren N-Termini die hochkonservierten NPA-Motive lokalisiert sind, grün dargestellt. (B) Veranschaulichung des Glycerolflusses durch die amphiphatische Kanalpore. Die Aminosäuren, die die hydrophile Kanalseite definieren, sind im Einbuchstaben-Code in rot markiert und Aminosäuren, welche die hydrophobe Seite des Kanals ausbilden, sind in braun beschriftet. Dargestellt sind die zwei NPA-Motive (Asn68, Pro69, Ala70 und Asn203, Pro204, Ala205) und die Aminosäuren Trp48, Phe200 und Arg206 des Selektivitätsfilters. In der GlpF-Kristallstruktur befindet sich ein Glycerolmolekül (hellblau, Kugelmodell) im Selektivitätsfilter und interagiert dort über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminogruppen NE und NH von Arg206 (schwarze Linie). Die Wasserstoffbrückenbindungen mit den Carbonylgruppen der Peptidbindung von Gly199 und Phe200 sind in dieser Ansicht nicht zu erkennen. Ein weiteres Molekül Glycerol (hellblau, Kugelmodell) interagiert über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminogruppen in der Seitenkette der Asparaginreste Asn68 und Asn203 der beiden NPA-Motive (schwarze Linie). Aufgezeigt sind auch die Peptidbindungen der Aminosäurereste His66, Ala65, Gly64 in der cytoplasmatischen Kanalhälfte. Die Carbonylsauerstoffatome dieser Peptidbindungen dienen als Protonenakzeptoren für die passierenden Glycerolmoleküle. Ferner sind die unpolaren Aminosäureseitenketten von Trp48, Phe200, Ile187, Leu159 und Val52 dargestellt, welche die unpolare Seite der amphiphatischen Pore definieren. Die Abbildung wurde basierend auf der Kristallstruktur von GlpF (PDB-ID: 1FX8) erstellt.

Auf den Selektivitätsfilter folgt ein etwa 28 Å langer, amphiphatischer Kanal, der in der Porenmitte auf Höhe der NPA-Motive eine zweite Engstelle aufweist (Abbildung 9B). Die polare Seite des Kanals wird durch Carbonylsauerstoffatome der Peptidbindung der Aminosäurereste His66, Ala65, Gly64 in der cytoplasmatischen Kanalhälfte und durch Ala201, Phe200 und Gly199 in der periplasmatischen Kanalhälfte definiert. Die als Protonenakzeptoren dienenden Carbonylsauerstoffatome werden durch ein hochkonserviertes Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk in Richtung des passierenden Substrats ausgerichtet. Entscheidend beteiligt sind an diesem Netzwerk die Glutamatreste des

hochkonservierten ExxxTxxL/F-Motivs in den Transmembranhelices 1 und 5 der Aquaporine (135). Die hydrophobe Seite des amphiphatischen Kanals wird durch eine Reihe vertikal aufeinanderfolgender, hydrophober Aminosäuren definiert. Auf diese Weise interagiert das Kohlenstoffrückgrat von Glycerol bei der Passage durch den Kanal mit den Seitenketten hydrophober Aminosäuren auf der einen Seite des Kanals und die Hydroxylgruppen des Substrats mit den Carbonylgruppen der Peptidbindung und den polaren Seitenketten der Aminosäuren Arg206, Asn68 und Asn203 auf der anderen Seite des Kanals.

Da die Dimensionen des Kanals nur den Fluss des dehydratisierten Substrats ermöglichen, beginnt im periplasmatischen Vestibul die schrittweise Dehydratisierung des Substrats. Dabei werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Substrat und Lösungsmittelmolekülen durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Substrat und Protonendonatoren sowie -akzeptoren auf der hydrophilen Kanalseite ersetzt. Während der Passage des Substrats kommt es so zur kontinuierlichen Auflösung und Neubildung von Wasserstoffbrückenbindungen, die die Aktivierungsenergie des Substratflusses reduzieren. Arg206 wird in diesem Zusammenhang sogar eine enzymatische Funktion zugesprochen, da dieses durch die perfekte Geometrie der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Arg206-Seitenkette und dem Substrat die Passage durch die engste Stelle des Kanals gewissermaßen katalysiert (116).

Da der Glycerolfluss bidirektional möglich ist, wird in *E. coli* durch GlpF aufgenommenes Glycerol durch die Glycerol-Kinase GlpK zu Glycerol-3-Phosphat phosphoryliert, sodass ein Ausstrom des Glycerols unterbunden wird.

Die Wasserpermeabilität von GlpF ist im Vergleich zu reinen Aquaporinen deutlich reduziert (136). Dies ist mit dem höheren, energetischen Aufwand für den Fluss eines Wassermoleküls zu begründen. Wasser liegt charakteristischerweise in Koordination mit vier bis fünf weiteren Wassermolekülen vor (137). Da der Substratfluss durch die enge Kanalpore einzeln erfolgt, können in Aquaglyceroporinen nur Wechselwirkungen mit zwei Wassermolekülen aufrechterhalten werden, sodass die energetische Barriere für den Wasserfluss hoch ist (116). In klassischen Aquaporinen sind die Aminosäurezusammensetzung und der Durchmesser des AQP1 Selektivitätsfilters, der aufgrund hochkonservierter aromatischer Reste und eines ebenfalls hochkonservierten Arginins als aromatische Arginin-Engstelle (ar/R-Region) bezeichnet wird, verändert. So wird die 3,4 Å breite ar/R-Engstelle durch die Aminosäuren Arg197, His182, Phe58 und Cys189 definiert (133). Histidin und Arginin können alle vier potentielle Wasserstoffbrückenbindungen eines Wassermoleküls an der engsten Stelle des Kanals sättigen.

1.1.5.3 Stereoselektivität des Substratflusses und Inhibition des Protonenflusses

Die Permeabilität von GlpF für lineare Polyalkohole ist im Vergleich zu chiralen Stereoisomeren höher (116), da die Orientierung der Protonendonatoren und -akzeptoren

entlang der Kanalachse, die den Substratfluss energetisch ermöglichen, eine bestimmte Ausrichtung des Substrats voraussetzt. So müssen zwei aufeinanderfolgende Hydroxylgruppen in Richtung der polaren Reste und das Kohlenstoffrückgrat entlang der hydrophoben Kanalachse ausgerichtet sein. Diese Bedingungen können nur durch bestimmte Enantiomere, die sich in der relativen Orientierung der Hydroxylgruppen zum Kohlenstoffrückgrat unterscheiden, erfüllt werden. GlpF ist auch für die analogen Zucker nicht permeabel (138).

Trotz der hohen Wasserpermeabilität sind Aquaporine undurchlässig für Protonen. Der Inhibition des Protonentransports kommt besondere Bedeutung zu, da die Aufrechterhaltung des Membranpotentials kritisch für eine Zelle ist. Für die Inhibierung der Protonenleitung wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen (139-142). Zum einen entsteht in der Pore ein positives elektrostatisches Potential, das in der Porenmitte maximal ist und somit durch elektrostatische Abstoßung den Protonentransport verhindert. Zum anderen ist das Wasserstoffbrückennetzwerk der Protonentransportkette nach dem Grotthus-Mechanismus, bei dem der Protonentransport durch die kontinuierliche Auflösung- und Neubildung von Wasserstoffbrückenbindungen erfolgt, unterbrochen und dadurch der Protonentransport unterbunden (142). So interagieren die NH_2 -Gruppen der beiden hochkonservierten Asparaginreste der NPA-Motive zeitgleich über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem einzelnen, passierenden Wassermolekül, sodass dieses nicht mehr als Protonenakzeptor zur Verfügung steht. Zudem werden während der Passage die Wassermoleküle durch Wechselwirkungen mit den Dipolmomenten der beiden Halbhelices um etwa 180° gedreht (139), sodass die Anordnung der Wasserstoff- und Sauerstoffatome den Austausch von Protonen nach dem Grotthus-Mechanismus nicht begünstigt (142). Ferner ist der Fluss von Protonen, Hydronium-Ionen und Hydroxid-Ionen auch durch den hohen energetischen Aufwand der Dehydratisierung energetisch ungünstig, da die aufgelösten Wasserstoffbrückenbindungen nicht durch Wechselwirkungen im Kanal kompensiert werden können (141).

1.1.6 Aquaporine in Lipidmembranen

Wie bereits beschrieben, sind bis heute etwa 40 Strukturen von insgesamt 14 Aquaporinen aus unterschiedlichen Organismen publiziert. In etwa der Hälfte dieser Strukturen wurden Detergenzmoleküle identifiziert (143). Lipidmoleküle bzw. Lipidfragmente wurden in der zentralen Pore des AqpZ Tetramers aus *E. coli* und des humanen AQP5 Tetramers sowie an der Monomeroberfläche von AqpZ und humanem AQP0 aufgelöst (144-146). Im Fall von AQP0 sind diese Lipidmoleküle jedoch nicht aus der natürlichen Membran, sondern stellen artifizielle Lipide dar, die zur Kristallisation verwendet wurden (147). Da in den meisten der gelösten Aquaporin-Strukturen keine Lipidmoleküle identifiziert wurden, ist anzunehmen, dass

Aquaporine keine definierten Lipidbindemotive aufweisen und daher auch keine bestimmten Lipide für ihre Aktivität benötigen (147). Die Kristallstrukturen von AQP0 in Dimyristoylphosphocholin (DMPC) und Membranen aus polaren *E. coli* Lipiden (EPL, engl.: *E. coli polar lipid*) sowie Moleküldynamik-Simulationen mit den 40 gelösten Aquaporin-Strukturen zeigten, dass die Membrandicke in der unmittelbaren Proteinumgebung an die hydrophobe Proteinoberfläche angepasst ist. So wurde unabhängig vom Lipidsystem und der Membrandicke in den Simulationen eine Distanz zwischen den Phosphat-Gruppen in den gegenüberliegenden Membranhälften (d_{P-P}) von 35 Å ermittelt (143, 148). Die Membrandicke in unmittelbarer Umgebung von AQP0 in DMPC- und EPL-Membranen wurde in 2D-Kristallen mit 33,6 Å und 31,9 Å bestimmt (146). Es wird daher für alle Aquaporine angenommen, dass diese die Dicke der Lipidmembran in der unmittelbaren Umgebung bestimmen und die Acylketten der Lipidmoleküle sich an die hydrophobe Proteinoberfläche anpassen (146). Moleküldynamik-Simulationen in Palmitoyl-oleoyl-PC (POPC)- und Palmitoyl-oleoyl-PE (POPE)-Membranen weisen überdies auf einen Einfluss der Lipidumgebung auf die Aquaporin-Aktivität hin (148, 149). So war das Aquaglyceroporin GlpF in simulierten POPE-Membranen etwa 20% aktiver als in POPC-Membranen. Auch Cholesterol und Sphingomyelin modulieren die Aktivität von AQP0 und AQP4 (150, 151). Ferner scheint die AqpZ-Tetramerstabilität sowie -Funktion durch CL beeinflusst zu werden (152). Detaillierte Informationen über die Abhängigkeit der Aquaporin-Aktivität von verschiedenen Lipiden bzw. Membraneigenschaften sind jedoch nicht bekannt, da der Effekt variierender Membranumgebungen auf die Aquaporin-Aktivität nur in wenigen Beispielen untersucht wurde (150, 151).

2.3 Motivation und Ziele der Arbeit

Aquaporine weisen eine hochkonservierte Struktur auf und liegen innerhalb biologischer Membranen als Homotetramere vor. Dieses konservierte Oligomerisierungsverhalten ist trotz etwa zwanzigjähriger Forschung an Aquaporinen nicht hinreichend verstanden, da die funktionelle Einheit für den Substratfluss bereits durch das Aquaporin-Monomer definiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit sollten an dem bakteriellen Aquaglyceroporin GlpF als Modell, sowohl proteinbasierte als auch lipidmembranassoziierte Einflüsse auf die Aquaporin-Oligomerisierung und -Funktion *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Diese Untersuchungen sollen das Verständnis der Zusammenhänge zwischen Struktur, Dynamik und Funktion der Aquaporine verbessern.

I. *Funktion und Oligomerisierung fusionierter GlpF-Monomere*

Gegenwärtig sind die Konsequenzen der Aquaporin-Tetramerisierung noch nicht vollständig verstanden. Um die molekularen Mechanismen der Aquaporin

Oligomerisierung und Funktion näher zu untersuchen, sollten fusionierte GlpF-Homooligomere sowie GlpF-Heterotetramere aus wildtypischen und Monomeren mit beeinträchtigtem Translokationsmechanismus erstellt werden und die Funktion dieser *in vivo* ermittelt werden.

II. *Einfluss definierter Phospholipide und physikochemischer Membraneigenschaften auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF*

Die Stabilität, Struktur und Funktion integraler Membranproteine kann sowohl durch spezifische als auch durch unspezifische Interaktionen mit der Lipidumgebung modifiziert werden. Da bereits Hinweise existieren, dass die Aktivität von Aquaporinen durch die Lipidumgebung beeinflusst werden kann, sollte systematisch der Einfluss der Phospholipide PC, PE, PG, CL und PS sowie der Acylkettenlänge auf die Tetramerstabilität sowie die Funktion von GlpF *in vitro* anhand von liposomalen Modellmembransystemen ermittelt werden.

In vivo sollten durch Insertion des Anästhetikums 2-Phenylethanol (2-PEtOH) in die innere *E. coli*-Membran der Einfluss veränderter physikochemischer Membraneigenschaften auf die Oligomerisierung und Aktivität von GlpF erfasst werden.

III. *GlpF als Modell für humane Aquaporine: Einfluss einer Punktmutation auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF*

Zahlreiche Punktmutationen in humanen Aquaporinen sind aktuell identifiziert. Der Einfluss dieser Mutationen auf die Funktion der Aquaporine ist jedoch häufig noch nicht charakterisiert. Daher sollten an GlpF exemplarisch die Konsequenzen der im humanen AQP2 identifizierten Punktmutation V71M auf die Tetramerisierung und Aktivität von GlpF *in vivo* untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.4 Material

2.4.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Substanzen sowie Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Acros Organics (Morris Plains, NJ, USA), AppliChem (Darmstadt), Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (München) bezogen (siehe Tabelle A 1). Die verwendeten Phospholipide wurden ausschließlich von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) erworben. Eine Tabelle mit den systematischen Bezeichnungen der Lipide ist im Anhang zu finden (Tabelle A 2).

2.4.2 Enzyme

Tabelle 1: Enzyme und dazugehörige Puffer.

Enzym/Puffer	Hersteller
<i>Bam</i> H1 (20 U/μL)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
<i>Dpn</i> I (20 U/μL)	
<i>Nde</i> I (20 U/μL)	
<i>Nhe</i> I (10 U/μL)	
<i>Sal</i> I-HF (20 U/μL)	
<i>Xho</i> I (20 U/μL)	
10x NEB Buffer 2, 3 und 4	
Phusion DNA Polymerase (2 U/μL)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
5x Phusion HF Reaction Buffer	
T4-DNA-Ligase (400 U/μL)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
10 x T4-DNA-Ligase-Puffer	

2.4.3 Kits und Größenstandards

Tabelle 2: Verwendete Kits und Größenstandards.

Name	Hersteller
BCA Protein Assay Kit (bicinchoninic acid)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, II USA
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	Avegene, Taipei City, Taiwan
High-Speed Plasmid Mini Kit	Avegene, Taipei City, Taiwan
JETSTAR™ 2.0 Plasmid Purification MIDI Kit	Genomed, Löhne
Pierce™ ECL Western-Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, II USA

Name	Hersteller
Gene Ruler™ 1 kb Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-170 kDa)	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Unstained Protein Ladder (10-200 kDa)	Fermentas, St. Leon-Rot

2.4.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Bezeichnung	Hersteller
Blotting-Papier	Thick Blot Paper	Bio-Rad, München
Dialyseschlauch	Spectra/Por® Membrane (12-14 kD)	Spectrumlabs, Breda, Niederlande
Einmalspritzen	Omnifix® 1-10 ml	Braun, Melsungen
Küvetten	Halbmikroküvetten UV-Küvette mikro, Plastibrand®	Sarstedt, Nümbrecht Brand, Wertheim
PD-10-Säulen	PD-10 Desalting Columns	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA
PVDF (Polyvinylidenfluorid)- Membran	Roti®-PVDF; 0,45 µm	Roth, Karlsruhe, Karlsruhe
Säulenkörper	5 mL Disposable Plastic Columns	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA
Spritzenfilter	Filtropur S 0.2µm	Sarstedt, Nümbrecht

2.4.5 Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Brutschrank	B28	Binder, Tuttlingen
Chemielumineszenzdetektor	STELLA	Raytest, Straubenhardt

Gerät	Modell	Hersteller
Elektrophoresekammern	Mini-Protean® 3 Cell	Bio-Rad, München
	Mini-Protean® Tetra Cell	Bio-Rad, München
	PerfectBlue Gelsystem S, M, L	Peqlab, Erlangen
Elektrophoresenetzgeräte	PowerPac Basic™*	Bio-Rad, München
	PowerPac HC™	Bio-Rad, München
	peqPower 300 Volt	Peqlab, Erlangen
Evaporationseinheit	Reacti-Therm™ Heating Module	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA
Fluorimeter	Spectrofluorometer Fluoromax 4	Horiba, Kyoto, Japan
FPLC-System	FPLC-Systems ÄKTApurifier™ 10 mit Fraktionssammler Frac920	GE Healthcare, Freiburg
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	MR Hei Standard	Heidolph, Schwabach
Mikrowelle	MD 6459	Microstar
pH-Meter	pH211 Microprocessor	HANNA instruments, Kehl
Photometer	Lambda 35 UV/Vis Spectrometer	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Schüttelinkubator	Multitron HT	Infors, Bottmingen, Schweiz
<i>Speedvac</i>	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
<i>Stopped-Flow-Apparatur</i>	SX-18.MV	Applied Photophysics, Leatherhead, U.K.
<i>Tank-Blot-Apparatur</i>	Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, München
Taumelschüttler	Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermocycler	Primus	Avisco, Jena
Ultraschallbad	USC500T	VWR, Ismaning
Ultraschallgerät	Sonifier 450	Branson, Danbury, CT, USA

Gerät	Modell	Hersteller
Vakuum-Pumpe	High Vacuum Pump	Edwards, Crawley, U.K.
Vortex-Mixer	Reagenzglasschüttler	VWR, Ismaning
Zentrifugen	Avanti® J-26 XP	Beckmann Coulter, Krefeld
	Optima™ L Series	Beckmann Coulter, Krefeld
	Ultracentrifuge	
	5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenrotoren	5424	Eppendorf, Hamburg
	JA-25.50	Beckmann Coulter, Krefeld
	JLA-8.100	Beckmann Coulter, Krefeld
	70 Ti	Beckmann Coulter, Krefeld
Zetasizer	90 Ti	Beckmann Coulter, Krefeld
	Zetasizer-Nano-S	Malvern Instruments, Herrenberg

2.4.6 Puffer und Kulturmedien

Reagenzien für Puffer und Lösungen wurden je nach Bedarf in Milli-Q- oder deionisiertem Wasser gelöst und gegebenenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur bzw. 4 °C. Die Antibiotika-Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert.

Tabelle 5: Verwendete Puffer, Lösungen und Kulturmedien.

Puffer/Lösung/Medium	Zusammensetzung
Ampicillin-Stammlösung (100 mg/mL) (sterilfiltriert)	100 mg Ampicillin pro 1 mL Lösung 50% (v/v) Ethanol
Blockpuffer	TBST
	5% Milchpulver
Chloramphenicol-Stammlösung (50 mg/mL) (sterilfiltriert)	50 mg Chloramphenicol pro 1 mL Lösung
	100% (v/v) Ethanol
Coomassie-Färbelösung	44,8% (v/v) Ethanol
	5,2% (v/v) Essigsäure
	0,125% (w/v) Coomassie Brilliantblau R250
n-Dodecyl β-D-maltosid (DDM)-Puffer	5 mM DDM
	10 mM Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O, pH 8,0

Puffer/Lösung/Medium	Zusammensetzung
Dialysepuffer	150 mM N-Methylglucamin 50 mM 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), pH 7,5 50 mM NaCl
DNA-Probenauftragspuffer (6x)	Glycerin 50% (v/v) Bromphenolblau 0,05% (w/v) Xylencyanol 0,05% (w/v)
Elutionspuffer	Resuspensionspuffer I, pH 8,0 50 mM OG oder 5 mM DDM 400 mM Imidazol
Entfärbe-Lösung (Coomassie)	40 % Methanol 10 % Essigsäure (konz.)
HEPES-Puffer	10 mM HEPES (pH 7,4) 150 mM NaCl
Kanamycin-Stammlösung (50 mg/mL) (sterilfiltriert)	50 mg Kanamycin Sulfat pro 1 mL Lösung
LB (Luria-Bertani)-Agar (autoklaviert und bei Bedarf nach Abkühlen auf etwa 50 °C mit Antibiotika versetzt)	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl 1,5% (w/v) Agarose
LB-Medium (autoklaviert und bei Bedarf nach Abkühlen auf etwa 50 °C mit Antibiotika versetzt)	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl
o-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid (ONPG)-Lösung (sterilfiltriert)	0,4% (w/v) ONPG 1x-Z-Puffer
Phosphat-Puffer	10 mM Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O, pH 8,0 250 mM Tris-HCl, pH 6,8
5x Probenpuffer (SDS frei)	10% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerin
Resuspensionspuffer I	50 mM Phosphat, pH 8,0 (43 mM Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O und 7 mM Na ₂ H ₂ PO ₄ ·H ₂ O) 300 mM NaCl 10% (v/v) Glycerol

Material und Methoden

Puffer/Lösung/Medium	Zusammensetzung
Resuspensionspuffer II	25 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 mM EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat 0,1% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail
Ribitolösung	LB-Medium bzw. Dialysepuffer 600 mM Ribitol
Sammelgelpuffer (Laemmli)	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4% SDS
SDS-Laufpuffer (Laemmli)	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
5x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 10% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerin 0,2% (w/v) Bromphenolblau 500 mM β -Meracptoethanol (optional)
SDS-Stammlösung	10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, pH 8,0 500 mM SDS 5 mM DDM
Solubilisierungspuffer	Resuspensionspuffer I, pH 8,0 50 mM Octyl- β -D-glucopyranosid (OG)
TAE (Tris-Acetat-EDTA) -Puffer	40 mM Tris-Essigsäure, pH 8,0 1 mM EDTA
<i>Tank-Blot</i> -Puffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
TBS (<i>Tris buffered saline</i>)	20 mM Tris-HCl, pH 7,8 180 mM NaCl
TBST (<i>Tris buffered saline + Tween 20</i>)	TBS 0,05% (v/v) Tween 20
Trenngelpuffer (Laemmli)	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4% SDS

Puffer/Lösung/Medium	Zusammensetzung
TSB (<i>Tryptic Soy Broth</i>)-Medium (sterilfiltriert)	10% (w/v) PEG 4000
	5% (v/v) DMSO
	2% (v/v) 1 M MgCl ₂
	1% (w/v) Trypton
	0,5% (w/v) Hefeextrakt
	0,5% (w/v) NaCl
Waschpuffer I	Resuspensionspuffer I, pH 8,0
	50 mM OG bzw. 5 mM DDM
	40 mM Imidazol
Waschpuffer II	Resuspensionspuffer I, pH 8,0
	50 mM OG bzw. 5 mM DDM
	80 mM Imidazol
5x Z-Puffer	300 mM Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O
	200 mM Na ₂ H ₂ PO ₄ ·H ₂ O
	50 mM KCl
	5 mM MgSO ₄ ·7 H ₂ O
1x Z-Puffer	20% (v/v) 5x-Z-Puffer
	0,27% (v/v) β-Mercaptoethanol

2.4.7 Bakterienstämme

Tabelle 6: Verwendete *E. coli*-Stammkulturen.

Stammkultur	Genotyp	Herkunft
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm λ(DE3)</i>	Novagen
NT326	F ⁻ <i>araD193 ΔlacU169 rpsL thi ΔmalE444 recA1</i>	(153)
SK46	MM294 (F ⁻ <i>endA1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁻) supE44 thi-1 glpF⁻ aqpZ⁻</i> ; Km ^r Sm ^r)	(154)
SU101	<i>lexA71::Tn5(def) sulA211 ΔlacI(POZYA) 169/F' lac^a lacZΔM15::</i> Tn9	(155)
XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB</i> <i>acl^qZΔM15 Tn10(Tet^r)]^c</i>	(156)

2.4.8 Antikörper

Die Antikörper wurden wie in Tabelle 7 angegeben mit TBST verdünnt.

Tabelle 7: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Typ	Epitop	Hersteller	Verdünnung
Anti-GlpF (C-Terminus)	polyklonal, Kaninchen	VVEEKETTTPSEQKASL	Gramsch, Schwabhausen	1:10.000
Anti-LexA	polyklonal, Kaninchen	LexA-DNA- Bindungsdomäne	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA	1:5.000
Anti- Kaninchen- <i>horseradish</i> <i>peroxidase</i> (HRP)	polyklonal, Ziege	Kaninchen IgG	Sigma-Aldrich, München	1:10.000

2.4.9 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide in Tabelle 8 kodieren für das Enzym β -Laktamase, das eine Ampicillinresistenz vermittelt.

Tabelle 8: Verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Referenz
pCS2-Venus	Ampicillin	(157)
pGlpF	Ampicillin	(125)
P1xGlpF	Ampicillin	diese Arbeit
P2xGlpF	Ampicillin	diese Arbeit
P3xGlpF	Ampicillin	diese Arbeit
P4xGlpF	Ampicillin	diese Arbeit
p1xGlpF-E43A	Ampicillin	diese Arbeit
p3xGlpF-1xGlpF-E43A	Ampicillin	diese Arbeit
p2xGlpF-2xGlpF-E43A	Ampicillin	diese Arbeit
p1xGlpF-3xGlpF-E43A	Ampicillin	diese Arbeit
p4xGlpF-E43A	Ampicillin	diese Arbeit
pGlpF-V71M	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA-GlpF	Ampicillin	(125)
pLexA-1xGlpF	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA-2xGlpF	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA-3xGlpF	Ampicillin	diese Arbeit

Plasmid	Resistenz	Referenz
pLexA-4xGlpF	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA-GlpF-V71M	Ampicillin	diese Arbeit
pLexA-GpA	Ampicillin	(158)
pLexA-GpA-G83I	Ampicillin	(158)
pMal-p2	Ampicillin	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
pMal-p2x	Ampicillin	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
pRSET-His-GlpF	Ampicillin	(125)
pRSET-His-1xGlpF	Ampicillin	diese Arbeit
pRSET-His-2xGlpF	Ampicillin	diese Arbeit
pRSET-His-3xGlpF	Ampicillin	diese Arbeit
pRSET-His-4xGlpF	Ampicillin	diese Arbeit
pVenus-GlpF	Ampicillin	diese Arbeit

2.4.10 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG (Martinsried) als Lyophilisat bezogen und in sterilem, Nuklease freiem Wasser gelöst (Konzentration 100 μ M). Alle Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

2.4.11 Computerprogramme

Tabelle 9: Verwendete Computerprogramme.

Anwendung	Programm
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop 7.0.1
	CorelDRAW X7
Darstellung von Proteinstrukturen	UCSF Chimera 1.9 (159)
Diagramme und Tabellen	Origin 6.0
Exponentielle Regression	Origin 6.0
	Pro-Data SX Version 2.0.7
Gerätesoftware	PerkinElmer UV Winlab
	Pro-Data SX Version 2.0.7
	XStella 1.00
	FluorEssence V3.5
Klonierungen	Unicorn 4.0
	Genamics Expression
Proteinkonzentrationsbestimmung	Expasy ProtParam

Anwendung	Programm
Quantifizieren der SDS-PAGE und Western Blot-Analysen	ImageJ
Sequenzvergleich	Online-Server TCoffee (160) ClustalW2 (161, 162)
Textverarbeitung	Microsoft Word 2013

2.5 Methoden

2.5.1 Molekularbiologische Methoden

2.5.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl.: *desoxyribonucleic acid*) aus *E. coli* wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit Hilfe des *High-Speed Plasmid Mini Kits* der Firma Avegene (Taipei City, Taiwan) entsprechend des Herstellerprotokolls isoliert. Abweichend von den Herstellerangaben wurde die Plasmid-DNA mit 50 µL auf 70 °C erhitztem, autoklaviertem Milli-Q-Wasser eluiert. Die Isolation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *JETSTAR™ 2.0 Plasmid Purification MIDI Kit* der Firma Genomed (Löhne).

2.5.1.2 Präparativer und analytischer Restriktionsverdau

Für die Restriktion von Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurden Typ II Restriktionsenzyme verwendet. Die Hydrolyse der DNA mit Restriktionsenzymen wurde nach Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt. Zur Kontrolle von Klonierungen wurde ein analytischer Restriktionsverdau mit 2 µL DNA in einem Endvolumen von 10 µL durchgeführt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Präparative Restriktionen für eine anschließende Klonierung wurden in einem Volumen von 50 µL durchgeführt, wobei 7,5 µg DNA eingesetzt wurden. Die präparative Restriktion erfolgte 2 h bei 37 °C. Die Restriktion mit unterschiedlichen Enzymen konnte bei kompatiblen Puffer- und Reaktionsoptima gleichzeitig durchgeführt werden. Die restringierte DNA wurde im Anschluss mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

2.5.1.3 Agarosegelelektrophorese zur Analyse und Isolierung von Nukleinsäuren

Zur Kontrolle von Klonierungen und der präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurden diese in 1%igen (w/v) Agarosegelen aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert, durch Bestrahlung mit UV-Licht detektiert.

Die Agarose wurde in Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer in einem Mikrowellengerät durch Erwärmen gelöst und anschließend luftblasenfrei in eine vorbereitete Gelkammer gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nach Aushärten des Gels, wurde dieses mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 des Volumens mit 5x DNA-

Probenauftragspuffer versetzt und mit 6 µL DNA-Marker (*Fermentas - GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder*) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Gleichspannung von 140 V. Nach durchgeführter Elektrophorese wurde das Gel 30 min in wässriger Ethidiumbromid Lösung (200 µg/ 600 mL) inkubiert und im Anschluss die DNA mittels Ultraviolett (UV)-strahlung fotografisch dokumentiert.

2.5.1.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die elektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Durchlichttisch zu präparativen Zwecken mit einem Skalpell vorsichtig ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus der Agarose wurde mit Hilfe des *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kits* der Firma Avegene entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Abweichend von den Herstellerangaben wurde die Plasmid-DNA mit 50 µL auf 70 °C erhitztem, autoklaviertem Milli-Q-Wasser eluiert.

2.5.1.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte photometrisch durch Extinktionsmessungen bei 260 nm. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht die Absorption von 1 einer Konzentration von 50 ng/µL (163).

2.5.1.6 Ligation

Die Ligation von *Insert*-DNA mit linearisierter Vektor-DNA erfolgte mit der T4 DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µL bei 16 °C über Nacht nach Herstellerangaben. Das molare Verhältnis von Vektor zu *Insert*-DNA betrug etwa 1:3.

2.5.1.7 DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl.: *polymerase chain reaction*) können DNA-Segmente *in vitro* spezifisch vervielfältigt werden. Die als Matrize eingesetzt DNA wird hierzu zunächst denaturiert, um die Hybridisierung der komplementären Primer zu ermöglichen. Der neue DNA-Strang wird dann durch die eingesetzte DNA-Polymerase ausgehend von den Primern in 5' → 3' Richtung synthetisiert. Abhängig von der Anwendung wurde der Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation 16- bzw. 25-mal wiederholt. Das Volumen eines Standard-PCR-Ansatzes betrug 50 µL. Die Komponenten eines solchen Ansatzes sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: PCR Standardreaktionsansatz.

Substanz	Volumen [µL]
DNA Matrize	1 (1 - 10 ng)
<i>Forward</i> -Primer (10 pmol/µL)	1

Substanz	Volumen [μL]
Reverse-Primer (10 pmol/ μL)	1
Desoxiribonukleosidtriphosphat (dNTP)-Mischung (20 mM)	1
Phusion DNA-Polymerase (2 U/ μL)	0,5
5x Phusion <i>HF Reaction Buffer</i>	10
MgCl ₂ (50 mM)	1
DMSO	1
Milli-Q-Wasser (autoklaviert)	35,5

Das Temperatur-Zeitprogramm einer PCR ist Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: PCR-Temperatur-Zeitprogramm

Prozess	Zeit	Temperatur	
1. Denaturierung	1 min	98°C	
2. Denaturierung	30 s	98°C	} 16/25x
3. Primerhybridisierung	1 min	55°C	
4. Elongation	1 min/1kb	72°C	
6. Elongation	7 min	72°C	
7.	4°C	∞	

Die PCR-Amplifikate wurden für weitere Klonierungsschritte mit dem *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit* nach Herstellerangaben aufgearbeitet.

2.5.1.8 Klonierungsstrategien

2.5.1.8.1 Ortspezifische Mutagenese

Mittels der ortsspezifischen Mutagenese können gezielt einzelne sowie multiple Mutationen eingeführt werden. Darüber hinaus können Basen sowohl deletiert als auch neu eingeführt werden. Für die ortsspezifische Mutagenese wurden neben dem Plasmid-Vektor, der als Vorlage diente, Primer, welche für die entsprechende Mutation kodieren, eingesetzt. In einer PCR mit 16 Reaktionszyklen wurde das vollständige Plasmid amplifiziert. Zur Kontrolle der Amplifikation wurde eine analytische Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Bei erfolgreicher Amplifikation wurde durch Zugabe von 1 μL der Endonuclease *DpnI* zu 50 μL PCR-Ansatz die parentale DNA 1 h bei 37 °C restringiert und anschließend 5 μL des Ansatzes in kompetente *E. coli* XL1-blue-Zellen transformiert. Nach einer DNA-Minipräparation wurde der Erfolg der ortsspezifischen Mutagenese durch Sequenzierung des betreffenden DNA-Abschnitts durch die Firma Eurofins MWG (Martinsried) überprüft.

Tabelle 12: Primer für die ortspezifische Mutagenese.

Die mutierten bzw. zusätzlichen Basen sind in Fettdruck hervorgehoben.

Bezeichnung	5`-Sequenz-3`
QC GlpF-V71M for	CATCTTAATCCCGCT ATG ACCATTGCATTGTGG
QC GlpF-V71M rev	CCACAATGCAATGGT CAT AGCGGGATTAAGATG
QC GlpF Stop Sall for	CAAAAAGCTTCGCTG TA AGTCGACGGATCCGGC
QC GlpF Stop Sall rev	GCCGGATCCGTCGAC TTAC AGCGAAGCTTTTTG
QC GlpF-E43A for	CGTCTTTTGGTCAGTGGG CAAT CAGTGTCAATTTGGG
QC GlpF-E43A rev	CCCCAAATGACACTGATT GCCCACT GACAAAAGAC

2.5.1.8.2 Klonierung der GlpF-Fusionskonstrukte

Die Gene, welche für die GlpF-Monomere der künstlichen GlpF-Fusionsvarianten kodieren, wurden durch Anfügen der Erkennungssequenzen der kompatiblen Restriktionsenzyme *XhoI* und *SalI* am 5`- bzw. 3`-Ende des *glpF*-Gens verknüpft. Die Klonierungsstrategie ist im Folgenden für die pRSET-His-GlpF und pGlpF basierten Plasmide, welche eine 5`-*NdeI*-Schnittstelle enthalten, dargestellt. Die Klonierung der pLexA-GlpF basierten Plasmide erfolgte analog, jedoch über eine 5`-*NheI*-Schnittstelle.

Um die zusätzlichen 5`-*XhoI*- und 3`-*SalI*-Restriktionsschnittstellen einzufügen und darüber hinaus am 3`-Ende das Stopcodon zu entfernen, wurde das *glpF*-Gen in einer PCR mit den in Tabelle 13 erfassten Primern amplifiziert (vgl. Abbildung 10, Schritt 1). Im Folgenden dienen die Amplifikate sowohl als *Insert*-DNA für die sukzessive Verknüpfung der *glpF*-Gene und auch für die Generierung der Plasmid-Vektoren pRSET-His-1xGlpF und p1xGlpF (vgl. Abbildung 10, Schritt 2). Für die Erzeugung der Plasmid-Vektoren pRSET-His-1xGlpF und p1xGlpF wurden die Amplifikate präparativ mit den Restriktionsenzymen *NdeI* sowie *BamHI* restringiert. Anschließend wurden diese zwischen die *NdeI*- und *BamHI*-Schnittstellen der Vektoren pRSET-His-GlpF bzw. pGlpF kloniert. Mittels einer ortspezifischen Mutagenese wurde dann am 3`-Ende des *glpF*-Gens in den neuen Vektoren ein Stopcodon eingefügt (vgl. Abbildung 10 Schritt 2). Zur Fusion der *glpF*-Gene wurde *NdeI/SalI* restringierte *Insert*-DNA zwischen die *NdeI*- und *XhoI*-Schnittstellen der Vektoren pRSET-His-1xGlpF und p1xGlpF kloniert (vgl. Abbildung 10, Schritt 3). In den neuen Plasmiden pRSET-His-2xGlpF und p2xGlpF entsteht durch Ligation der durch *XhoI*- und *SalI* erzeugten komplementären Enden eine Sequenz, die nicht mehr durch *XhoI*- bzw. *SalI* erkannt wird. Zur Konstruktion der trimeren und tetrameren Fusionsproteine wurde Schritt 3 noch ein bzw. zwei Mal wiederholt. Allerdings wurde statt des Vektors, der für monomeres GlpF kodiert, der in der jeweiligen Vorstufe erzeugte Vektor mit dem dimeren bzw. trimeren Fusionskonstrukt verwendet.

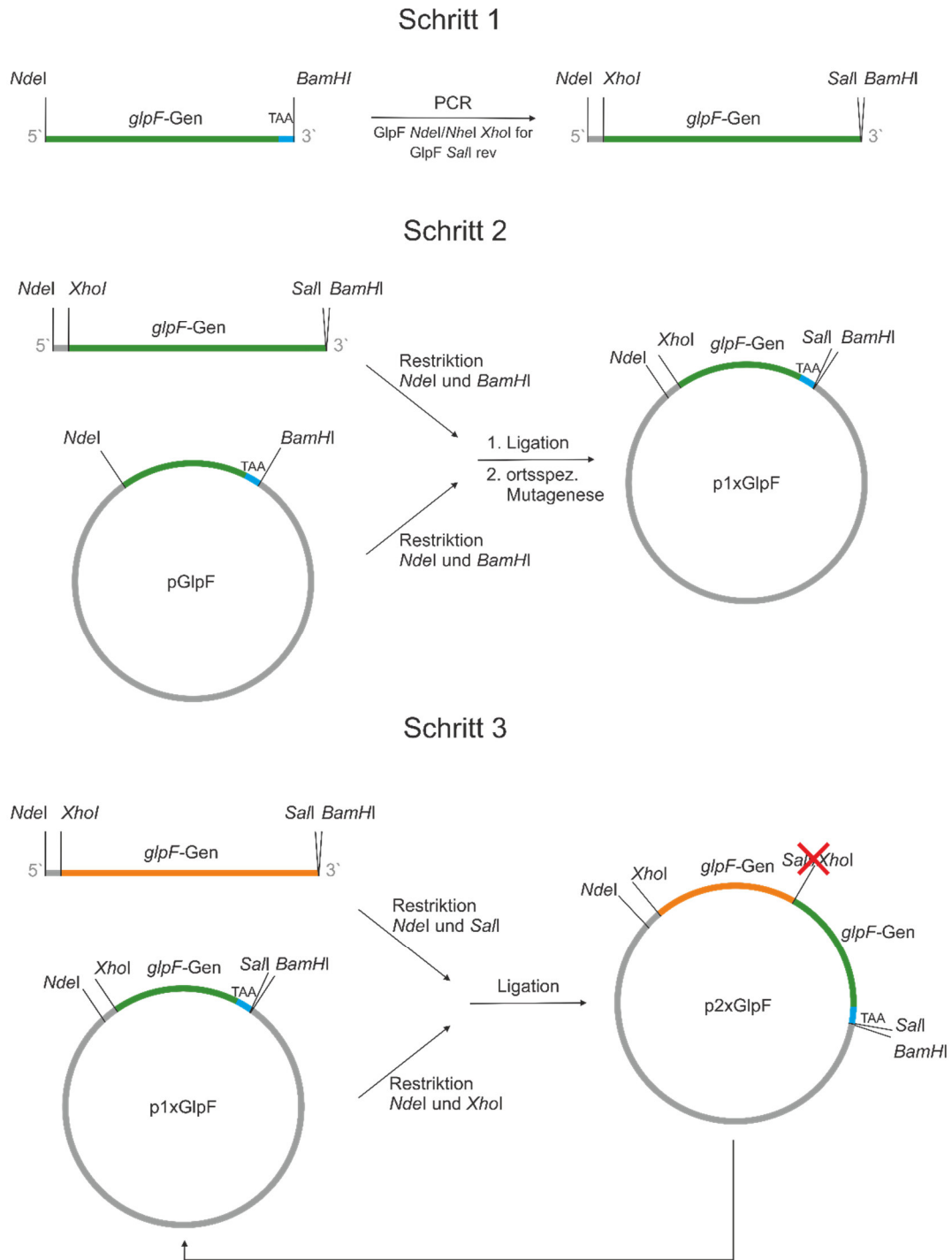


Abbildung 10: Klonierungsschema der GlpF-Fusionskonstrukte.

Die Klonierung der GlpF-Fusionskonstrukte ist schematisch ausgehend vom Plasmid pGlpF dargestellt. Die Klonierung der pRSET-His und pLexA basierten Plasmide erfolgte analog, im Fall von pLexA jedoch über eine 5'-*NheI*-Schnittstelle. In Schritt 1 wird in einer PCR die GlpF-Insert-DNA erzeugt, die neben der 5'-*NdeI*- und 3'-*BamHI*-Schnittstelle zusätzlich am 5'- bzw. 3'-Ende die Erkennungssequenz der kompatiblen Restriktionsenzyme *XhoI* bzw. *SalI* enthält. In Schritt 2 wird der Plasmid-Vektor p1xGlpF erzeugt. Dieser unterscheidet sich vom Ausgangsvektor darin, dass das *glpF*-Gen ebenfalls durch die Restriktionsschnittstellen *XhoI* bzw. *SalI* flankiert ist. In Schritt 3 erfolgt schließlich die Fusion zweier *glpF*-Gene. *NdeI* und *SalI* restringierte GlpF-Insert-DNA wird zwischen die *NdeI*- und *XhoI*-Schnittstelle des Vektors p1xGlpF kloniert. Die Ligation der durch *XhoI*- und *SalI*-Restriktion erzeugten komplementären Enden führt im neuen Plasmid p2xGlpF zu einer Sequenz, die nicht mehr durch *XhoI* oder *SalI* erkannt wird.

Für die Klonierung der künstlichen, tetrameren GlpF-Fusionskonstrukte mit steigender Anzahl an mutierten GlpF-Monomeren wurde zunächst in den Vektor p1xGlpF sowie in die Vorstufe dieses Vektors (enthält keine Stopcodon) die Mutation E43A mittels ortsspezifischer Mutagenese eingeführt. Die Fusion der einzelnen *glpF*-Gene erfolgte wie im vorherigen Absatz beschrieben. Dabei wurde je nach endgültiger Anzahl an mutierten, Monomeren im fusionierten Tetramer entweder das wildtypische *glpF*-Gen oder das mutierte *glpF*-Gen als *Insert*-DNA verwendet. In den heterotetrameren Konstrukten wurden zuerst die mutierten *glpF*-Gene sukzessive an das 5'-Ende des vorhergehenden, mutierten *glpF*-Gens geknüpft und dann die wildtypischen *glpF*-Gene.

Tabelle 13: Primer für die Klonierung der künstlichen GlpF-Fusionsvarianten.

Die GlpF spezifischen Sequenzen sind unterstrichen dargestellt und die Restriktionsschnittstellen grau hinterlegt.

Bezeichnung	5`-Sequenz-3`
GlpF <i>NdeI</i> <i>XhoI</i> for	GCGCGCCATATGGGCAGCGGCCTCGAGATGAGTCAAACATCAACC
GlpF <i>SaII</i> rev	GCGCGCGGATCCGTCGACCAGCGAAGCTTTTTG
GlpF <i>NheI</i> <i>XhoI</i> for	GCGCGCGCTAGCGGCAGCGGCCTCGAGATGAGTCAAACATCAACC

2.5.1.8.3 Klonierung von pVenus-GlpF

Die zu der Klonierung des Venus-GlpF-Fusionskonstruktes benötigte *venus*-DNA wurde mittels einer PCR aus dem Plasmid pCS2-Venus amplifiziert (157) (Tabelle 14). Dabei wurde eine 5'-*NdeI* und eine 3'-*NheI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt und das Stopcodon entfernt. Das *NdeI/NheI* restringierte Amplifikat wurde daraufhin in den pLexA-GlpF-Vektor zwischen die *NdeI*- und *NheI*-Schnittstellen kloniert (125).

Tabelle 14: Primer für die Klonierung des Venus-GlpF-Fusionsproteins.

Die Venus spezifischen Sequenzen sind unterstrichen dargestellt und die Restriktionsschnittstellen grau hinterlegt.

Bezeichnung	5`-Sequenz-3`
Venus <i>NdeI</i> for	GCGCGCCATATGGTGAGCAAGGGCGAG
Venus <i>NheI</i> rev	GCGCGCGCTAGCCTTGTACAGCTCGTCCATG

2.5.1.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG (Martinsried) nach der Kettenabbruch-Methode mittels fluoreszenzmarkierter Nukleotide nach Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Die folgenden Primer wurden hierfür verwendet (Tabelle 15).

Tabelle 15: Sequenzierprimer.

Bezeichnung	5`-Sequenz-3`	Verwendung
M13uni (-21)	TGTAAAACGACGGCCAGT	pMal-p2-Plasmide (ausgehend vom 3`-Ende)
M13rev(-49)	GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG	pMal-p2- und pLexA-Plasmide (ausgehend vom 5`-Ende)
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	pRSET-His-Plasmide (ausgehend vom 5`-Ende)
T7 term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	pRSET-His-Plasmide (ausgehend vom 3`-Ende)
MalEcheck	CAGTTGCCGCAACCTGTGG	pLexA-Plasmide (ausgehend vom 3`-Ende)

2.5.2 Mikrobiologische Methoden

2.5.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde die Methode nach Chung und Miller angewandt (164). Dazu wurden 3 mL Luria-Bertani (LB)-Medium mit einer Einzelkolonie des jeweiligen *E. coli*-Stammes inokuliert und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 mL frisches LB-Medium im Verhältnis 1:100 mit der Vorkultur inokuliert und die Zellen bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 3220 g und 4 °C 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 mL eiskaltem *Tryptic Soy Broth* (TSB)-Medium resuspendiert. Nach mindestens 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension 100 µL-weise aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.5.2.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-10 µL zu transformierender DNA versetzt (nicht mehr als 1 µg DNA in maximal 10 µL) und die Zellen 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein 45 s langer Hitzeschock bei 42 °C. Die Zellen wurden daraufhin 2-3 min auf Eis abgekühlt, anschließend mit 500 µL LB-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden dann bei Raumtemperatur und 20.800 g 1 min zentrifugiert und der Überstand bis auf 150 µL abgenommen und das Zellpellet resuspendiert. 80 µL der Zellsuspension wurden auf ampicillinhaltigen (100 µg/mL) Agarplatten ausplattiert. (SU101-Zellen wurden auf ampicillin- (100 µg/mL), chloramphenicol- (30 µg/mL) und kanamycinhaltigen (30 µg/mL) Agarplatten ausplattiert). Im Anschluss erfolgte eine Inkubation der Agarplatten über Nacht bei 37 °C.

2.5.2.3 Kultivierung von *E. coli*

Die eingesetzten Volumina der Kulturen, die Inokulationsverhältnisse (Volumen der Vorkultur (V_{VK}) zu Volumen der Hauptkultur (V_{HK})), der Zeitpunkt Induktion der Proteinexpression mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) ($t_{ind.}$) sowie die Dauer der Expression waren von der folgenden Anwendung abhängig und sind Tabelle 16 zu entnehmen. Für die Vorkulturen wurde allgemein ampicillinhaltiges (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) LB-Medium mit einer Einzelkolonie transformierter *E. coli*-Zellen inokuliert und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Für die Hauptkultur wurde ampicillinhaltiges (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) LB-Medium mit der Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Bei Expressionen in SU101-Zellen wurde dem LB-Medium Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und Chloramphenicol (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zugesetzt. Die Induktion der Proteinexpression mit IPTG erfolgte abhängig von der Anwendung zu verschiedenen Zeitpunkten.

Tabelle 16: Variable Parameter zur Kultivierung von *E. coli*.

Anwendung	V_{VK}/V_{HK}	V_{HK}	$t_{ind.}$	c(IPTG)	Beendet
Überexpression zur GlpF-Reinigung	1:10	2 L	$OD_{600}:1,2-1,3$	0,5 mM	3 h nach IPTG Induktion
GALLEX/ Aktivitäts-Test	1:40	10 mL	Bei Inokulation der Hauptkultur	0 – 1 mM	$OD_{600}: 0,6$
Membranpräparation	1:40	50 mL	Bei Inokulation der Hauptkultur	0 – 1 mM	$OD_{600}: 0,8$
GALLEX mit 2-PEtOH-Inkubation	1:40	10 mL	$OD_{600}: 0,6$	0,5 mM	1 h nach IPTG Induktion

Die Kulturen, welche für die GlpF-Überexpression mit anschließender Reinigung kultiviert wurden, wurden wie angegeben 3 h nach Induktion durch Zentrifugation bei 1.700 g, 10 min und 4 °C pelletiert. Das Zellpellet aus 1 L Expressionskultur wurde in 45 mL Resuspensionspuffer I resuspendiert und bei - 20 °C gelagert.

2.5.3 Biochemische Methoden

2.5.3.1 SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)-Analyse

In der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, engl.: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis*) nach Laemmli wurden unter denaturierenden Bedingungen Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt (165). Es wurden Acrylamidanteile von 10% im Trenngel und 6% im Sammelgel verwendet.

Die Gele (8 cm (L) x 7,3 cm (H) x 0,75 mm (T)) wurden unter Verwendung der Mini-Protean 3 Casting-Kammer (BioRad) nach den Angaben in Tabelle 17 gegossen. Der Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) und der Stabilisator freier Radikale N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurden unmittelbar vor dem Gießen zugegeben, um eine zu schnelle Polymerisation zu verhindern. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit 1:3 (v/v) verdünntem Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel mit dem Trenngel überschichtet und Kämme für 15 Taschen in das Sammelgel gesteckt. Die Proben wurden entweder mit 5x SDS-Probenauftragspuffer oder SDS-freiem 5x Probenpuffer (semi-nativ) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer bei einer Gleichspannung von zunächst 100 V bis zum Erreichen des Trenngels. Dann wurde die Gleichspannung auf 200 V erhöht und die Elektrophorese beendet sobald die Lauffront den unteren Rand des Gels erreichte. Als Größenstandards wurden entweder 5 µL der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* oder der *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* verwendet.

Tabelle 17: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele nach Laemmli.

Substanz	Sammelgel (6 %)	Trenngel (10 %)
40 % Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid (37,5/1)	1,5 mL	2,5 mL
Sammelgel-Puffer (Laemmli)	2,5 mL	
Trenngel-Puffer (Laemmli)		2,5 mL
dH ₂ O	6 mL	5 mL
APS	50 µL	50 µL
TEMED	20 µL	20 µL

2.5.3.2 Coomassie-Färbung

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels Coomassie-Brillant-Blau Färbung im Gel visualisiert. Der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau lagert sich dabei an die basischen Seitenketten im Protein an. Die Gele wurden 30 min mit Coomassie-Färbelösung schüttelnd inkubiert und anschließend der überschüssige Farbstoff mit Entfärbelösung entfernt bis deutliche Proteinbanden zu erkennen waren. Die Nachweisgrenze liegt hier bei 0,1-1 µg Protein pro Bande (166).

2.5.3.3 Western Blot-Analyse und immunochemischer Nachweis

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach dem *Tank-Blot*-Verfahren in einem elektrischen Feld aus der Polyacrylamidgel-Matrix auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen und dort gleichzeitig immobilisiert. Die PVDF-Membran wurde hierfür zunächst zur Aktivierung in Methanol gelegt und anschließend mit dem Filterpapier in *Tank-*

Blot-Puffer getränkt. Die *Tank-Blot*-Apparatur wurde nach Herstellerangaben (BioRad, München) aufgebaut. Der Proteintransfer erfolgte 1 h bei konstanter Spannung (100 V) bei 4 °C. Zur immunochemischen Analyse wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in Block-Puffer inkubiert und anschließend 3 x 5 min mit *Tris buffered saline* und *Tween 20* (TBST)-Puffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4 °C über Nacht. Nach erneutem Waschen (3 x 5 min) mit TBST-Puffer wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nochmals wurde die Membran mit TBST-Puffer gewaschen und die Detektion des Proteins erfolgte mit dem *Pierce ECL Western-Blotting Substrate* gemäß den Herstellerangaben. Die entstandene Chemilumineszenz wurde mit dem Dokumentationssystem STELLA detektiert. Zur quantitativen Auswertung der Western Blot-Analyse wurden die Proteinbandenintensitäten mit dem Programm ImageJ und der darin enthaltenen „Gel-Analyse-Funktion“ bestimmt (167).

2.5.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von reinen Proteinlösungen erfolgte mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz. Hierfür wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt und der molare Extinktionskoeffizient mit dem Computerprogramm Expasy ProtParam berechnet.

Die Proteinkonzentration von Membranpräparationen wurde über einen Bicinchoninsäure (BCA)-Test mittels des *BCA Protein Assay Kit* nach Herstellerangaben bestimmt.

2.5.3.5 Membranpräparation

Zur Präparation von GlpF-haltigen Membranen aus *E. coli* wurden diese wie unter 2.5.2.3 beschrieben kultiviert. Nach Erreichen einer OD_{600} von etwa 0,8 wurden Zellsuspensionen einer OD_{600} von 2,0 in einem Volumen von 15 mL hergestellt. Hierzu wurde das benötigte Volumen der Kultur abgenommen, die Zellen 10 min bei 3.220 g und 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet schließlich in 15 mL Resuspensionspuffer II aufgenommen. Zur Lyse der Bakterienzellen wurden diese 1,5 min unter Kühlung am Ultraschallgerät (13 mm-Makrospitze, *Duty Cycle* 50%, *Output Control* 6) behandelt. Anschließend erfolgte ein 10 min Zentrifugationsschritt bei 12.000 g und 4 °C. Die GlpF-haltigen Membranen wurden schließlich durch einstündige Zentrifugation des Überstands bei 165.000 g und 4 °C pelletiert und in 100 µL Solubilisierungspuffer resuspendiert. Die Gesamtproteinkonzentration der Membranen wurde mit Hilfe eines BCA-Tests bestimmt.

2.5.3.6 Proteinreinigung mittels immobilisierter Metallionen Affinitäts-Chromatographie

Die Isolierung von GlpF erfolgte über eine Reinigung mittels immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) (168). Für die Reinigung wurde GlpF in BL21(DE3)-Zellen von pRSET-His-Plasmiden exprimiert, welche für GlpF mit einem N-terminalen Deka-Histidin-Fusions-Tag kodieren.

Die Volumina im folgenden Protokoll sind auf die Reinigung von GlpF aus 1 L Expressionskultur bezogen.

Zur Reinigung wurde die *E. coli*-Zellsuspension (siehe 2.5.2.3) unter Kühlung in einem Eisbad 4 x 3 min mit jeweils 3 min Pause per Ultraschall behandelt (13 mm-Makrospitze, *Duty Cycle* 50%, *Output Control* 6 (Zyklus 1 und 2) / *Output Control* 8 (Zyklus 3)). Im Anschluss wurde das Lysat bei 12.000 g und 4 °C 30 min zentrifugiert gefolgt von einer einstündigen Zentrifugation des Überstands bei 117.000 g und 4 °C. Die pelletierten Membranen wurden danach in 50 mL Solubilisierungspuffer 1 h bei Raumtemperatur unter Rühren solubilisiert. Es folgte ein weiterer 10 min Zentrifugationsschritt bei 3220 g. Zeitgleich wurde 1 mL Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose-Suspension (50% (v/v)) mit dem 15-fachen Volumen an Solubilisierungspuffer äquilibriert. Die äquilibrierte Ni-NTA-Agarose-Matrix wurde zu dem Überstand des zentrifugierten Membransolubilisats gegeben und nach 1 h Inkubation unter Rühren bei Raumtemperatur die Ni-NTA-Agarose-Matrix in einen 5 mL Säulenkörper überführt. Die in den weiteren Schritten benötigten Waschpuffer sowie der Elutionspuffer wurden abhängig von der folgenden Anwendung entweder mit 50 mM Octyl- β -D-glucopyranosid (OG)- oder 5 mM n-Dodecyl β -D-maltosid (DDM)-Puffer DDM versetzt. Es erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 10 mL der Waschpuffer I und II und abschließend die Elution des Proteins in drei Fraktionen zu je 1 mL. Hier ging der Elution jeweils eine 5 min Inkubation der Ni-NTA-Agarose-Matrix mit dem Elutionspuffer voraus. Abschließend erfolgte ein semi-native SDS-PAGE-Analyse und eine photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration.

2.5.3.7 Präparative Gelpermeationschromatographie

Optional wurde im Anschluss an die Proteinreinigung mittels IMAC eine Gelpermeationschromatographie (GPC) an einem ÄKTApurifier System mit einer Superose 6 Säule (GE Healthcare) durchgeführt. Mit einem Fraktionssammler (Frac920) wurde das Eluat in 200 μ L Aliquots gesammelt. Als Eluent diente DDM-Puffer, das Probenvolumen betrug 500 μ L und die Flussrate wurde auf 0,25 mL/min eingestellt. Die Proteindetektion erfolgte durch Absorptionmessung bei 280 nm.

2.5.3.8 Funktionelle Rekonstitution von GlpF in Proteoliposomen

Die funktionelle Rekonstitution von GlpF in Proteoliposomen erfolgte nach dem Prinzip der Detergenz-Dialyse. Hierfür wurden grundsätzlich 5 mM Phospholipide und ein molares Lipid zu GlpF Verhältnis von 400:1 eingesetzt. Die in Chloroform vorliegenden Phospholipide wurden in 1,5 mL Polypropylen-Reagiergefäße überführt und das Chloroform durch einen leichten Stickstoffstrom entfernt. Verbleibende Lösungsmittelsuren wurden über Nacht in einem Vakuumexsikkator entfernt. Am folgenden Morgen wurde der Lipidfilm in 200 μ L Dialysepuffer (versetzt mit 30 mM OG) (169) bei 37 °C 45 min unter leichtem Schütteln im Thermoblock rehydratisiert. Zeitgleich wurde in OG gereinigtes GlpF 15 min bei 20.230 g und 4 °C zentrifugiert und anschließend mit einer Endkonzentration von 12 μ M zu der OG-Lipid-Mischung gegeben. Das Volumen des Ansatzes wurde auf 500 μ L mit Dialysepuffer eingestellt. Der Dialysepuffer wurde hierfür mit einer entsprechenden OG-Konzentration versetzt, um eine Endkonzentration von 30 mM OG zu erhalten. Der Dialyseansatz wurde dann in Dialysemembranen überführt, welche zuvor kurz in Dialysepuffer inkubiert worden waren (Trenngrenze der Dialysemembran 12-14 kDa). Abschließend wurde der Dialyseansatz mindestens 48 h bei 4 °C unter konstantem Rühren gegen das 100-fache Volumen des Dialyseansatzes dialysiert. Der Dialysepuffer wurde dreimal erneuert.

2.5.3.9 SDS-Titration zur Untersuchung der Proteinestabilität

Durch eine SDS-induzierte Entfaltung von Membranproteinen in gemischten Detergenzmizellen kann die Proteinestabilität untersucht werden (170). Zur sukzessiven Proteinentfaltung wurde in DDM gereinigtes GlpF zunächst über eine PD-10-Säule nach Herstellerangaben in DDM-Puffer umgepuffert und anschließend der SDS-Stoffmengenanteil (X_{SDS}) durch Zugabe einer 500 mM SDS-Stammlösung (und entsprechender Verdünnungen) von 0 auf 0,95 erhöht. Die Proteinkonzentration betrug 8,1 μ M. Zur Dokumentation der Proteinentfaltung wurde nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur eine semi-native SDS-PAGE-Analyse durchgeführt.

2.5.3.10 GALLEX

Das GALLEX-System ermöglicht die Untersuchung der Oligomerisierung einzelner Transmembranhelices und auch vollständiger Membranproteine *in vivo* (125, 158). Grundlage des GALLEX-Systems ist die transkriptionelle Repression des für die β -Galaktosidase kodierenden *lacZ*-Gens durch den durch Oligomerisierung aktivierten Transkriptionsfaktor LexA (171). Für die Messungen der Homooligomerisierung wurden der *E. coli*-Stamm SU101 und pLexA-Plasmide verwendet, welche für Fusionsproteine mit einer N-terminalen LexA-DNA-Bindungsdomäne kodieren. In den *E. coli* SU101-Zellen steht das *lacZ*-Gen unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors LexA (155). Bei Oligomerisierung des Fusionsproteins

können auch die aminoterminalen LexA-Domänen interagieren und an die Operator-Region des *lacZ*-Gens binden, wodurch die Expression der β -Galaktosidase unterdrückt wird. Durch Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (β -Gal.-Akt.) kann die Stärke der Interaktion der Fusionsproteine ermittelt werden. Dabei weist eine hohe β -Gal.-Akt. auf eine niedrige Oligomerisierungstendenz hin.

Die Kultivierung der mit den pLexA transformierten *E. coli* SU101-Zellen erfolgte wie unter 2.5.2.3 beschrieben. Für alle Konstrukte und jede IPTG-Konzentration wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Hierfür wurden von jedem Transformationsansatz drei Kolonien ausgewählt

Nachdem etwa eine OD_{600} von 0,6 erreicht war, wurden 100 μ L der Bakteriensuspension zu 900 μ L 1x Z-Puffer gegeben. Durch Zugabe von 10 μ L einer 0,1% SDS-Lösung und 12 μ L Chloroform wurden die Zellen lysiert. Zum Nachweis der vorhandenen β -Gal.-Akt. wurde zu den Reaktionsansätzen 200 μ L o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG)-Lösung gegeben. Nach ausreichendem ONPG-Umsatz wurde die Hydrolyse durch Zugabe von 500 μ L einer 1 M-Natriumcarbonat-Lösung gestoppt. Es folgte eine 1 min Zentrifugation der Proben bei 20.230 g und anschließend die Messung der Absorption bei 420 nm und 550 nm. Die β -Gal.-Akt. in Miller-Einheiten (MU, engl.: *Miller units*) wurde nach Gleichung 1 bestimmt (172).

$$\beta\text{-Gal.-Akt. / MU} = [1000 \cdot OD_{420} - (1,75 \cdot OD_{550})] / [t \text{ (min)} \cdot 0,1 \text{ mL} \cdot OD_{600}] \quad [1]$$

2.5.4 Biophysikalische Methoden

2.5.4.1 Aktivitäts-Test für GlpF

Die Aktivität von GlpF in Proteoliposomen oder *E. coli*-Zellen wurde durch Messung der Kinetik des Ribitolflusses an einem *Stopped-Flow*-UV/Vis-Spektrometer bestimmt (Abbildung 11).

Grundlage der *Stopped-Flow*-Technik ist das sehr schnelle und effiziente Mischen zweier Reaktionskomponenten und die sofortige spektroskopische Detektion des Reaktionsverlaufs. Über einen pneumatisch angetriebenen Stempel werden die Reaktionskomponenten aus den Spritzen A und B zeitgleich durch einen T-Mischer in eine Durchflussküvette geleitet. Aus dieser tritt die Lösung dann in die Stopp-Spritze und löst damit den Kontakt mit der *Trigger*-Schaltung aus, was den Fluss stoppt und die Detektion der Reaktion initiiert. Die Totzeit der hier verwendeten Apparatur liegt bei 1,0 ms.

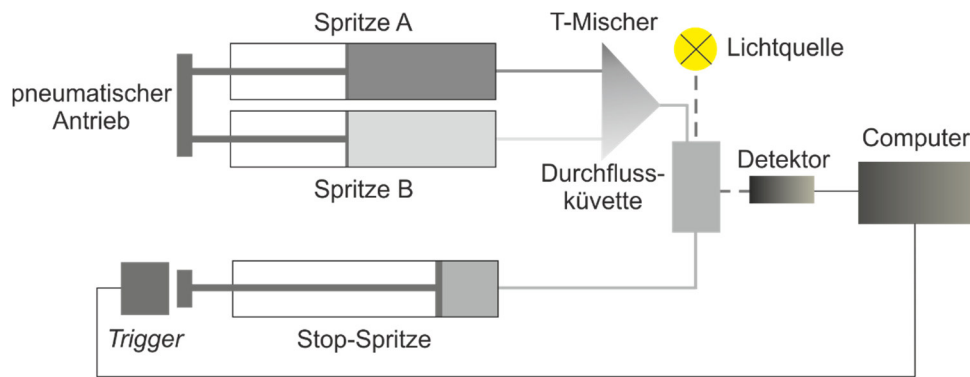


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines *Stopped-Flow*-UV/Vis-Spektrometers.

Der schematische Aufbau der *Stopped-Flow*-Apparatur zeigt die Proben- und Detektionseinheit sowie die Lichtquelle. Die Probeneinheit gewährleistet das schnelle und effektive Mischen der Reaktionskomponenten aus den Spritzen A und B durch einen T-Mischer und den Fluss in die Durchflusszelle. Über die Stopp-Spritze der Probeneinheit wird der Probenfluss gestoppt und zeitgleich der Start der Detektion über eine *Trigger*-Schaltung initiiert. Die Detektionseinheit besteht aus einem Photomultiplier, der im 90° Winkel zum einfallenden Licht positioniert ist. Als Lichtquelle dient eine Xenon-Gasentladungslampe. Nicht gezeigt in diesem Aufbau ist der Monochromator, welcher zwischen der Lichtquelle und der Durchflussküvette positioniert ist, sowie die Temperaturreglereinheit, welche die Spritzen A und B, den T-Mischer sowie die Durchflussküvette umfasst.

Proteoliposomen wurden für die Kinetik-Messungen wie unter 2.5.3.8 beschrieben hergestellt und vor der Messung 1:2 mit Dialysepuffer verdünnt. *E. coli* SK46-Zellen wurden für funktionale Messungen mit pMal-p2x Plasmiden transformiert, anschließend wie unter 2.5.2.3 kultiviert und schließlich eine OD₆₀₀ von 1,0 in einem Volumen von 3 mL ampicillin- (100 µg/mL) und chloramphenicolhaltigen (30 µg/mL) LB-Medium eingestellt. Die Proteoliposomen bzw. die Bakteriensuspension wurden dann mit einer hypertonischen Ribitollösung, welche in Dialysepuffer bzw. ampicillin- und chloramphenicolhaltigen LB Medium angesetzt war, in der *Stopped-Flow*-Apparatur gemischt. Der Ribitoffluss über die Lipidmembran wurde indirekt durch Messung der Lichtstreuung bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Winkel von 90° zum einfallenden Licht bei Raumtemperatur über ein Zeitintervall von 10 s detektiert. Durch den osmotisch bedingten Wasserausstrom, und dem damit einhergehenden reduzierten Zell- bzw. Proteoliposomvolumen, nahm die Streulichtintensität dabei zunächst sehr schnell zu. Aufgrund des GlpF spezifischen Ribitofflusses, der wiederum durch das veränderte osmotische Gleichgewicht zu einem Wasserrückfluss führte, vergrößerte sich das Zell- bzw. Proteoliposomvolumen wieder. Diese Volumenzunahme führte wiederum zu einer Abnahme der Streulichtintensität. Die Abnahme der Streulichtintensität wurde dann mit einer ein- (Messung in ganzen Zellen) oder zweifach exponentiellen Zerfallsfunktion (Messung von Proteoliposomen) approximiert (Gleichung 2).

$$f(x) = A_1 \cdot e^{-k_1 \cdot x} + A_2 \cdot e^{-k_2 \cdot x} + y_0 \quad [2]$$

(A₁ und A₂: Amplituden, k₁ und k₂: Geschwindigkeitskonstanten, y₀: Plateau)

Im Falle einer zweifach exponentiellen Approximation wurde abschließend eine gewichtete Geschwindigkeitskonstante (k_w) bestimmt (Gleichung 3) (173).

$$k_w = A_1/(A_1+A_2) \cdot k_1 + A_2/(A_1+A_2) \cdot k_2 \quad [3]$$

Auswertung der Messungen mit E. coli SK46-Zellen

Um Unterschiede im Expressionsniveau der analysierten GlpF-Konstrukte zu berücksichtigen, wurden Membranen aus *E. coli* SK46-Zellen präpariert (2.5.3.5) und mittels einer Western Blot-Analyse die GlpF-Konzentration bestimmt.

Auswertung der Messungen in Proteoliposomen

Im Anschluss an die funktionalen Messungen wurde eine semi-native SDS-PAGE-Analyse durchgeführt und die GlpF-Banden mittels des Computerprogramms ImageJ quantifiziert. Zur Ermittlung der relativen GlpF-Konzentration ($c_{\text{GlpF,rel.}}$), wurde die Menge an inkorporierten GlpF auf die Menge an inkorporierten GlpF nach Rekonstitution in diC18:1-PC Liposomen bezogen. Die gewichteten Geschwindigkeitskonstanten wurden dann auf $c_{\text{rel.}}$ bezogen, um die relative, gewichtete Geschwindigkeitskonstante $k_{w,rel.}$ zu erhalten. Abschließend wurde $k_{w,rel.}$ wiederum für die Vergleichbarkeit der Messungen auf $k_{w,rel.}$ von GlpF in den diC18:1-PC Liposomen des jeweiligen Messtages normiert. Auf diese Weise wurde die normierte, gewichtete Geschwindigkeitskonstante $k_{w,norm.}$ erhalten.

2.5.4.2 Laurdan Fluoreszenzspektroskopie

6-Dodecanoyl-N,N-dimethyl-2-naphtylamin (Laurdan) ist ein Derivat des ursprünglich von Weber synthetisierten Fluoreszenzfarbstoffs 6-Propionyl-2-Dimethylaminonaphtalin (Prodan) (174) und wird zur Detektion von Phasenzuständen in Lipidmembranen verwendet (siehe Abbildung 12) (175). Aufgrund des hydrophoben Laurinsäure-Rests ist Laurdan nicht wasserlöslich und inseriert in Lipidmembranen wobei der Naphthalin-Rest auf Höhe des Glycerol-Rückgrats lokalisiert ist (175). Die partielle Ladungstrennung zwischen der 2-Dimethylamin- und der 6-Carbonylgruppe führt zur Entstehung eines Dipolmoments.

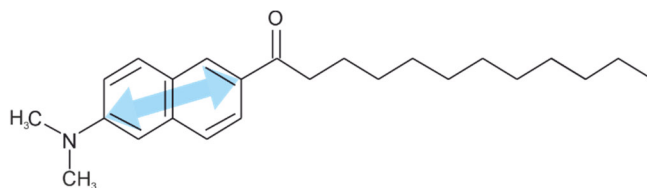


Abbildung 12: Laurdan-Fluoreszenzspektroskopie.

Strukturformel von Laurdan. Der blaue Pfeil deutet das durch partielle Ladungstrennung zwischen der 2-Dimethylamin- und der 6-Carbonylgruppe entstehende Dipolmoment an.

Phospholipide, gelöst in Chloroform, und Laurdan (174), gelöst in Ethanol, wurden in einem molaren Verhältnis von 500:1 und einer Lipid-Endkonzentration von 1 mM gemischt und das Lösungsmittel durch einem leichten Stickstoffstrom entfernt. Verbleibende Lösungsmittelsuren wurden über Nacht in einem Vakuumexsikkator entfernt. Der Lipidfilm wurde in N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)-Puffer bei 37 °C 45 min unter leichtem Schütteln im Thermoblock re-hydratisiert. Durch sechs Gefrier- und Auftau-Zyklen wurden große unilamellare Vesikel (LUVs) erzeugt. Für Messungen mit steigenden Konzentrationen an 2-PEtOH (0-16 mM) wurden die Liposomen 1 h bei Raumtemperatur mit 2-PEtOH inkubiert. Anschließend wurde das Laurdan Fluoreszenzspektrum nach Anregung bei 340 nm (Spaltbreite 4 nm) zwischen 400 und 500 nm (Spaltbreite 4 nm) bei 25 °C aufgenommen und die *Generalized Polarization* (GP) nach Gleichung 4 berechnet (175).

$$GP = (I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490}) \quad [4]$$

(I_{440} und I_{490} : Fluoreszenzintensität bei den Wellenlängen 440 und 490 nm)

2.5.4.3 Dynamische Lichtstreuung zur Größenbestimmung der Proteoliposomen

Mittels der dynamischen Lichtstreuung (DLS, engl.: *dynamic light scattering*) kann die Partikelgröße von Makromolekülen und Nanopartikeln in Lösung bestimmt werden (176). In einer DLS-Messung wird in einem festen Winkel ein Laserstrahl auf die Probe fokussiert und die Streulichtintensität in kurzen Zeitabständen erfasst. Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung der streuenden Moleküle fluktuiert die Streulichtintensität. Diese Fluktuationen sind abhängig vom Diffusionskoeffizienten (D) der Moleküle, der wiederum proportional zum hydrodynamischen Radius (R_H) dieser ist. Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten werden die Streulichtintensitäten zu den verschiedenen Zeitpunkten in einer Autokorrelationsanalyse verglichen und eine Korrelationsfunktion ($C(\tau)$) erstellt. Durch Approximation der Korrelationsfunktion mit einer exponentiellen Gleichung kann der Diffusionskoeffizient der Moleküle, basierend auf der in Gleichung 5 gezeigten Proportionalität, berechnet werden.

$$C(\tau) \sim \exp(-Dq^2\tau) \quad [5]$$

(τ : Zeitkonstante, D : Diffusionskoeffizient, und $q = 4\pi n/\lambda \cdot \sin(\theta/2)$ mit n : Brechungsindex des Mediums, λ : Wellenlänge des Laserstrahls und θ : Einfallswinkel des Laserstrahls)

Mittels des Diffusionskoeffizienten ergibt sich aus der Stokes-Einstein-Gleichung der hydrodynamische Radius der Moleküle (Gleichung 6).

$$D = (k_B T) / (6\pi\eta R_H) \quad [6]$$

(k : Boltzmann-Konstante, T : Temperatur, η : Viskosität des Lösungsmittels, R_H : hydrodynamischer Radius)

Unmittelbar aus der Korrelationsfunktion können das Intensitätsmittel (Z-Mittel) und der Polydispersitätsindex (PDI) der Probe abgeleitet werden. Da das Z-Mittel jedoch sehr anfällig für in der Probe vorhandene Aggregate ist und dieses damit nur für monodisperse Proben aussagekräftig ist, kann aus dem Intensitätsmittel das Zahlenmittel berechnet werden. Hierfür wird unter anderem der Brechungsindex n der Moleküle benötigt.

Die Größenverteilung der Proteoliposomen, die wie in Abschnitt 2.5.3.8 beschrieben hergestellt wurden, wurde an einem Zetasizer-Nano-S der Firma Malvern Instruments bei 20 °C bestimmt. Für den Brechungsindex des Mediums wurde ein Wert von 1,330 angenommen und für den Brechungsindex der Liposomen von 1,590. Für die Viskosität des Lösungsmittels wurde ein Wert von 1,0031 verwendet. Jede Probe wurde bei einem Einfallswinkel des Laserstrahls von 173° nach 2 min Temperierung zehnmal über ein Zeitintervall von 10 s gemessen. Die Berechnung des Z-Mittels, des Polydispersitätsindex und des Zahlenmittels erfolgte mit der integrierten Gerätesoftware.

2.5.4.4 Summenfrequenzerzeugungsspektroskopie

Die Summenfrequenzerzeugungsspektroskopie (SFG, engl.: *sum frequency generation*) wurde in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz durchgeführt. Mit Hilfe der Summenfrequenzerzeugungsspektroskopie (SFG, engl.: *sum frequency generation*) können monomolekulare Lipidfilme (Lipidmonolagen) an der Wasser-Luft-Grenzfläche analysiert werden (177). An Grenzflächen kommt es zu einem Bruch der Inversionssymmetrie, der neben intensiven Laserpulsen, Voraussetzung für die Erzeugung des SFG-Signals ist (178). Werden zwei Laserstrahlen, ein frequenzfester aus dem sichtbaren (ω_{VIS}) und ein variierbarer aus dem infraroten (ω_{IR}) Spektralbereich, auf dem Lipidfilm an der Wasser-Luft-Grenzfläche überlagert, entsteht der SFG-Strahl ($\omega_{\text{SFG}} = \omega_{\text{VIS}} + \omega_{\text{IR}}$) (siehe Abbildung 13). Die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung des SFG-Signals ist dann erhöht, wenn die Frequenz des IR-Laserstrahls in Resonanz mit Molekülschwingungen an der Grenzfläche steht. Da in der Gel-Phase die Acylketten der Lipide hochgeordnet in der *all-trans*-Konformation vorliegen, sind die CH₂-Gruppen wegen der hohen Symmetrie der SFG-Spektroskopie nicht zugänglich. In der flüssig-kristallinen Phase dagegen ist die Symmetrie aufgrund von *gauche*-Defekten aufgehoben und die CH₂-Molekülschwingung kann SFG-spektroskopisch erfasst werden. SFG-Spektren einer Lipidmonolage in der Gel-Phase sind daher von der Molekülschwingung der CH₃-Gruppe dominiert, die Spektren der Lipide in der flüssig-kristallinen Phase dagegen von der Molekülschwingung der CH₂-Gruppe (179, 180). Demzufolge ist es möglich, über das Verhältnis der Intensität der symmetrischen Molekülschwingungen der CH₃- und CH₂-Gruppen ($\text{CH}_{3\text{-ss}}/\text{CH}_{2\text{-ss}}$) Informationen über den Ordnungsgrad der Acylketten in der Monolage zu erhalten (181).

Um den Einfluss von 2-PEtOH auf eine EPL-Monolage zu untersuchen, wurde ein Langmuir-Trog verwendet, der zur Regulation des Oberflächendrucks mit einem Tensiometer und einer beweglichen Barriere versehen war (Abbildung 13). Auf der Oberfläche von PBS-Puffer (in D_2O) wurde zunächst ein Lipidfilm erzeugt, ein konstanter Oberflächendruck von 20 mN/m eingestellt und ein SFG-Spektrum aufgezeichnet. Danach wurde deuteriertes 2-PEtOH in PBS-Puffer (in D_2O) gelöst und in das Puffersystem unter der EPL-Monolage injiziert (Endkonzentration 16 mM). Mittels der beweglichen Barriere wurde nach Insertion von 2-PEtOH in die EPL-Monolage der Oberflächendruck wieder auf 20 mN/m justiert und erneut ein SFG-Spektrum aufgenommen.

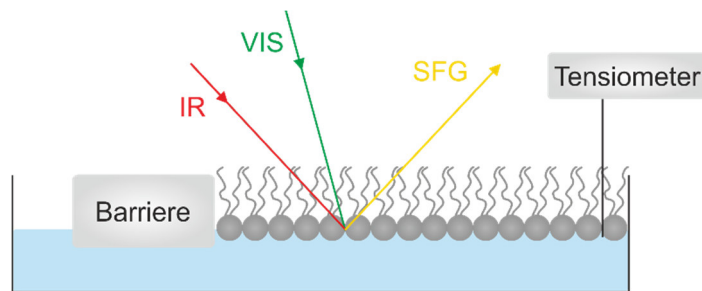


Abbildung 13: SFG-Spektroskopie.

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die SFG-Messungen. Zur Regulation des Oberflächendrucks ist der Langmuir-Trog sowohl mit einem Tensiometer als auch einer beweglichen Barriere versehen.

2.5.4.5 Brewster-Winkel-Mikroskopie

Die Brewster-Winkel-Mikroskopie wurde in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz durchgeführt.

In der Brewster-Winkel-Mikroskopie (BAM, engl.: *Brewster angle microscopy*) wird ein p-polarisierter Laserstrahl im Brewster-Winkel auf die Wasser-Luft-Grenzfläche fokussiert (182, 183). Der Brewster-Winkel ist abhängig von den Brechungsindizes der Materialien an der Grenzfläche und ist dadurch charakterisiert, dass kein Licht an der Grenzfläche reflektiert wird. Befindet sich der Lipidfilm auf der Wasseroberfläche verändert sich der Brechungsindex und Licht wird reflektiert. Mittels eines Mikroskops wird das reflektierte Licht detektiert und so entstehen Bilder mit Bereichen unterschiedlicher Helligkeit, die von den Lipidmolekülen und der Packungsdichte abhängen. Mittels BAM können daher Informationen über die laterale Morphologie in Lipidmonolagen generiert werden, da sich verschiedene Lipidomänen durch unterschiedliche Kopfgruppendichten und Unterschiede in der strukturellen Zusammenlagerung der Lipide auszeichnen. Wie bereits für die SFG-spektroskopischen Messungen, wurde eine EPL-Monolage erzeugt, ein Oberflächendruck von 20 mN/m eingestellt und BAM-Aufnahmen erstellt.



3 Ergebnisse

3.1 Funktion und Oligomerisierung fusionierter GlpF-Monomere

Aquaporine liegen in biologischen Membranen als Homotetramere vor, obwohl das Monomer allein bereits die funktionale Einheit definiert (116-118). Die Gründe für die Oligomerisierung der Aquaporine sind aktuell noch nicht hinreichend verstanden. Es wird jedoch angenommen, dass die Oligomerisierung entscheidend für die Proteinstabilität und -funktion ist (125). Um die Zusammenhänge zwischen der Oligomerisierung und Funktion von GlpF und der Funktionsmutante GlpF-E43A (125) zu untersuchen, wurden fusionierte GlpF-Homooligomere durch sukzessive Verknüpfung der N- und C-Termini von GlpF erstellt (Abbildung 14A). Das größte Fusionsprotein bildete ein GlpF-Tetramer bestehend aus vier fusionierten GlpF-Monomeren. Der Unterschied des hier verwendeten GlpF-Monomers 1xGlpF und dem GlpF-Wildtyp besteht in der N-terminalen Verlängerung von GlpF um sechs Aminosäuren. Darüber hinaus wurden fusionierte GlpF-Tetramere mit einem steigenden Anteil an Monomeren mit der Mutation E43A erstellt (Abbildung 15A).

3.1.1 Die Aktivität von GlpF nimmt mit dem Grad der Fusion zu

Zur Analyse der Funktion der verschiedenen GlpF-Homooligomere, wurde die Kinetik des Ribitolflusses über die innere *E. coli*-Membran an einem *Stopped-Flow*-UV/Vis-Spektrometer bestimmt. Für diese Messungen wurden die GlpF-Homooligomere in *E. coli* SK46-Zellen, welche sich durch die Deletion der endogenen Aquaporine AqpZ und GlpF auszeichnen (154), bei steigenden IPTG-Konzentrationen exprimiert. In Abbildung 14B sind exemplarische Streulichtkurven der verschiedenen GlpF-Homooligomere gezeigt. Diese sind durch den charakteristischen schnellen Anstieg der Streulichtintensität und der unmittelbar darauf folgenden Abnahme dieser, aufgrund des GlpF-spezifischen Ribitolflusses, gekennzeichnet. Der Verlauf der Streulichtkurven zeigt bereits Unterschiede in der Kinetik des Ribitolflusses auf, da sowohl der schnelle Anstieg als auch der charakteristische Abfall unterschiedlich steil für die verschiedenen GlpF-Homooligomere verlaufen.

Um im quantitativen Vergleich der ermittelten Aktivitäten der GlpF-Homooligomere eventuelle Unterschiede des Expressionsniveaus dieser zu berücksichtigen, wurden GlpF-haltige Membranen isoliert und in einer Western Blot-Analyse die GlpF-Homooligomere mit einem GlpF-spezifischen Antikörper immunochemisch detektiert. So zeigte sich, dass durch Induktion der Proteinexpression mit IPTG-Konzentrationen zwischen 0 und 500 μM die Proteinkonzentration kontinuierlich erhöht werden konnte (Abbildung 14D). Außerdem wurde ersichtlich, dass in den Membranen keine signifikanten Mengen an Degradationsprodukten, aufgrund proteolytischer Spaltung, vorhanden waren (Abbildung A 1).

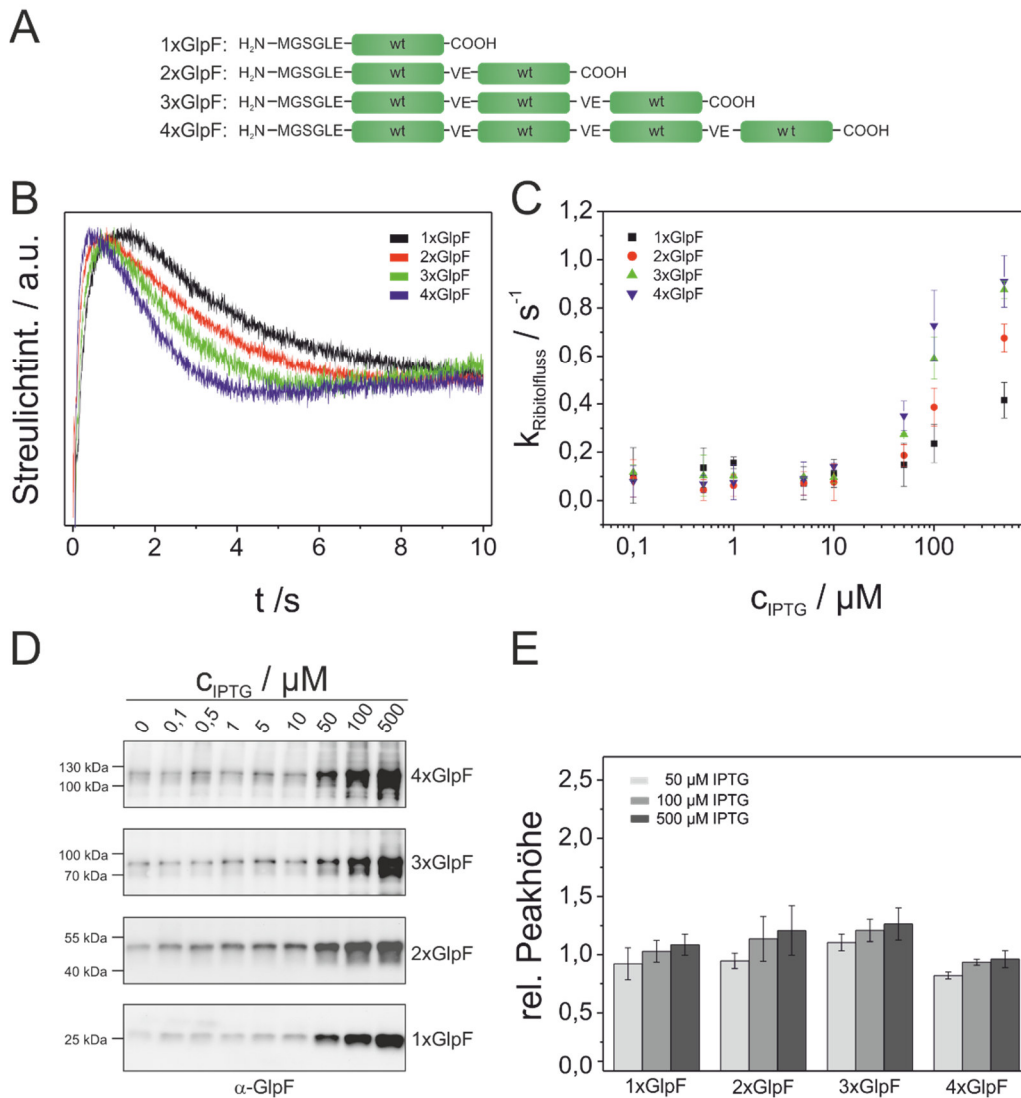


Abbildung 14: Aktivität der fusionierten GlpF-Homooligomere.

(A) Schematische Darstellung der fusionierten GlpF-Homooligomere. Die grünen Kästchen stehen für die Aminosäuresequenz des GlpF-Wildtyps. Die zur Fusion inserierten Restriktionsschnittstellen führen zur Insertion von je zwei Aminosäuren zwischen den GlpF-Monomeren und von 6 Aminosäuren am Fusionsprotein N-Terminus. (B) Die Funktion der GlpF-Fusionsproteine wurde *in vivo* durch Messung des Ribitofflusses über die innere *E. coli*-Membran an einem *Stopped-Flow*-UV/Vis-Spektrometer untersucht. Exemplarische Streulichtkurven der GlpF-Homooligomere nach Induktion der Proteinexpression mit 500 μM IPTG (1xGlpF (schwarz), 2xGlpF (rot), 3xGlpF (grün), 4xGlpF (blau)) sind gezeigt. Die Kurven sind aus fünf Messungen gemittelt. (C) Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten, wurde die Abnahme der Streulichtintensität mit einer einfach exponentiellen Zerfallsfunktion approximiert. Die Geschwindigkeitskonstanten der GlpF-Homooligomere 1xGlpF (schwarz), 2xGlpF (rot), 3xGlpF (grün) und 4xGlpF (blau) sind gegen die IPTG-Konzentration, welche mit der Proteinkonzentration korreliert, aufgetragen ($n = 3 \pm \text{SD}$). (D) Western Blot-Analyse zur Bestimmung des Expressionsniveaus der GlpF-Homooligomere. Von links nach rechts sind isolierte Membranen nach Induktion mit steigenden IPTG-Konzentrationen gezeigt. Es wurden jeweils 2,4 μg Gesamtprotein aufgetragen. (E) Die Peakhöhen wurden zum quantitativen Vergleich des Expressionsniveaus bestimmt und auf die Peakhöhe der Kontrolle (1xGlpF-haltige Membranen nach Induktion der Proteinexpression mit 500 μM IPTG) bezogen ($n = 2-3 \pm \text{SD}$). Gezeigt sind die relativen Peakhöhen nach Induktion der Proteinexpression mit 50 (hell grau), 100 (mittel grau) und 500 μM IPTG (dunkel grau).

Mittels des Programms ImageJ wurden die Proteinbanden aus den Western Blot-Analysen grafisch erfasst. Die erhaltenen Graphen stellen eine Auftragung der Pixelintensität gegen die

elektrophoretische Laufweite der jeweiligen Proteinbande dar. In einem solchen Profil sind die Proteinbanden als Peaks zu erkennen. Da insbesondere bei den höheren oligomeren Formen im Western Blot nur diffuse Proteinbanden zu erkennen waren, konnten die Proteinbandenintensitäten nicht durch Integration der Peakfläche bestimmt werden. Daher wurden die Peakhöhen als Parameter für die Proteinbandenintensitäten bestimmt. Zum Vergleich der Proteinbandenintensitäten wurde als Kontrolle in allen Western Blot-Analysen 1xGlpF-haltige Membranen nach Induktion der Proteinexpression mit 500 μM IPTG verwendet (Abbildung A 1). Auf diese Weise wurde ein vergleichbares Expressionsniveau für die verschiedenen GlpF-Homooligomere deutlich (Abbildung 14E) und die Ribitoleitfähigkeiten konnten direkt verglichen werden (Abbildung 14C).

So zeigte sich bei erhöhter Expression der verschiedenen GlpF-Fusionsproteine (jeweils ab 50 μM IPTG) eine Abhängigkeit der Proteinaktivität von der Anzahl der fusionierten GlpF-Monomere (Abbildung 14B/C). Nach Induktion der Proteinexpression mit 500 μM IPTG betrug die Ribitoleitfähigkeit des GlpF-Trimers 3xGlpF etwa 95% bezogen auf die Aktivität des GlpF-Tetramers 4xGlpF. Damit waren die Ribitoleitfähigkeit des GlpF-Trimers und des Tetramers etwa identisch. Für das fusionierte Dimer 2xGlpF und das GlpF-Monomer wurden Ribitolflussraten von etwa 75% bzw. 40% im Vergleich zum fusionierten GlpF-Tetramer festgestellt.

3.1.2 Die Tetramer-Aktivität korreliert mit dem Anteil an Wildtyp-Monomeren

Um Rückschlüsse auf mögliche kooperative Effekte der einzelnen GlpF-Monomere im fusionierten GlpF-Tetramer zu erhalten, wurden fusionierte GlpF-Tetramere mit steigenden Anteilen an E43A-mutierten Monomeren erzeugt. Die GlpF-Mutante E43A zeichnet sich sowohl durch eine verringerte Interaktionstendenz als auch eine reduzierte Aktivität aus (125). Die im Folgenden verwendete Bezeichnung der GlpF-Tetramere gibt die Anzahl der verknüpften wildtypischen und mutierten Monomere wieder. Im Fusionsprotein sind die mutierten GlpF-Monomere C-terminal lokalisiert, d.h. die Anzahl an mutierten GlpF-Monomeren nimmt sukzessiv vom C- zum N-Terminus des Fusionsproteins zu (Abbildung 15A). Wie bereits beschrieben, wurde die Funktion der mutierten GlpF-Tetramere durch Messung der Kinetik des Ribitolfusses bestimmt. In Abbildung 15B sind exemplarische Streulichtkurven der GlpF-Tetramere mit steigenden Anteilen mutierter Monomeren gezeigt und in Abbildung 15C die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten des Ribitolfusses. Zusätzlich sind in Abbildung 15C die Geschwindigkeitskonstanten des GlpF-Monomers sowie des fusionierten GlpF-Tetramers dargestellt.

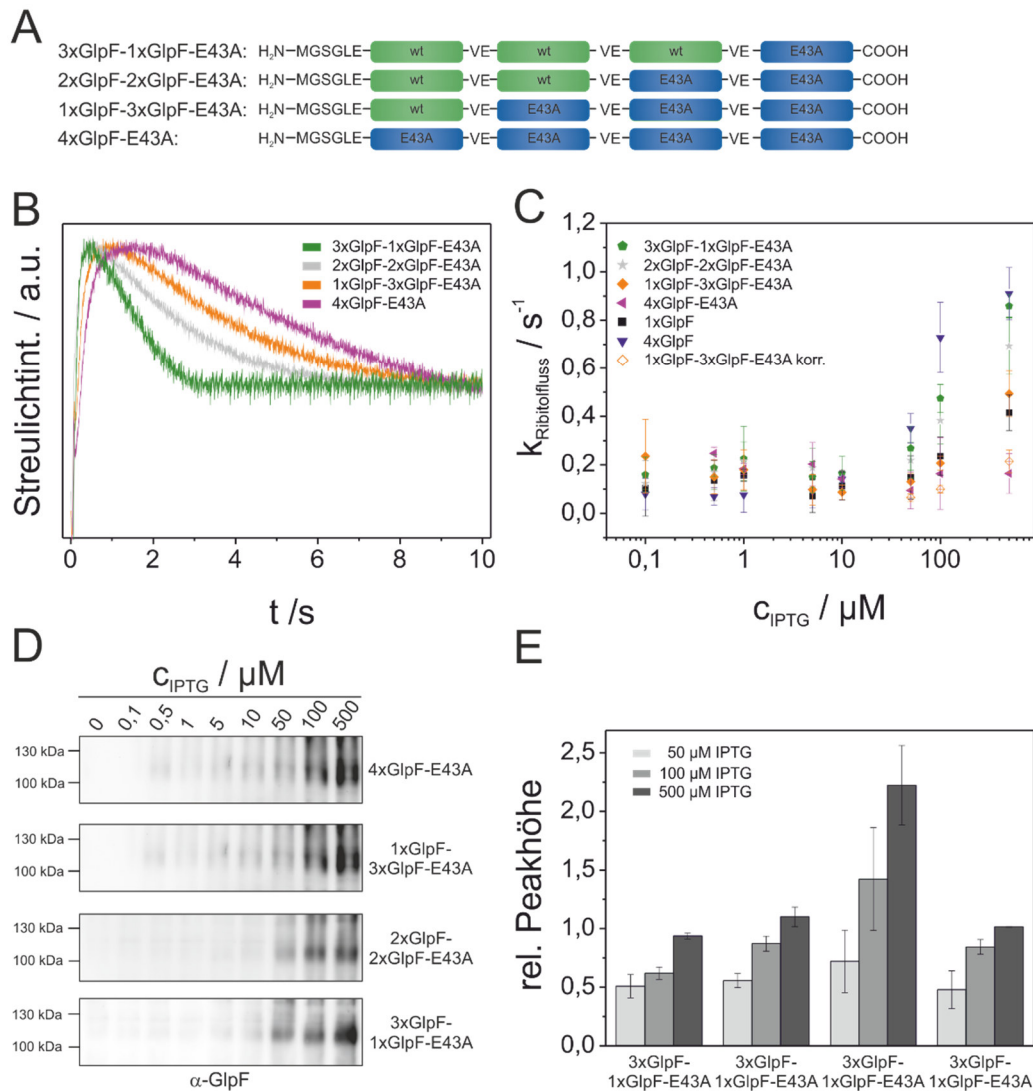


Abbildung 15: Aktivität der fusionierten GlpF-Tetramere mit steigenden Anteilen an mutierten Monomeren.

(A) Schematische Darstellung der fusionierten GlpF-Tetramere. Die grünen bzw. blauen Kästchen stehen für die Aminosäuresequenz des GlpF-Wildtyps bzw. der GlpF-Mutante E43A. (B) Zur Bestimmung der Aktivität der GlpF-Heterotetramere wurde die Kinetik des Ribitolflusses an einem *Stopped-Flow*-UV/Vis-Spektrometer analysiert. Exemplarische Streulichtkurven der GlpF-Heterotetramere nach Induktion der Proteinexpression mit 500 μM IPTG (3xGlpF-1xGlpF-E43A (grün), 2xGlpF-2xGlpF-E43A (grau), 1xGlpF-3xGlpF-E43A (orange) 4xGlpF-E43A (rosa)). Die Kurven sind aus fünf Messungen gemittelt. (C) Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der Fusionsproteine 3xGlpF-1xGlpF-E43A (grün), 2xGlpF-2xGlpF-E43A (grau), 1xGlpF-3xGlpF-E43A (orange) 4xGlpF-E43A (rosa), 1xGlpF (schwarz), 4xGlpF (blau) und 1xGlpF-3xGlpF-E43A korr. (orange, ohne Füllung) gegen die IPTG-Konzentration, welche mit der Proteinkonzentration korreliert ($n = 3 \pm \text{SD}$). (D) Western Blot-Analyse zur Bestimmung des Expressionsniveaus der GlpF-Heterotetramere. Von links nach rechts sind isolierte Membranen nach Induktion der Proteinexpression mit steigenden IPTG-Konzentrationen gezeigt. Es wurden jeweils 2,4 μg Gesamtprotein aufgetragen. (E) Zum quantitativen Vergleich des Expressionsniveaus wurden die Peakhöhen bestimmt und auf die Peakhöhe der Kontrolle (1xGlpF-haltige Membranen nach Induktion mit 500 μM IPTG) bezogen ($n = 2-3 \pm \text{SD}$). Gezeigt sind die relativen Peakhöhen nach Induktion der Proteinexpression mit 50 (hell grau), 100 (mittel grau) und 500 μM IPTG (dunkel grau).

Auch das Expressionsniveau der verschiedenen GlpF-Tetramere wurde mittels einer Western Blot-Analyse untersucht. So konnte die Proteinexpression der GlpF-Tetramere ebenfalls bis

zu einer IPTG-Konzentration von 500 μM gesteigert werden (Abbildung 15D). Des Weiteren wurden auch hier keine signifikanten Mengen an Degradationsprodukten detektiert (vgl. Abbildung A 2). Die quantitative Auswertung der Western Blot-Analyse, die ebenfalls durch Bestimmung der Peakhöhen erfolgte (siehe Abschnitt 3.1.1), zeigte, dass das Expressionsniveau der GlpF-Tetramere 3xGlpF-1xGlpF-E43A, 2xGlpF-2xGlpF-E43A und 4xGlpF-E43A etwa vergleichbar ist. Das Expressionsniveau des Fusionsproteins 1xGlpF-3xGlpF-E43A war dagegen nach Induktion der Proteinexpression mit 100 und 500 μM IPTG etwa um den Faktor 2 erhöht (Abbildung 15E). Die betreffenden Geschwindigkeitskonstanten von 1xGlpF-3xGlpF-E43A wurden daher zur Korrektur mit dem Faktor 2 dividiert (Abbildung 15C). Aufgrund der hohen Standardabweichungen ist allerdings nicht auszuschließen, dass die Messwerte überkorrigiert wurden. Unter Berücksichtigung des Expressionsniveaus zeigte sich eine signifikant reduzierte Aktivität der GlpF-Tetramere 4xGlpF-E43A und 1xGlpF-3xGlpF-E43A. Für diese wurden auch bei Induktion der Proteinexpression mit hohen IPTG-Konzentrationen (100 und 500 μM) keine Ribitolflussraten festgestellt, die höher waren als der basale Ribitolfluss (Abbildung 15C). Unter den GlpF-Heterotetrameren war die Ribitoleitfähigkeit von 3xGlpF-1xGlpF-E43A am höchsten. Dieses Heterotetramer erreichte fast die Kinetik des fusionierten GlpF-Tetramers bestehend aus vier wildtypischen Monomeren. Im Vergleich zum fusionierten GlpF-Tetramer war der durch die Heterotetramere 3xGlpF-1xGlpF-E43A und 2xGlpF-2xGlpF-E43A vermittelte Ribitolfluss um etwa 5 bzw. 25% reduziert. Die Prozentangaben sind auf die Geschwindigkeitskonstanten bezogen, die nach Induktion mit 500 μM IPTG bestimmt wurden. Nur bei dieser IPTG-Konzentration war das Expressionsniveau der fusionierten GlpF-Tetramere und GlpF-Homooligomere vergleichbar (Abbildung 14E und Abbildung 15E).

In Abbildung 16 ist die Abhängigkeit des Ribitolflusses vom Anteil mutierter Monomere im tetrameren Fusionsprotein dargestellt. Da die Standardabweichung des Expressionsniveaus des fusionierten Tetramers 1xGlpF-3xGlpF-E43A nach Induktion der Proteinexpression mit 500 μM IPTG \pm 33% betrug, wurde sowohl die nicht korrigierte als auch die um das erhöhte Expressionsniveau korrigierte, relative Geschwindigkeitskonstante gezeigt. Aufgrund der hohen Standardabweichung kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Ribitoleitfähigkeit des Tetramers 1xGlpF-3xGlpF-E43A unterbewertet wird und die realen Ribitoleitfähigkeiten zwischen dem korrigierten und nicht korrigierten Wert liegen. Daher wurden die Daten in Abbildung 16 einerseits unter Berücksichtigung der korrigierten, relativen Geschwindigkeitskonstante approximiert (rote Kurve) und andererseits unter Berücksichtigung der nicht korrigierten sowie der korrigierten, relativen Geschwindigkeitskonstante (grüne Kurve) approximiert. In beiden Fällen zeigt sich eine nichtlineare Abhängigkeit der Aktivität der fusionierten Tetramere von dem Anteil mutierter Monomere im Fusionsprotein.

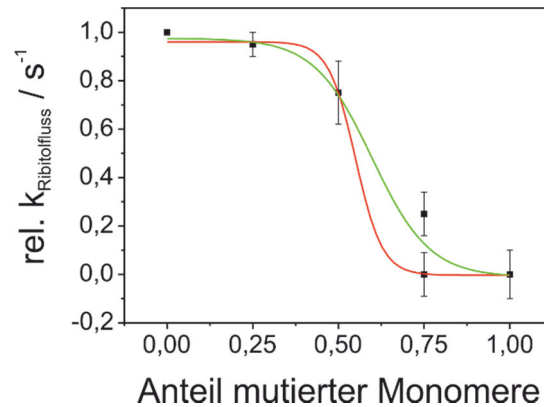


Abbildung 16: Korrelation zwischen der Tetramer-Aktivität und dem Anteil mutierter Monomere.

Auftragung der relativen Aktivität der fusionierten GlpF-Tetramere gegen den Anteil mutierter Monomeren innerhalb des Tetramers. Für die Bestimmung der relativen Aktivität wurde die Aktivität der Tetramere nach Induktion der Proteinexpression mit 500 μM IPTG auf die Aktivität des fusionierten Homotetramers 4xGlpF bezogen. Für das GlpF-Tetramer 1xGlpF-3xGlpF-E43A ist im Diagramm sowohl die nicht korrigierte (\blacksquare) als auch die um das Expressionsniveau korrigierte, relative Geschwindigkeitskonstante (\bullet) gezeigt. Die Daten wurden mit einer Boltzmann-Sigmoidfunktion approximiert. Eine Approximation erfolgte unter Berücksichtigung der korrigierten, relativen Geschwindigkeitskonstante (\bullet) (rote Kurve) und eine weitere unter Berücksichtigung der nicht korrigierten (\blacksquare) und der um das Expressionsniveau korrigierten, relativen Geschwindigkeitskonstante (\bullet) (grüne Kurve).

3.1.3 Die fusionierten GlpF-Homooligomere bilden intermolekulare Wechselwirkungen aus

Für einen Teil der untersuchten fusionierten GlpF-Homooligomere (vgl. Abbildung 14A) ist es nur durch intermolekulare Wechselwirkungen möglich, Tetramere zu bilden, die dem natürlichen Oligomerisierungsgrad der Aquaporine entsprechen. Daher ist das generelle Vermögen dieser Homooligomere, intermolekulare Interaktionen auszubilden, von Bedeutung. Die Homooligomerisierung der GlpF-Fusionsproteine wurde mittels des GALLEX-Systems überprüft (158). Dazu wurden die verschiedenen GlpF-Fusionskonstrukte (vgl. Abbildung 14A) zusätzlich N-terminal mit der LexA-DNA-Bindungsdomäne fusioniert. Nach Expression der chimären Proteine bei steigenden IPTG-Konzentrationen in *E. coli* SU101-Zellen wurde die β -Gal.-Akt., die ein Maß für die Interaktionsstärke ist, ermittelt. Zum Vergleich wurde auch die β -Gal.-Akt. des GlpF-Wildtyps bestimmt, dessen Fähigkeit zu Homointeraktionen mittels des GALLEX-Systems gut beschrieben ist (125). Wie aus Abbildung 17A hervorgeht, nahm die β -Gal.-Akt. bei IPTG-Konzentrationen höher als 10 μM signifikant ab und erreichte etwa das Niveau des GlpF-Wildtyps nach Induktion der Proteinexpression mit 1000 μM IPTG.

Um Rückschlüsse über das Expressionsniveau der verschiedenen LexA-GlpF-Homooligomere zu erhalten, wurden GlpF-haltige Membranen aus *E. coli* NT326-Zellen isoliert und in einer Western Blot-Analyse das Expressionsniveau der Fusionskonstrukte bestimmt (Abbildung 17B und Abbildung A 3). Auch diese Western Blot-Analysen zeigten keine signifikanten Mengen an Degradationsprodukten auf (Abbildung A 3). Die Qualität der Western

Blot-Analyse ermöglicht an dieser Stelle keine quantitative Auswertung. Daher kann das Oligomerisierungsverhalten der GlpF-Homooligomere nicht detailliert verglichen werden.

Die GALLEX-Messungen ermöglichen jedoch die Schlussfolgerung, dass alle untersuchten GlpF-Homooligomere intermolekulare Interaktionen ausbilden, wie der Vergleich mit dem GlpF-Wildtyp zeigt.

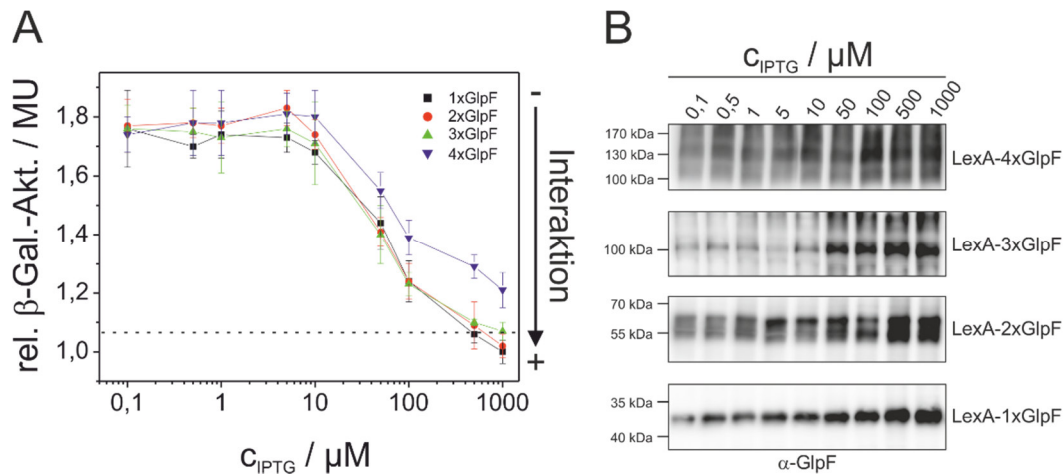


Abbildung 17: Oligomerisierung der GlpF-Homooligomere.

Mittels des GALLEX-Systems wurde das Oligomerisierungsverhalten der GlpF-Homooligomere bei steigenden Proteinkonzentrationen analysiert. (A) Die relativen β -Gal.-Akt. der GlpF-Homooligomere 1xGlpF (schwarz), 2xGlpF (rot), 3xGlpF (grün) und 4xGlpF (blau) wurden gegen die IPTG-Konzentration als Maß für die Proteinkonzentration aufgetragen ($n = 9 \pm \text{SE}$). Zur Ermittlung der relativen β -Gal.-Akt. wurden die β -Gal.-Akt. auf die β -Gal.-Akt. des GlpF-Monomers 1xGlpF nach Induktion der Proteinexpression mit 1000 μM IPTG des jeweiligen Messtages bezogen. Somit ergibt sich eine relative β -Gal.-Akt. des GlpF-Monomers 1xGlpF nach Induktion der Proteinexpression mit 1000 μM IPTG von 1,0. Die gestrichelte Linie gibt die relative β -Gal.-Akt. des GlpF-Wildtyps nach Induktion der Proteinexpression mit 1000 μM IPTG an. (B) Zur Bestimmung des Expressionsniveaus wurde eine Western Blot-Analyse mit aus *E. coli* NT326-Zellen isolierten Membranen durchgeführt. Es wurden jeweils 2,4 μg Gesamtprotein aufgetragen.

3.1.4 Die Stabilität des GlpF-Tetramers aus fusionierten GlpF-Dimeren ist unverändert

Die Stabilität von Membranproteinen kann *in vitro* durch eine SDS-induzierte Entfaltung untersucht werden (170, 184, 185). Durch Zugabe des ionischen Detergenz SDS zu einem milden Detergenz wie DDM entstehen gemischte Mizellen. In diesen gemischten Mizellen kann durch die sukzessive Erhöhung des SDS-Stoffmengenanteils die schrittweise Entfaltung von Membranproteinen induziert werden. Charakteristisch für die Entfaltung von Membranproteinen mit SDS ist, dass SDS diese nicht vollständig denaturiert, sondern die Dissoziation einzelner Transmembranhelices bewirkt und daher die Sekundärstruktur des Proteins zu großen Teilen erhalten bleibt (186, 187). Die Entfaltung von GlpF mit SDS bewirkt die Dissoziation des Tetramers zum Monomer (188). Daher können über die SDS-induzierte Entfaltung Rückschlüsse auf die Tetramerstabilität gezogen werden.

Um Informationen über die *in vitro* Stabilität der hier untersuchten artifiziiellen Tetramere zu erhalten, wurde das wildtypische Tetramer und das artifiziielle Tetramer, bestehend aus zwei fusionierten GlpF-Dimeren (2xGlpF), mit SDS entfaltet. Die SDS-induzierte Entfaltung wurde mittels einer semi-nativen SDS-PAGE-Analyse verfolgt (Abbildung 18A/B). Diese ermöglicht die Untersuchung des oligomeren Zustandes von Membranproteinen, und für GlpF im Speziellen wurde gezeigt, dass der native, tetramere Oligomerisierungsgrad unter diesen Bedingungen erhalten bleibt (125, 188, 189).

Die SDS-PAGE-Analysen zeigten eine kontinuierliche Abnahme der GlpF-Tetramerbandenintensität bis zu einem SDS-Stoffmengenanteil von 0,77. Die Abnahme der GlpF-Tetramerbandenintensität ging mit der Entstehung der GlpF-Monomer- bzw. GlpF-Dimerbande einher.

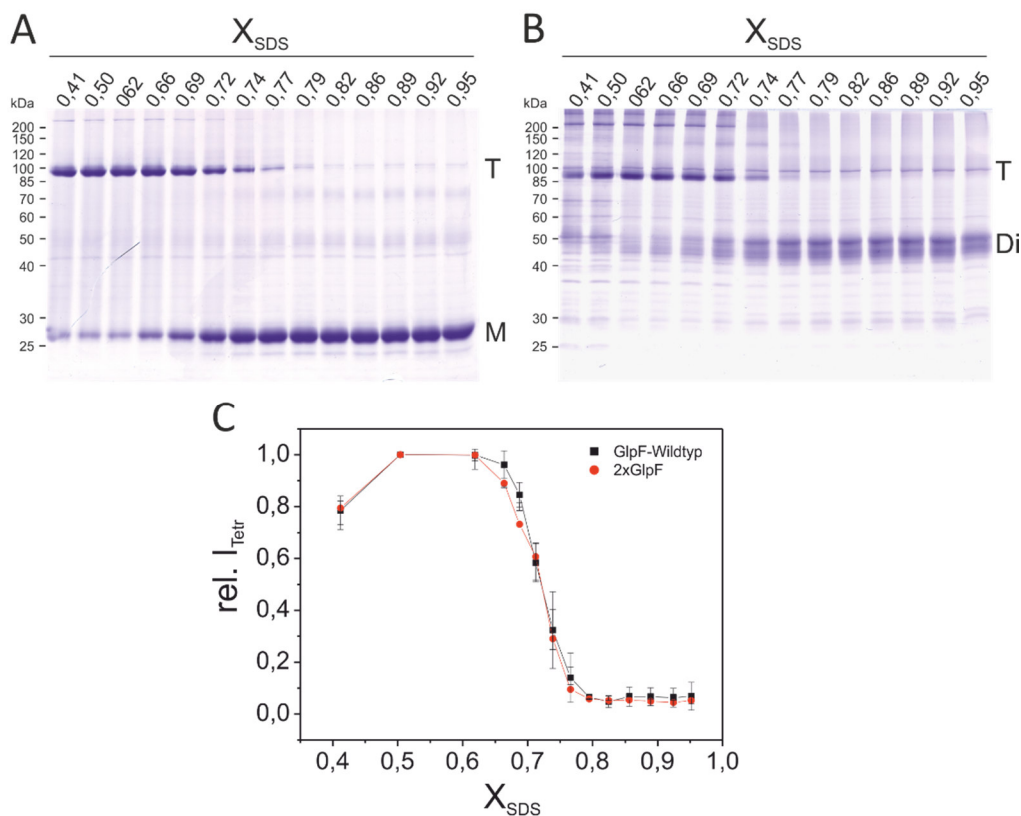


Abbildung 18: Stabilität des GlpF-Tetramers aus zwei fusionierten GlpF-Dimeren.

Zur Untersuchung der Stabilität des artifiziiellen Tetramers, bestehend aus zwei GlpF-Dimeren, wurde dieses durch SDS entfaltet. Der Verlauf der SDS-induzierten Entfaltung wurde mittels einer SDS-PAGE-Analyse verfolgt. (A) SDS-PAGE-Analyse der SDS-Titration des wildtypischen GlpF-Tetramers (GlpF-Wildtyp). (B) SDS-PAGE-Analyse der SDS-Titration des artifiziiellen Tetramers bestehend aus zwei fusionierten GlpF-Dimeren (2xGlpF). (C) Die Intensität der Tetramerbanden des GlpF-Wildtyps (schwarz) und des fusionierten Dimers 2xGlpF (rot) wurde mittels des Programms ImageJ quantifiziert, auf den Wert bei 0,5 X_{SDS} normiert und gegen den SDS-Stoffmengenanteil aufgetragen ($n = 3 \pm \text{SD}$). (T: Tetramer; Di: Dimer; M: Monomer).

Zur besseren Vergleichbarkeit der Entfaltung der Tetramere wurden die Tetramerbanden in den SDS-PAGE-Analysen mit dem Programm ImageJ durch Integration der Peakfläche quantifiziert und die relative Tetramerbandenintensität gegen den SDS-Stoffmengenanteil

aufgetragen (Abbildung 18C). Aus dieser Auftragung wurde deutlich, dass die Abhängigkeit der Entfaltung des artifiziellen Tetramers, bestehend aus zwei fusionierten GlpF-Dimeren, und des wildtypischen Tetramers identisch ist. Daher ist auch die Stabilität des GlpF-Tetramers aus zwei fusionierten GlpF-Dimeren gegenüber SDS unverändert.

Die beschriebenen Untersuchungen an den fusionierten GlpF-Homooligomeren verdeutlichen eine Abhängigkeit der GlpF-Aktivität vom Grad der Fusion. Außerdem können die GlpF-Homooligomere intermolekulare Wechselwirkungen ausbilden, wie die GALLEX-Messungen zeigten. Die Analyse der Aktivität der fusionierten GlpF-Tetramere, mit steigenden Anteilen an GlpF-Monomeren mit eingeschränktem Translokationsmechanismus, zeigte einen nichtlinearen Zusammenhang zwischen der Aktivität und dem Anteil mutierter Monomere auf. So wurden für die GlpF-Tetramere 3xGlpF-1xGlpF-E43A und 2xGlpF-2xGlpF-E43A, im Vergleich zum fusionierten GlpF-Tetramer bestehend aus vier wildtypischen Monomeren, Aktivitäten von 95 bzw. 75% verzeichnet. Die Tetramere 1xGlpF-3xGlpF-E43A und 4xGlpF-E43A waren dagegen bei ähnlicher Proteinkonzentration nahezu inaktiv. Die Betrachtung der Stabilität des fusionierten GlpF-Dimers (2xGlpF) gegenüber der Entfaltung mit SDS zeigte keine Veränderungen im Vergleich zum GlpF-Wildtyp.

3.2 Einfluss definierter Phospholipide auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF

Sowohl die Lipidkomposition als auch die Membraneigenschaften können die Stabilität und Funktion integraler Membranproteine beeinflussen (21, 51, 68, 190). Genaue Kenntnisse über die Aquaporin-Aktivität in verschiedenen Lipidumgebungen sind jedoch bis heute nicht vorhanden, da der Effekt variierender Membranumgebungen auf die Aquaporin-Aktivität nur in wenigen Beispielen untersucht wurde (150, 151). Die bisher durchgeführten Studien weisen auf einen Einfluss der Lipidumgebung auf die Aktivität der Aquaporine hin. Um weitere Informationen über die Tetramerisierung und Aktivität von Aquaporinen in verschiedenen Lipidumgebungen zu erhalten, wurde systematisch der Einfluss der Membrandicke sowie der Phospholipide PE, PG, CL und PS auf die Oligomerisierung und Aktivität des Aquaglyceroporins GlpF untersucht.

3.2.1 Eine minimale Acylkettenlänge ist notwendig für die GlpF-Aktivität

Um den Einfluss der Acylkettenlänge auf die Oligomerisierung und Aktivität von GlpF zu untersuchen, wurde GlpF in einfach ungesättigte cis- $\Delta 9$ PC-Membranen steigender Kettenlänge (C14:1-C22:1) rekonstituiert. Die Dicke des hydrophoben Kerns dieser Lipiddoppelschichten nimmt von 20,0 auf 34,0 Å zu ($d_{C=O-C=O}$, Abstand zwischen den Carbonylgruppen der Esterbindungen in den gegenüberliegenden Membranhälften) (siehe Tabelle 18). Parallel zur Erhöhung der Membrandicke, nehmen die Fluidität und die Biegeelastizität dieser Membranen ab (191, 192). Zum Vergleich wurde GlpF zusätzlich in EPL-Membranen inkorporiert. Diese Membranen entsprechen sowohl bezüglich der Lipidkopfgruppen-Zusammensetzung als auch hinsichtlich der Acylketten-Heterogenität der natürlichen *E. coli*-Membran.

Tabelle 18: Dicke des hydrophoben Kerns von PC-Doppellipidschichten.

Die Daten des d_{P-P} -Abstandes (Distanz zwischen den Phosphat-Gruppen in den gegenüberliegenden Membranhälften) wurden aus (193) entnommen, die des $d_{C=O-C=O}$ -Abstandes aus (191).

	d_{P-P} [Å]	$d_{C=O-C=O}$ [Å]
diC14:1-PC	29,6	20,0
diC16:1-PC	32,1	23,5
diC18:1-PC	36,8	27,0
diC20:1-PC	38,9	30,5
diC22:1-PC	45,5	34,0

Nach der Rekonstitution von GlpF in Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung wurden sowohl der Oligomerisierungsgrad als auch die Aktivität von GlpF untersucht. Da GlpF

in der natürlichen Lipidmembranen als Homotetramer vorliegt, ermöglicht die Analyse des Oligomerisierungsgrades Aussagen über die GlpF-Tetramerstabilität in den unterschiedlichen Lipidumgebungen. Der Oligomerisierungsgrad von GlpF wurde mittels einer semi-nativen SDS-PAGE-Analyse untersucht, in der der natürliche GlpF-Oligomerisierungsgrad erhalten bleibt (vgl. Abschnitt 3.1.4 und Abbildung 19). Darüber hinaus kann mit Hilfe der SDS-PAGE-Analyse die Inkorporationseffizienz von GlpF in Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung ermittelt werden. In der SDS-PAGE-Analyse zeigt nur inkorporiertes GlpF das für die verschiedenen GlpF-Oligomere charakteristische Migrationsverhalten. Unterschiede in der Inkorporationseffizienz wurden in der Auswertung der Ribitolflussraten berücksichtigt.

Außerdem wurde durch dynamische Lichtstreuung der Radius der Proteoliposomen bestimmt (siehe Tabelle A 3, Tabelle A 4,

Tabelle A 5 und Tabelle A 6). Da der Polydispersitätsindex der Proben jedoch sehr hoch war (Werte größer als 0,7 weisen auf eine breite Größenverteilung einer Probe hin), sind die bestimmten Radien mit großen Fehlern behaftet. Auch die Präzision der Messung war mit einer Standardabweichung von 30% schlecht. Für die Proteoliposomen wurde ein durchschnittlicher Radius von 40 ± 10 nm (Zahlenmittel) ermittelt. Im Rahmen des Fehlers ist davon auszugehen, dass die Lipidzusammensetzung den Radius der Liposomen nicht wesentlich beeinflusst. Da der Ribitofluss durch GlpF bidirektional möglich ist, war es nicht notwendig die Orientierung des rekonstituierten GlpF in den Liposomen zu analysieren.

Die SDS-PAGE-Analyse nach der Rekonstitution von GlpF in PC-Membranen steigender Acylkettenlängen zeigte, dass die Inkorporationseffizienz von GlpF in die vergleichsweise dünnen Membranen der diC14:1- und diC16:1-Liposomen gering ist (Abbildung 19A). Die maximale Inkorporation wurde in diC18:1-Membranen erreicht und nahm bei Inkorporation in die diPC20:1- und diPC22:1-Liposomen wieder ab. Um die Inkorporationseffizienz in die Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung quantitativ zu vergleichen und die relativen Anteile der verschiedenen Oligomerisierungsgrade zu bestimmen, wurden die Proteinbandenintensitäten der unterschiedlichen GlpF-Oligomere mittels des Programms ImageJ grafisch erfasst und durch Integration der Peakflächen die relativen Proteinkonzentrationen in den Liposomen bestimmt (siehe Abbildung 20A). Da die Proteinbandenintensitäten vom Grad der Entfärbung des SDS-Gels abhängen, konnten die Proteinbandenintensitäten nicht direkt verglichen werden. Daher wurde die Summe der Intensitäten der Tetramer-, Dimer- und Monomer-GlpF-Bande auf die Summe der Proteinbandenintensität des GlpF-Tetrames, -Dimers und Monomers in den diC18:1-PC-Liposomen bezogen ($C_{GlpF,rel.}$). Da kein direkter Vergleich der Proteinbandintensitäten möglich war, konnte für die relative Menge an GlpF in den diC18:1-Liposomen kein Fehler berechnet werden.

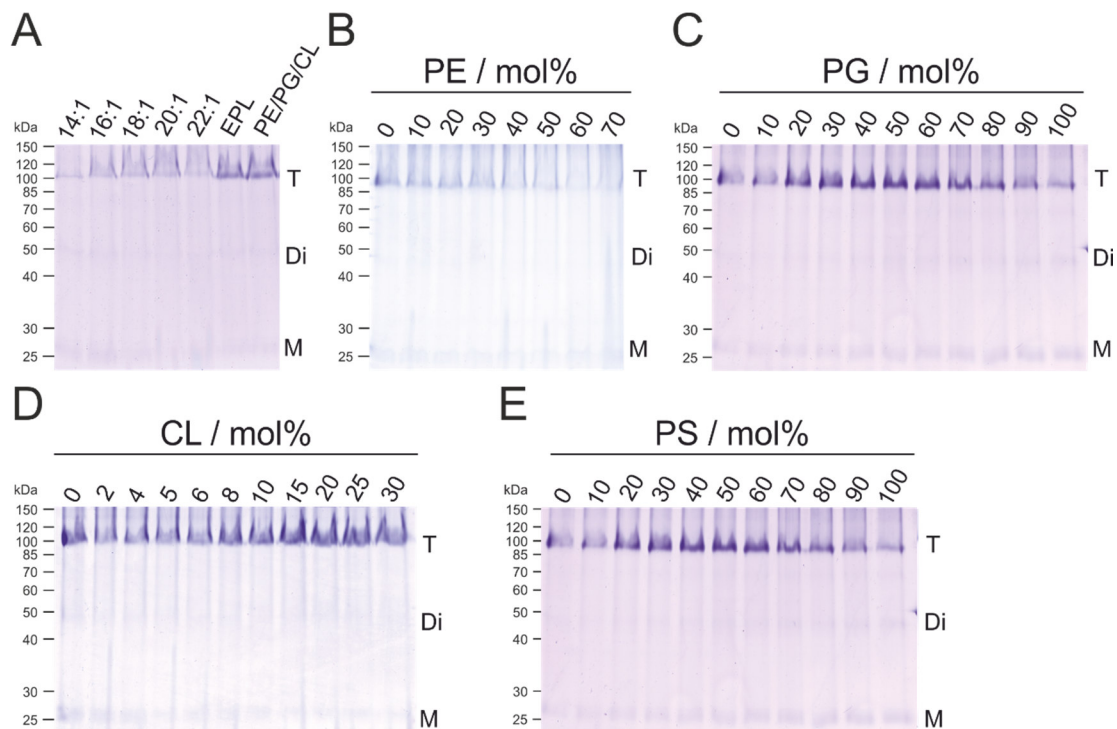


Abbildung 19: SDS-PAGE-Analyse der GlpF-Oligomerisierung und Inkorporation in Liposomen.

Der GlpF-Oligomerisierungsgrad und die Inkorporation in Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung wurden mittels einer semi-nativen SDS-PAGE-Analyse verfolgt. Tetrameres (T), dimeres (Di) und monomeres (M) GlpF sind in exemplarischen SDS-PAGE-Gelen aufgezeigt. (A) Inkorporation in PC-Membranen steigender Acylkettenlänge sowie in EPL- und PE/PG/CL-Membranen. Inkorporation in Liposomen mit steigendem (B) PE-, (C) PG-, (D) CL- und (E) PS-Stoffmengenanteilen.

Während in den diC14:1- und diC16:1-Membranen der Anteil an monomerem und dimerem GlpF größer war als der GlpF-Tetrameranteil, lag GlpF in Liposomen ab der Kettenlänge C18:1 hauptsächlich als Tetramer vor (diC18:1-PC: 78%, diC20:1-PC: 77% und diC22:1-PC: 65%) (vgl. Abbildung A 5A). Ferner wurde deutlich, dass die Inkorporation in die EPL-Membranen am effizientesten war und auch in diesen Membranen GlpF vorrangig als Tetramer vorlag (77%). Demzufolge bleibt der natürliche GlpF-Oligomerisierungsgrad in den EPL-Membranen sowie in den für *E. coli*-Membranproteine nicht-physiologischen PC-Membranen einer bestimmten Acylkettenlänge erhalten. Zudem ist es möglich, dass in den Liposomen der tatsächliche Tetrameranteil höher ist und die Dissoziation des GlpF-Tetramers zu monomerem und dimerem GlpF durch das im Laufpuffer der SDS-PAGE-Analyse vorhandene SDS induziert wurde.

Die Aktivität von GlpF in den Liposomen steigender Membrandicke wurde durch Bestimmung der Ribitolflusskinetiken über die Lipiddoppelschicht an einem *Stopped-Flow*-UV/VIS-Spektrometer erfasst. Während in den diC14:1- und diC16:1-Liposomen der für GlpF charakteristische Abfall der Streulichtintensität nicht verfolgt werden konnte, wurden hohe Aktivitäten für GlpF in diC18:1-PC-, diC20:1-PC- und diC22:1-PC-Membranen verzeichnet

(Abbildung 20B). Um den GlpF-vermittelten Ribitoffluss in den Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung quantitativ zu vergleichen, wurden die Geschwindigkeitskonstanten durch Approximation mit einer doppelt exponentiellen Zerfallsfunktion bestimmt und die normierten, gewichteten Geschwindigkeitskonstante $k_{w, norm.}$ berechnet. Diese bestätigen, dass GlpF in den diC14:1-PC- und diC16:1-PC-Membranen inaktiv ist und verdeutlichen, dass die GlpF-Aktivität in den PC-Membranen von diC18:1-PC bis diC22:1-PC konstant zunimmt (Abbildung 20C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass GlpF außerordentlich tolerant gegenüber dem nicht natürlich in der *E. coli*-Membran vorkommenden Lipid PC ist. So blieb der natürliche Oligomerisierungsgrad in Liposomen aus diC18:1-PC und diC20:1-PC erhalten und hohe Ribitofflussraten wurden ab einer Acylkettenlänge von C18:1 erfasst. Aufgrund dessen scheint die natürliche *E. coli*-Lipidkopfgruppen-Zusammensetzung weder für die Struktur noch für die Aktivität von GlpF von Bedeutung zu sein. Aus den Ergebnissen wird außerdem ersichtlich, dass die Aktivität von GlpF in den EPL-Membranen, die in der Lipidkopfgruppen- und der Acylketten-Zusammensetzung der natürlichen *E. coli*-Lipidmembran entsprechen, signifikant eingeschränkt ist (vgl. Abbildung 20C).

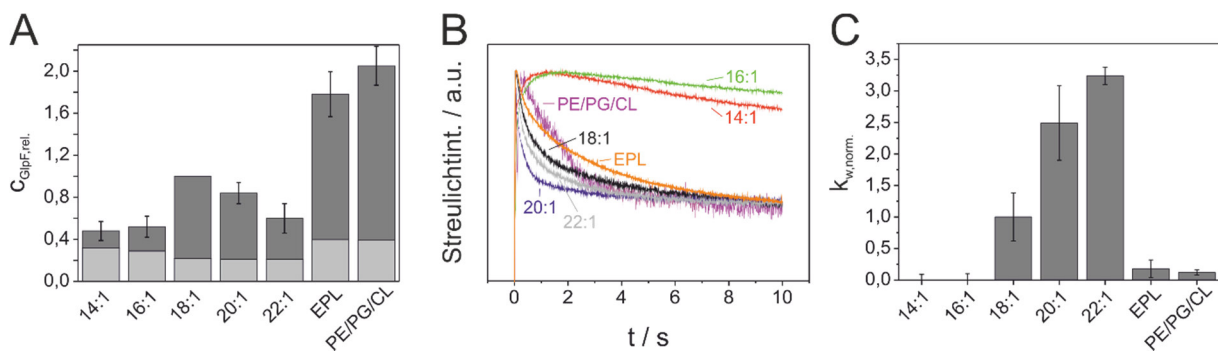


Abbildung 20: Abhängigkeit der GlpF-Oligomerisierung und der -Aktivität von der Acylkettenlänge.

(A) Die GlpF-Oligomerisierung und die Inkorporation in Liposomen wurden mittels einer semi-nativen SDS-PAGE-Analyse verfolgt. Im Diagramm gezeigt ist die Inkorporation von GlpF bezogen auf die Menge an inkorporiertem GlpF in diC18:1-PC-Membranen ($C_{GlpF, rel.}$) ($n = 3-5 \pm SD$). In dunkelgrau ist der Anteil an tetramerem GlpF dargestellt und in hell grau die Summe des Anteils an monomerem und dimerem GlpF.

(B) Die Funktion von GlpF in den Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung wurde durch Messung des Ribitofflusses über die Lipiddoppelschicht an einem *Stopped-Flow*-UV/Vis-Spektrometer untersucht. Exemplarische Streulichtkurven der GlpF-Aktivität in Liposomen steigender Acylkettenlänge (diC14:1-PC (rot), diC16:1-PC (grün), diC18:1-PC (schwarz), diC20:1-PC (blau), diC22:1-PC (grau)) sowie in EPL- (orange) und PE/PG/CL-Membranen (70 mol% diC18:1-PE, 20 mol% diC18:1-PG, 10 mol% tetrC18:1CL) (violett). Die Kurven sind aus jeweils fünf Messungen gemittelt. (C) Normierte, gewichtete Geschwindigkeitskonstanten $k_{w, norm.}$ des GlpF-vermittelten Ribitofflusses in unterschiedlichen Lipidumgebungen ($n = 3-5 \pm SD$). Die gewichteten Geschwindigkeitskonstanten wurden auf die relative GlpF-Konzentration ($C_{GlpF, rel.}$) bezogen. Die so ermittelten relativen, gewichteten Geschwindigkeitskonstanten $k_{w, rel.}$ wurden anschließend auf $k_{w, rel.}$ von GlpF in den diC18:1-PC-Membranen des jeweiligen Messtages normiert. Auf diese Weise wurden die normierten, gewichteten Geschwindigkeitskonstanten $k_{w, norm.}$ erhalten.

Die deutlich eingeschränkte GlpF-Aktivität ist möglicherweise auf die heterogene Acylketten-Zusammensetzung der EPL-Membranen zurückzuführen. So ist beispielsweise für den

energieabhängigen Laktosetransport durch die *E. coli* Laktose Permease LacY ein Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der Lipidkopfgruppen und der Acylketten beschrieben (79). Der Transport war nur in Membransystemen mit ungesättigten Acylketten möglich (79). Um zwischen potenziellen Effekten der Acylketten- und der Lipidkopfgruppen-Zusammensetzung zu differenzieren, wurde GlpF in Membranen einer ternären Lipidmischung bestehend aus 70 mol% diC18:1-PE, 20 mol% diC18:1-PG und 10 mol% tetrC18:1-CL rekonstituiert. Diese, im Folgenden als PE/PG/CL bezeichnete Lipidmischung, spiegelt die Lipidkopfgruppen-Zusammensetzung von *E. coli*-Membranen wieder und enthält nur einfach ungesättigte cis- $\Delta 9$ Acylketten. Die Inkorporationseffizienz von GlpF in Membranen dieser ternären Mischung war mit der Inkorporation in EPL-Membranen vergleichbar (Abbildung 19A und Abbildung 20A). Auch in den PE/PG/CL-Membranen lag GlpF hauptsächlich als Tetramer (etwa 80%) vor und die GlpF-Aktivität war, wie zuvor in den EPL-Membranen beobachtet, deutlich eingeschränkt. Daher kann ausgeschlossen werden, dass die heterogene Acylketten-Zusammensetzung und insbesondere gesättigte Fettsäurereste die Aktivität von GlpF negativ beeinflussen.

Da spezielle Phospholipide die Aktivität von Transmembranproteinen modulieren können, wurde im Folgenden der Einfluss der natürlich in der *E. coli*-Membran vorkommenden Phospholipide PE, PG und CL, sowie von PS, untersucht (51, 52, 74). Hierfür wurde nach der sukzessiven Erhöhung der PE-, PG-, CL- bzw. PS-Stoffmengenanteile in PC-Liposomen, die als Basislipid dienten, der Einfluss der veränderten Lipidkomposition auf die Aktivität und Oligomerisierung von GlpF ermittelt. Da die Inkorporation von GlpF in den vorangegangenen Messungen in diC18:1-Liposomen maximal und die Aktivität gleichzeitig moderat war, wurden alle folgenden Experimente mit einfach ungesättigten (cis- $\Delta 9$) Lipiden der Kettenlänge C18 durchgeführt, sodass Aktivitätsänderungen sensitiv verfolgt werden konnten.

3.2.2 PE-induzierte Änderungen des lateralen Drucks in der Acylkettenregion beeinflussen die GlpF-Aktivität nicht

Die GlpF-Aktivität war in den EPL- und PE/PG/CL-Membranen im Vergleich zur Aktivität von GlpF in PC-Membranen einer minimalen Acylkettenlänge deutlich eingeschränkt. Daher wurde zunächst der Einfluss von PE auf die GlpF-Oligomerisierung und -Aktivität untersucht. PE ist mit einem Anteil von 70-75% das am häufigsten vorkommende Phospholipid in der natürlichen *E. coli*-Membran. Sowohl PE als auch PC sind zwitterionische Lipide. Da die molekulare Fläche der PE-Kopfgruppe kleiner ist als die Querschnittsfläche der Acylketten, bildet PE in wässrigen Lösungen im Gegensatz zu PC keine lamellaren Lipiddoppelschichten aus, sondern liegt in der invertiert hexagonalen Phase (H_{II}) vor (15). Die Inkorporation eines solchen Lipids in eine Lipiddoppelschicht erhöht den lateralen Druck in der Acylkettenregion (70, 71, 194).

Demzufolge könnte die eingeschränkte Aktivität von GlpF in EPL und PE/PG/CL-Membranen auf dem erhöhten lateralen Druck in der Acylkettenregion basieren.

Die Inkorporationseffizienz von GlpF in Liposomen mit erhöhten PE-Stoffmengenanteilen nahm konstant mit steigenden PE-Konzentrationen ab (Abbildung 19B und Abbildung 21A). Bis zu einem PE-Stoffmengenanteil von 60 mol% lag GlpF hauptsächlich als Tetramer vor. Ab Stoffmengenanteilen von 70 mol% PE nahm der Anteil an monomerem und dimerem GlpF von etwa 20% auf 40% zu (vgl. Abbildung A 5B). Die GlpF-Aktivität verringerte sich zunächst konstant mit dem PE-Stoffmengenanteil (Abbildung 21B), doch unter Berücksichtigung der ebenfalls reduzierten Inkorporationseffizienz wurde deutlich, dass das häufigste *E. coli*-Lipid PE keinen Einfluss auf die GlpF-Aktivität hat (Abbildung 21C). Demzufolge beeinflusst eine PE-induzierte Erhöhung des lateralen Drucks in der Acylkettenregion die GlpF-Aktivität nicht.

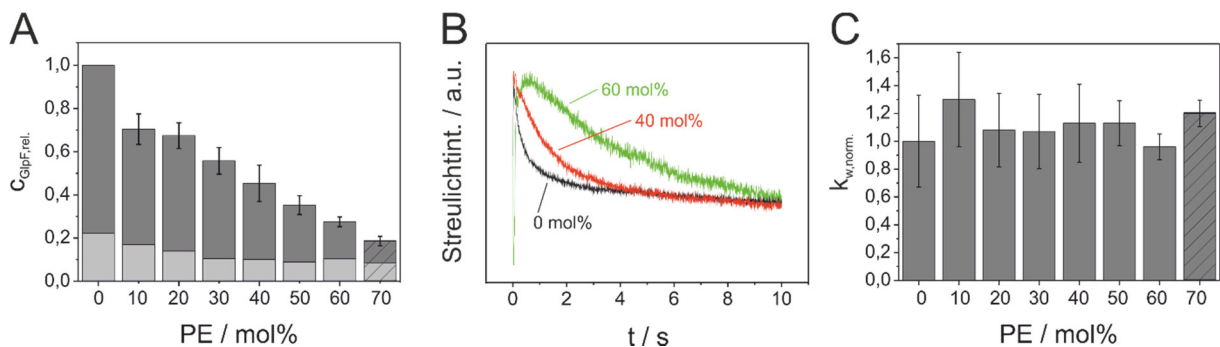


Abbildung 21: Abhängigkeit der GlpF-Oligomerisierung Aktivität von steigenden PE-Stoffmengenanteilen.

Die Daten sind wie in der Unterschrift zu Abbildung 20 beschrieben präsentiert. (A) GlpF-Oligomerisierung und -Inkorporation. (B) Repräsentative Streulichtkurven der GlpF-Aktivitätsmessungen bei PE-Stoffmengenanteilen von 0 mol% (schwarz), 40 mol% (rot) und 60 mol% (grün). (C) Normierte, gewichtete Geschwindigkeitskonstanten $k_{w,norm.}$ des GlpF-vermittelten Ribitolflusses. Die quergestreiften Balken in (A) und (C) zeigen die natürlich in der inneren *E. coli*-Membran vorkommende PE-Konzentration auf.

3.2.3 Die GlpF-Aktivität wird durch anionische Lipide eingeschränkt

Da auch die Erhöhung des lateralen Drucks in der Acylkettenregion die signifikant verringerte Aktivität von GlpF in EPL- und PE/PG/CL-Membranen nicht erklären konnte, wurde als nächstes der Einfluss der anionischen *E. coli*-Lipide PG und CL auf die GlpF-Aktivität analysiert. Der Anteil der Lipide PG und CL beträgt in der inneren *E. coli*-Membran 15-20% bzw. 5-10%. Die Inkorporation von GlpF in die PC/PG und PC/CL-Lipidsysteme folgte einem glockenförmigen Profil (Abbildung 19C/D und Abbildung 22A/D), mit maximaler Inkorporation bei Stoffmengenanteilen von 40 mol% PG bzw. 20 mol% CL. Damit wurde die maximale Inkorporation in beiden Lipidsystemen bei gleicher negativer Nettoladung der Membranen erreicht. Unterschiede wurden dagegen in der relativen Änderung der Inkorporation zwischen den PC/PG- und PC/CL-Lipidsystemen deutlich: Während im Vergleich zu reinen PC-Membranen in PC/PG-Liposomen die maximal inkorporierte GlpF-Menge um den Faktor 1,3

erhöht war (Abbildung 22A), war die Inkorporationseffizienz in PC/CL-Liposomen etwa um den Faktor 3 gesteigert (Abbildung 22D). In beiden Lipidsystemen wiederum lag GlpF hauptsächlich als Tetramer vor. Eine geringe Zunahme von monomerem und dimerem GlpF (von 18% auf 35%) wurde ab PG-Stoffmengenanteilen von 70 mol% in der semi-nativen SDS-PAGE-Analyse detektiert (vgl. Abbildung 19C und Abbildung A 5C). In den Membranen mit steigenden CL-Stoffmengenanteilen wurde hingegen kein Einfluss auf die GlpF-Oligomerisierung festgestellt (vgl. Abbildung 19 und Abbildung A 5D). Somit zeigte sich in den PC/PG- und PC/CL-Lipidsystemen erneut die hohe Stabilität des GlpF-Tetramers gegenüber Änderungen in der Lipidumgebung.

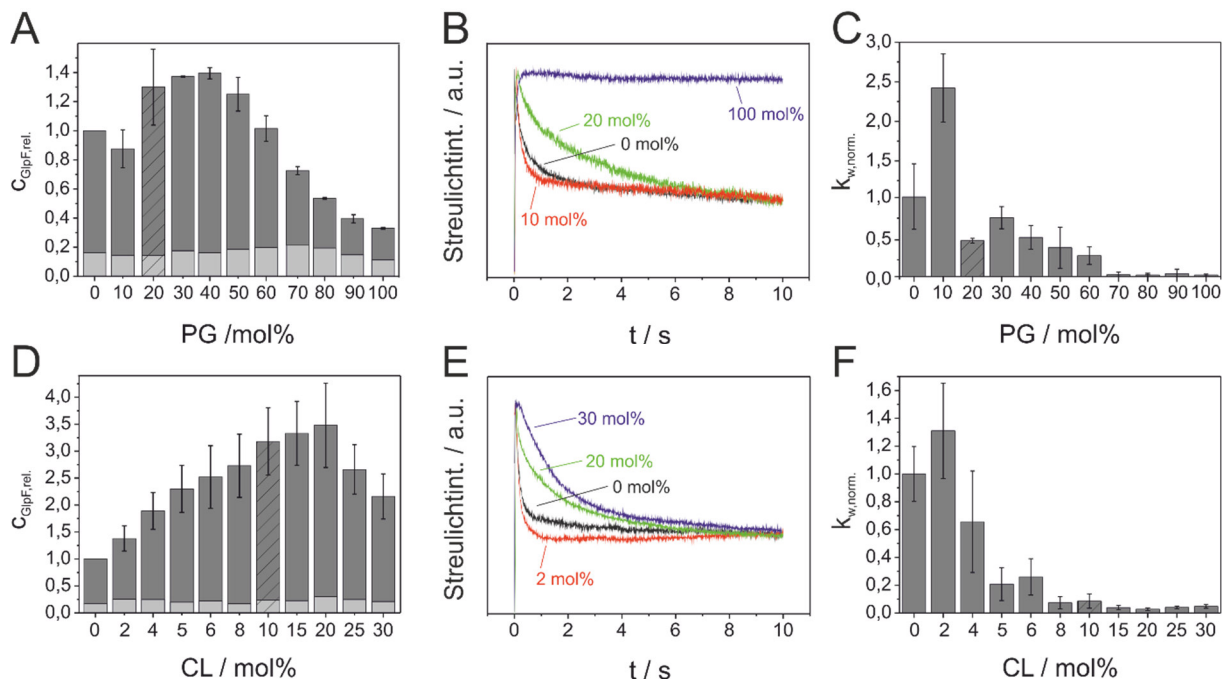


Abbildung 22. Abhängigkeit der GlpF-Oligomerisierung und der -Aktivität von steigenden PG- bzw. CL-Stoffmengenanteilen.

Die Daten sind wie in der Unterschrift zu Abbildung 20 beschrieben dargestellt. (A/D) GlpF-Oligomerisierung und -Inkorporation in Membranen mit steigenden PG- bzw. CL-Stoffmengenanteilen. (B) Repräsentative Streulichtkurven der GlpF-Aktivitätsmessungen in Liposomen bei steigenden PG-Stoffmengenanteilen (0 mol% (schwarz), 10 mol% (rot), 20 mol% (grün) und 100 mol% (blau)). (C/F) Normierte, gewichtete Geschwindigkeitskonstanten $k_{w,norm}$ des GlpF-vermittelten Ribitolflusses. (E) Repräsentative Streulichtkurven der GlpF-Aktivitätsmessungen in Liposomen bei CL-Anteilen von 0 mol% (schwarz), 2 mol% (rot), 20 mol% (grün) und 30 mol% (blau). Die quergestreiften Balken in (A), (C), (D) und (F) zeigen die natürlich in der inneren *E. coli*-Membran vorkommenden PG- bzw. CL-Konzentrationen auf.

Im Gegensatz zur nahezu unveränderten GlpF-Tetramerisierung, wurde ein signifikanter Einfluss der anionischen Lipide PG und CL auf die GlpF-Aktivität deutlich. So wurden die höchsten Geschwindigkeitskonstanten des GlpF-vermittelten Ribitolflusses in den Membranen ohne Ladungen bzw. mit niedrigem Ladungsniveau gemessen. Die höchsten Ribitolflussraten wurden bei Stoffmengenanteilen von 10 mol% PG bzw. 2 mol% CL erreicht (Abbildung 22B/C und E/F). Diese PG- und CL-Konzentrationen sind niedriger als die natürlich in der *E. coli*-

Membran vorhandenen PG- und CL-Konzentrationen (24). Die weitere Erhöhung des PG- bzw. CL-Stoffmengenanteils führte zu einem signifikant eingeschränkten Ribitolfluss über die Membranen. Folglich reduzieren die anionischen Lipide PG und CL bereits bei Stoffmengenanteilen von 20 bzw. 4 mol% die Funktion von GlpF. Ein Zusammenhang zwischen der Aktivität und des erhöhten Anteils an GlpF-Dimer und -Monomer ab Stoffmengenanteilen von 70 mol% PG wurde nicht festgestellt.

Um zwischen einer direkten Wirkung der PG- bzw. CL-Lipidkopfgruppen auf die GlpF-Aktivität und einem allgemeinen Ladungseffekt zu differenzieren, wurde der Einfluss des negativ geladenen Lipids PS auf GlpF untersucht. Spezifische Wechselwirkungen zwischen GlpF und der PS-Lipidkopfgruppe sind unwahrscheinlich, da PS nicht natürlich in der *E. coli*-Membran vorkommt. Allgemeine Ladungseffekte hingegen können auch durch PS vermittelt werden. Die Inkorporation von GlpF in Membranen mit steigenden PS-Stoffmengenanteilen folgte ebenfalls einer glockenförmigen Kurve. Die Inkorporationseffizienz war, wie bereits für das PC/PG-Lipidsystem beobachtet, bei einem Stoffmengenanteil von 30-40 mol% PS etwa um den Faktor 1,3 im Vergleich zu reinen PC-Membranen gesteigert (Abbildung 19E und Abbildung 23A). Der Einfluss von PS auf die GlpF-Aktivität war ebenfalls dem Effekt der anionischen Lipide PG und CL ähnlich. So wurden hohe GlpF-Aktivitäten bei 0 und 10 mol% PS verzeichnet und ab Stoffmengenanteilen von 20 mol% PS war die GlpF-Aktivität deutlich eingeschränkt (Abbildung 23B/C). Im Gegensatz zu PG konnte für PS kein Einfluss auf die Tetramerisierung von GlpF beobachtet werden (vgl. Abbildung A 5).

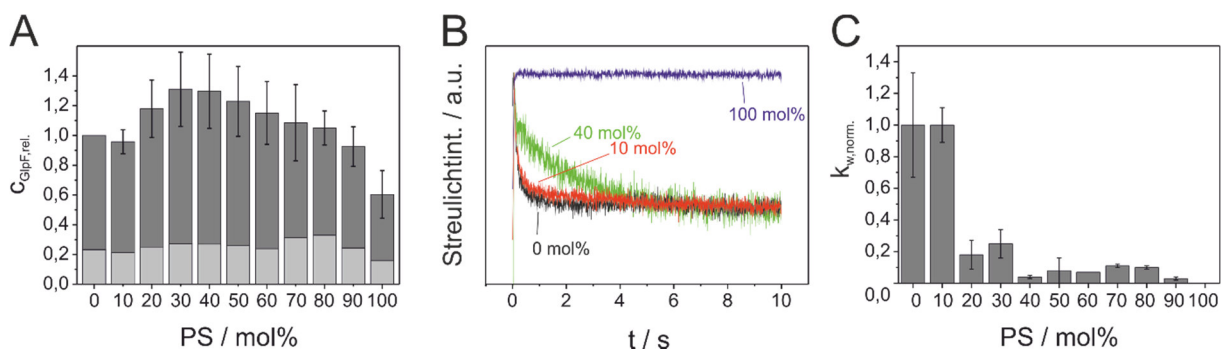


Abbildung 23: Abhängigkeit der GlpF-Oligomerisierung und der -Aktivität von steigenden PS-Stoffmengenanteilen.

Die Daten sind wie in der Unterschrift zu Abbildung 20 beschrieben präsentiert. (A) GlpF-Oligomerisierung und -Inkorporation. (B) Repräsentative Streulichtkurven der GlpF-Aktivitätsmessungen bei PS-Stoffmengenanteilen von 0 mol% (schwarz), 10 mol% (rot), 40 mol% (grün) und 100 mol% (blau). (C) Normierte, gewichtete Geschwindigkeitskonstanten $k_{w,norm.}$ des GlpF-vermittelten Ribitolflusses.

Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass die signifikant reduzierte GlpF-Aktivität auf die negative Ladung der anionischen Lipide zurückzuführen ist und die chemisch unterschiedlichen Lipidkopfgruppen nur einen geringen Einfluss auf die GlpF-Aktivität haben.

Da die negative Ladung der anionischen Lipide die GlpF-Aktivität reduzierte, wurde die GlpF-Aktivität in Membranen aus 50 mol% PG und 50 mol% PC bei erhöhter Na^+ -Ionenkonzentration verfolgt. Dieser Versuch basiert auf der Annahme, dass durch die Anreicherung gegensätzlich geladener Ionen an der Liposomenoberfläche die negative Ladung der Lipide ausgeglichen wird. Wie die Messung des GlpF vermittelten Ribitolflusses zeigte, konnte die GlpF-Aktivität durch Erhöhung der NaCl-Ionenkonzentration von 50 mM auf 150 mM gesteigert werden (vgl. Abbildung 24). Möglicherweise beeinflussen die negativ geladenen Lipide PG, CL und PS die GlpF-Struktur durch elektrostatische Wechselwirkungen, die durch einen Ladungsausgleich unterbunden werden können.

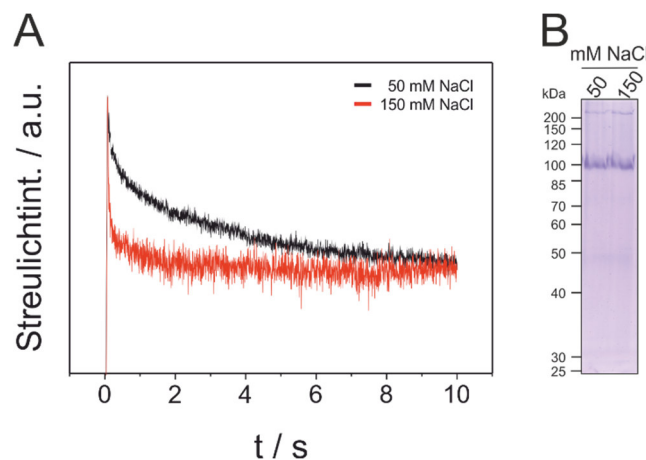


Abbildung 24: Regeneration der GlpF-Aktivität durch Ladungsabschirmung.

(A) Repräsentative Streulichtkurven der GlpF-Aktivität in Liposomen bestehend aus 50 mol% PG und 50 mol% PC mit 50 mM NaCl (schwarze Kurve) und 150 mM NaCl (rote Kurve) im Dialysepuffer. (B) Analyse der GlpF-Inkorporation in Liposomen mittels SDS-PAGE-Analyse nach Dialyse der Lipid-GlpF-Mischung in Gegenwart unterschiedlicher NaCl-Konzentration.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen den *in vitro* Einfluss der Phospholipide PC, PE, PG, CL und PS sowie der Acylkettenlänge auf die Oligomerisierung und -Funktion des Aquaglyceroporins GlpF. In den Analysen wurde deutlich, dass für die GlpF-Tetramerisierung Lipide einer bestimmten Acylkettenlängen notwendig sind. Änderungen in der Lipidkopfgruppen-Zusammensetzung blieben dagegen nahezu ohne Einfluss. Die Ergebnisse verdeutlichen außerdem eine hohe Toleranz der GlpF-Aktivität gegenüber wesentlichen Änderungen in der Lipidzusammensetzung. So wurden ab einer minimalen Acylkettenlänge von 27 Å ($d_{\text{C=O-C=O}}$) auch in Membranen aus PC-Lipiden, die nicht in der natürlichen Membranumgebung von GlpF vorkommen, hohe Ribitolflussraten erfasst. Während PE-induzierte Änderungen des lateralen Drucks in der Acylkettenregion die GlpF-Aktivität nicht beeinflussten, beeinträchtigten die anionischen Lipide die GlpF-Aktivität.

3.3 *In vivo* Einfluss veränderter physikochemischer Membraneigenschaften auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF

3.3.1 2-PEtOH induziert die Bildung von Lipiddomänen

In vivo sollte der Einfluss von 2-PEtOH induzierten Änderungen der physikochemischen Membraneigenschaften auf die Oligomerisierung und Aktivität des Aquaglyceroporins GlpF untersucht werden. Für das Anästhetikum 2-PEtOH ist beschrieben, dass dieses in Lipidmembranen inseriert und die Ordnung in der Acylkettenregion reduziert (53, 195, 196). Mittels Laurdan-Fluoreszenzspektroskopie wurde zunächst der Effekt von 2-PEtOH auf die Lipidordnung von EPL-Membranen untersucht. Die EPL-Membranen zeichnen sich nicht nur durch die unterschiedlichen Lipidkopfgruppen PE, PG und CL aus, sondern auch durch die heterogene Zusammensetzung der Acylketten (23, 24). Der Einfluss von 2-PEtOH auf EPL-Liposomen versetzt mit 0,2 mol% Laurdan wurde bei steigenden 2-PEtOH-Konzentrationen untersucht. Im Fluoreszenzemissionsspektrum war nach Inkubation der EPL-Membranen mit 2-PEtOH eine Zunahme der Emission bei 490 nm zu erkennen, was auf eine Abnahme der Ordnung in der Acylkettenregion hinweist (Abbildung 25A). Aus den Änderungen im Emissionsspektrum wurde der GP-Wert berechnet. Auf diese Weise wurde deutlich, dass 2-PEtOH die Lipidordnung in den EPL-Membranen kontinuierlich verringert (Abbildung 25B).

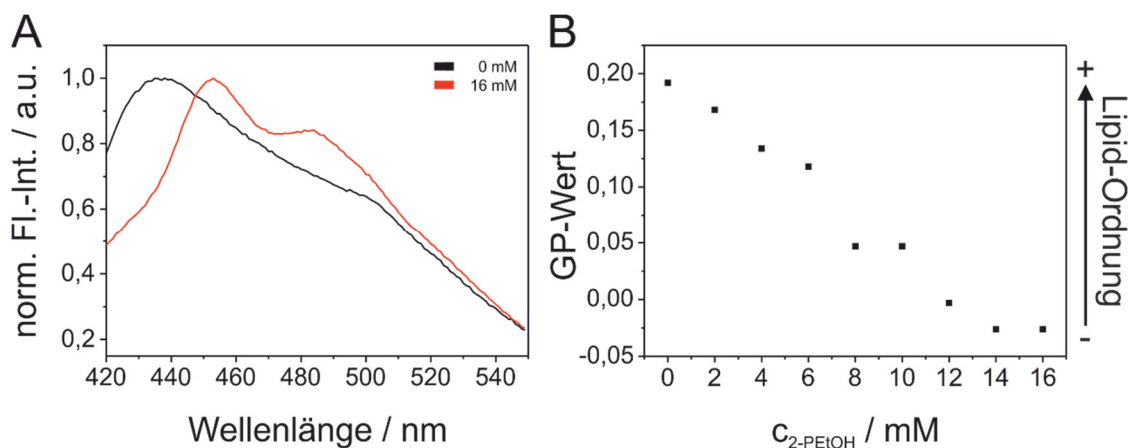


Abbildung 25: Laurdan-Fluoreszenzspektroskopie an EPL-Membranen zur Analyse der Lipidordnung.

(A) Um den Einfluss von 2-PEtOH auf die Lipidordnung von *E. coli*-Lipidmembranen zu untersuchen, wurden mit 0,2 mol% Laurdan versetzte EPL-Liposomen mit steigenden Konzentrationen an 2-PEtOH inkubiert und Fluoreszenzspektren nach Anregung bei 340 nm zwischen 420 und 550 nm aufgenommen. Gezeigt sind exemplarisch die Emissionsspektren von EPL-Liposomen nach Inkubation mit 0 (schwarz) und 16 mM (rot) 2-PEtOH. (B) Aus den Fluoreszenzspektren wurde der GP-Wert ermittelt. Dieser nimmt mit steigender 2-PEtOH-Konzentration ab, was eine stetige Abnahme der Lipidordnung in den EPL-Membranen aufzeigt.

Zur Bestätigung, dass 2-PEtOH die Ordnung der EPL-Membranen reduziert, wurden in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz die EPL-Membranen mittels SFG-Spektroskopie untersucht.

Die erhaltenen SFG-Spektren zeigten die charakteristischen Molekülschwingungen der Lipid-Acylketten (Abbildung 26, schwarze Kurve). Die Resonanzen bei 2850 cm^{-1} und 2870 cm^{-1} sind den symmetrischen Streckschwingungen der CH_2 - und CH_3 -Gruppe zuzuordnen, die Resonanz bei 2960 cm^{-1} der asymmetrischen Streckschwingung der CH_3 -Gruppe und bei 2940 cm^{-1} ist die Fermi-Resonanz der CH_3 -Gruppe zu detektieren. Im SFG-Spektrum nach Insertion von 2-PEtOH in die EPL-Monolage war die die Intensität des SFG-Signals niedriger, da die Anzahl der Lipide in der betrachteten Monolage mit 2-PEtOH bei konstantem Oberflächendruck reduziert ist. (Abbildung 26, rote Kurve). Darüber hinaus wurde die Molekülschwingung der aromatischen CH-Gruppen von 2-PEtOH bei 3050 cm^{-1} erfasst. Als Parameter für den Ordnungsgrad in der Monolage wurde das Verhältnis der Intensitäten der symmetrischen Streckschwingungen der CH_3 - und CH_2 -Gruppen ermittelt. Um zu gewährleisten, dass die Änderungen in den Intensitäten der C-H-Signale nur durch Änderungen in der Acylketten-Ordnung entstehen und nicht durch C-H-Schwingungen aus 2-PEtOH, wurden Kontrollexperimente durchgeführt (Abbildung A 7). Diese zeigten, dass die CD_2 -Gruppe des 2-PEtOH-Moleküls SFG-inaktiv ist und somit keine Interferenzen durch 2-PEtOH-Molekülschwingungen zu erwarten waren. Für die reine EPL-Monolage wurde ein $\text{CH}_3\text{-ss}/\text{CH}_2\text{-ss}$ -Verhältnis von 0,39 ermittelt, welches nach Insertion von 2-PEtOH auf 0,50 anstieg. Daher zeigten die SFG-spektroskopischen Messungen, dass die die Ordnung der Acylketten in der EPL-Monolage in Gegenwart von 2-PEtOH erhöht ist.

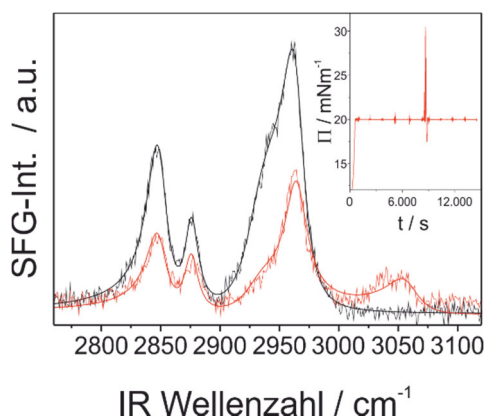


Abbildung 26: SFG-Spektroskopie an EPL-Membranen zur Analyse der Lipidordnung. SFG-Spektren der reinen EPL-Monolage (schwarze Kurve) und in Gegenwart von 16 mM 2-PEtOH (rote Kurve). Der Ausschnitt zeigt, dass während der gesamten Messung der Oberflächendruck konstant 20 mN/m betrug. Die Störung im Signal ist auf die 2-PEtOH-Injektion zurückzuführen. (In Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz).

Die Ergebnisse der SFG-Spektroskopie stehen damit im Widerspruch zu den Ergebnissen der Laurdan-Fluoreszenzspektroskopie, die eine kontinuierliche Abnahme der Lipidordnung in der

Membran aufzeigten. Die SFG-Messungen widersprechen außerdem den bisher in der Literatur beschriebenen Effekten von 2-PEtOH auf Lipidmembranen (53, 195, 196). Für verschiedene Anästhetika wurde bereits diskutiert (197-199) bzw. in Moleküldynamik-Simulationen gezeigt (200), dass diese die laterale Lipidorganisation beeinflussen. Für 2-PEtOH wurde außerdem vorgeschlagen, dass dieses eine Phasenseparation induziert (201). Daher erschien es möglich, dass der Einfluss von 2-PEtOH auf die Lipidordnung lokal verschieden ist und, dass die lokalen Änderungen durch die verwendeten Methoden unterschiedlich sensitiv erfasst wurden. Mittels BAM wurde daher die laterale Lipidorganisation der reinen EPL-Monolage und der Monolage nach Inkubation mit 2-PEtOH untersucht. Die BAM-Messungen erfolgten ebenfalls in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz durchgeführt. In den BAM-Aufnahmen waren signifikante, durch 2-PEtOH induzierte Unterschiede in der lateralen Lipidorganisation zu erkennen. So waren in den reinen EPL-Monolagen kleine Lipiddomänen sichtbar, die für *E. coli*-Lipide bereits beschrieben sind (Abbildung 27A) (202). Diese Domänen bestehen vermutlich aus Lipiden derselben Kopfgruppe, die aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften bevorzugt interagieren (29). Nach Zugabe von 2-PEtOH waren in den BAM-Aufnahmen unterschiedlich strukturierte Bereiche zu erkennen, die auf eine ausgeprägte Phasenseparation der Lipide und die Bildung größerer Lipiddomänen zurückzuführen sind (vgl. Abbildung 27B).

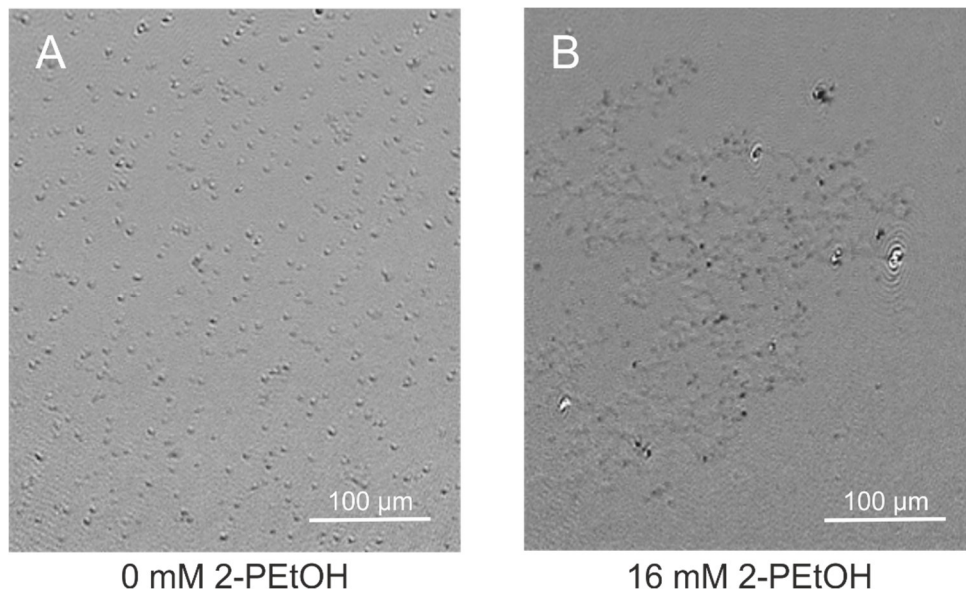


Abbildung 27: Brewster-Winkel-Mikroskopie an EPL-Membranen.

Um den Einfluss von 2-PEtOH auf die Morphologie der EPL-Monolagen zu untersuchen, wurden BAM-Aufnahmen erstellt. Gezeigt sind die BAM-Aufnahmen vor (A) und nach 2-PEtOH-Injektion (B). (In Kooperation (In Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz).

Der Widerspruch zwischen den Ergebnissen der Laurdan-Fluoreszenz- und der SFG-Spektroskopie ist daher wahrscheinlich auf eine durch 2-PEtOH induzierte Phasenseparation der Lipide zurückzuführen. Diese Phasen bzw. Domänen unterscheiden sich in der

Lipidordnung und wurden in den Ergebnissen der SFG- und Laurdan-Fluoreszenzspektroskopie, die einen Mittelwert des gesamten Lipidsystems darstellen, unterschiedlich empfindlich erfasst.

3.3.2 Physiologische Bedeutung der durch 2-PEtOH induzierten Lipiddomänen

Um die physiologischen Konsequenzen der 2-PEtOH-abhängigen Phasenseparation auf das Aquaglyceroporin GlpF nachzuvollziehen, wurde zunächst die Verteilung von GlpF in der inneren *E. coli*-Membran mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Als Kontrolle wurde ebenfalls die Verteilung der polytopen *E. coli*-Transmembranproteine NagE und PtsG erfasst. Die fluoreszenzmikroskopischen Messungen erfolgten in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg. Um die Verteilung der Transmembranproteine GlpF, NagE und PtsG *in vivo* zu analysieren, wurden diese mit einem gelb fluoreszierenden Protein (YFP, engl.: *yellow fluorescent protein*) fusioniert.

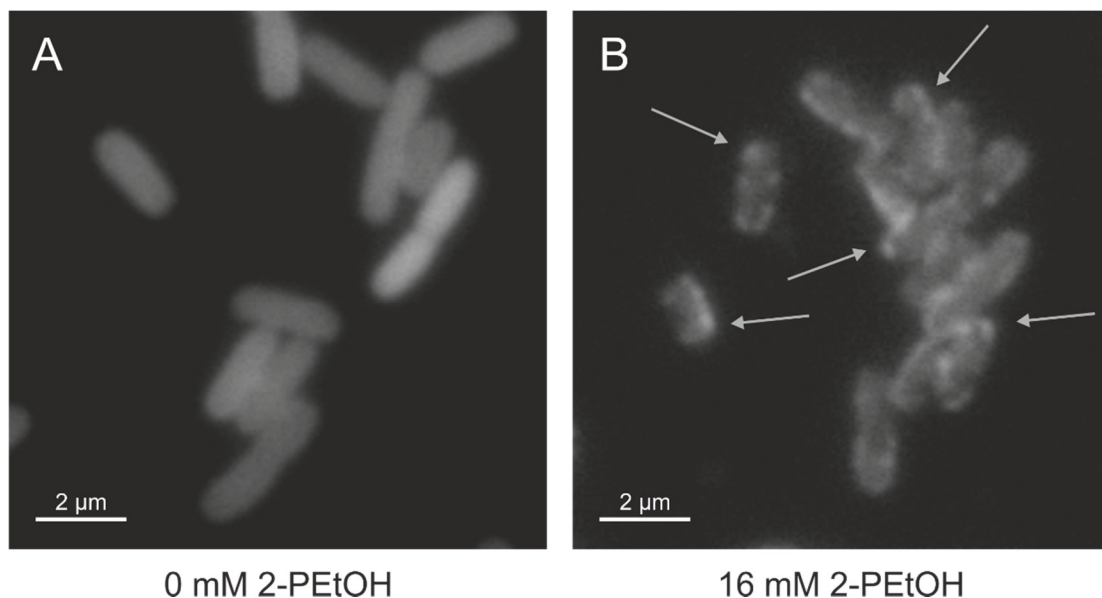


Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopie des Aquaglyceroporins GlpF in An- und Abwesenheit von 2-PEtOH.

GlpF wurde mit dem gelb fluoreszierenden Protein Venus fusioniert und die Verteilung in der inneren *E. coli*-Membran von MG1655-Zellen unter natürlichen Bedingungen (0 mM 2-PEtOH, (A)) und nach Inkubation mit 16 mM 2-PEtOH untersucht (B). Die punktuelle Lokalisation von Venus-GlpF ist durch die Pfeile aufgezeigt. (In Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg).

Während unter natürlichen Bedingungen die untersuchten Transmembranproteine gleichmäßig in der Zelle verteilt waren, wurde in Gegenwart von 16 mM 2-PEtOH eine inhomogene Verteilung der Proteine deutlich (Abbildung 28 und Abbildung A 8).

Nach Inkubation mit 2-PEtOH waren Bereiche auf der Zelloberfläche mit hoher Fluoreszenzintensität zu erkennen, die der Lokalisation des Aquaglyceroporins GlpF entsprechen (vgl. Abbildung 28B). Auch die polytopen *E. coli*-Transmembranproteine NagE

und PtsG zeigten in den Membranen ohne 2-PEtOH eine homogene Verteilung und waren nach Inkubation der Membranen mit 2-PEtOH punktuell in Bereichen hoher Fluoreszenzintensität lokalisiert (vgl. Abbildung A 8). Auffallend ist, dass die Bereiche hoher Fluoreszenzintensität nur einen kleinen Anteil der gesamten Zelloberfläche darstellen. Die Akkumulation der Transmembranproteine nach Inkubation mit 2-PEtOH spiegelt vermutlich die Verteilung der Proteine in den unterschiedlichen Domänen wieder. Nachdem deutlich wurde, dass 2-PEtOH die Verteilung der ausgewählten *E. coli*-Transmembranproteine in den phasenseparierten Membranen signifikant beeinflusst und diese in den Lipiddomänen akkumulieren, wurden zunächst die Auswirkungen auf die Oligomerisierung von GlpF mittels des GALLEX-Systems untersucht (125, 158).

Für die GALLEX-Messungen wurde das LexA-GlpF-Fusionsprotein in SU101-Zellen exprimiert und die Proteinexpression nach Erreichen einer OD_{600} von 0,6 mit IPTG induziert und für 1 h mit steigenden 2-PEtOH-Konzentrationen inkubiert. Die GALLEX-Messungen zeigten eine steigende GlpF-Interaktionstendenz mit zunehmender 2-PEtOH-Konzentration (vgl. Abbildung 29).

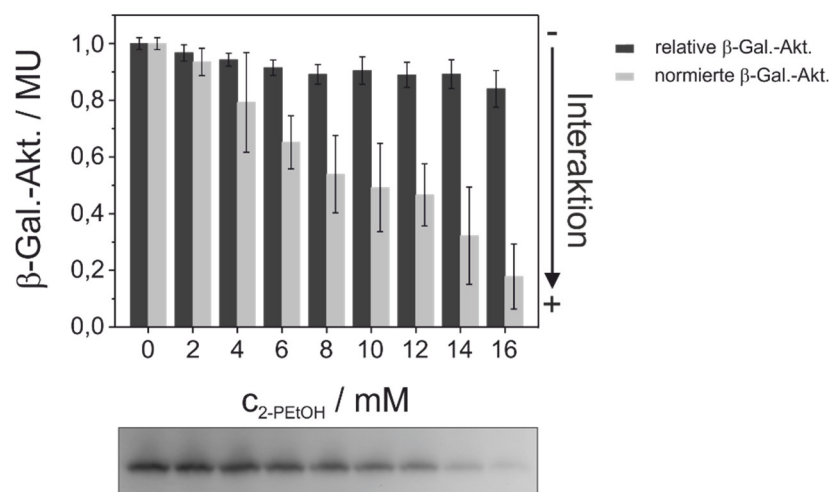


Abbildung 29: *In vivo* Oligomerisierung von GlpF bei steigenden 2-PEtOH-Konzentrationen.

Die Interaktionstendenz von GlpF wurde mittels des GALLEX-Systems erfasst ($n = 9 \pm \text{SE}$). Die gemessenen Interaktionen wurden auf die Interaktionstendenz bei einer 2-PEtOH-Konzentration von 0 mM bezogen (relative β -Gal.-Akt., schwarze Balken). Die Western Blot-Analyse zeigte, dass das Expressionsniveau kontinuierlich mit der 2-PEtOH-Konzentration abnahm. Daher wurden die relativen β -Gal.-Akt. auf die relative Menge an GlpF in der *E. coli*-Membran normiert (normierte β -Gal.-Akt., graue Balken).

Obwohl der Unterschied in der Interaktionstendenz schon ab 6 mM 2-PEtOH signifikant war, war die Zunahme der Interaktionstendenz um etwa 15% nach Inkubation mit 16 mM 2-PEtOH moderat (Abbildung 29, schwarze Balken). Die Western Blot-Analyse zeigte jedoch, dass das Expressionsniveau durch die steigenden 2-PEtOH-Konzentrationen deutlich verringert ist (Abbildung 29, unterer Teil). Unter Berücksichtigung des reduzierten Expressionsniveaus wurde die normierte β -Gal.-Akt. ermittelt und ein deutlicher Effekt der 2-PEtOH-abhängigen

Phasenseparation der Lipide auf die Oligomerisierung von GlpF ersichtlich (Abbildung 29, graue Balken). So war die Interaktionstendenz von GlpF nach Inkubation mit 16 mM 2-PEtOH um etwa 80% erhöht. Die Zunahme der GlpF-Interaktion basiert vermutlich auf der 2-PEtOH-abhängigen Akkumulation von GlpF in den Lipiddomänen (Abbildung 28).

Abschließend wurde der Einfluss der 2-PEtOH-abhängigen Umverteilung von GlpF in der Membran und der erhöhten *in vivo* Interaktionstendenz auf die Aktivität von GlpF untersucht. Um die Aktivität von GlpF bei steigenden 2-PEtOH-Konzentrationen zu analysieren, wurden GlpF exprimierende SK46-Zellen aus einer Kultur mit einer hypertonischen Ribitollösung und steigenden 2-PEtOH-Konzentrationen am *Stopped-Flow*-UV/VIS-Spektrometer gemischt und die Lichtstreuung im 90° Winkel verfolgt. Der für GlpF charakteristische Abfall der Streulichtkurven zeigte einen deutlich beeinträchtigten Ribitoffluss in Gegenwart steigender 2-PEtOH-Konzentrationen (Abbildung 30A).

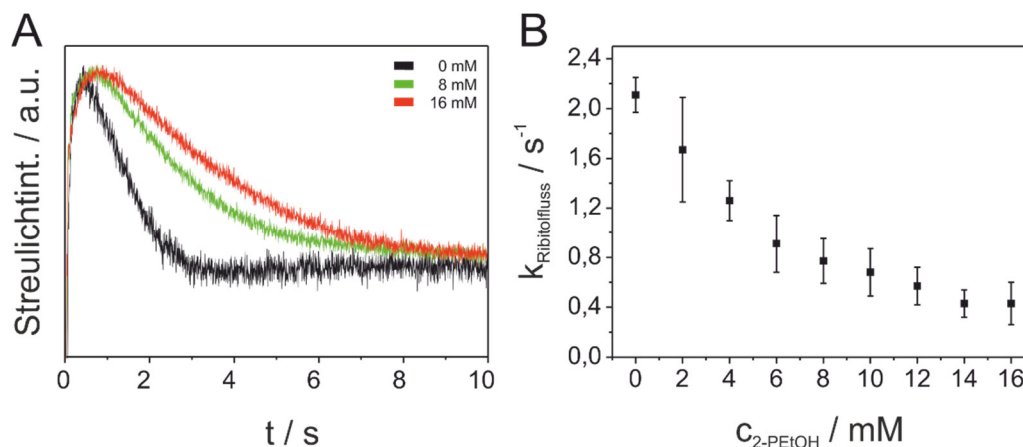


Abbildung 30: GlpF-Aktivität in der inneren *E. coli*-Membran bei steigenden 2-PEtOH-Konzentrationen.

(A) Repräsentative Streulichtkurven des GlpF vermittelten Ribitofflusses bei 0 mM (schwarz), 8 mM (grün) und 16 mM (rot) 2-PEtOH. (B). Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten des GlpF-vermittelten Ribitofflusses gegen die 2-PEtOH-Konzentration zeigt eine kontinuierliche Abnahme der GlpF-Aktivität mit steigenden 2-PEtOH-Konzentrationen ($n = 4 \pm \text{SD}$).

Mittels einer einfach exponentiellen Zerfallsfunktion wurden die Geschwindigkeitskonstanten des GlpF-vermittelten Ribitofflusses bestimmt und gegen die 2-PEtOH-Konzentration aufgetragen (Abbildung 30B). So zeigte sich, wie bereits in den Streulichtkurven zu erkennen war, dass die GlpF-Aktivität in Gegenwart steigender 2-PEtOH-Konzentrationen konstant abnahm. Ab einer 2-PEtOH-Konzentration von etwa 8 mM waren die Änderungen in der GlpF-Aktivität kleiner. Interferenzen, aufgrund einer parallel verlaufenden 2-PEtOH Membraninsertion, konnten ausgeschlossen werden, da die Membraninsertion von 2-PEtOH unter 1 ms erfolgt, was der Totzeit des *Stopped-Flow*-UV/VIS-Spektrometers entspricht (Abbildung A 9).

Im Rahmen der Untersuchungen zu dem Einfluss 2-PEtOH induzierter Veränderungen der physikochemischen Membraneigenschaften auf die Oligomerisierung und Aktivität von GlpF wurde deutlich, dass das Anästhetikum 2-PEtOH eine Phasenseparation in EPL-Membranen bewirkt. Es entstehen Lipiddomänen, die sich im Ordnungsgrad der Acylketten unterscheiden. *In vivo* führte diese Phasenseparation zur Akkumulation der polytopen *E. coli*-Transmembranproteine GlpF, NagE sowie PtsG und zu einer erhöhten Oligomerisierungstendenz sowie eingeschränkter Aktivität des GlpF-Wildtyps.

3.4 GlpF als Modell für humane Aquaporine: Einfluss einer Punktmutation auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF

Zahlreiche genetische Variationen in humanen Aquaporinen sind bis heute identifiziert, die teilweise mit Erkrankungen wie NDI und Katarakten in Verbindung stehen. Häufig sind jedoch die Auswirkungen dieser Mutationen auf die Proteinstruktur und -funktion noch nicht charakterisiert und daher noch nicht verstanden (203). Die Sequenzidentität zwischen GlpF und den humanen Aquaporinen variiert zwischen 18 und 35% und ist vor allem in den Bereichen der beiden NPA-Motive höher (121, 204). Auch die Konservierung der Aquaporin Tertiär- und Quartärstruktur ist bemerkenswert (134, 205). Aufgrund dessen erscheint es möglich, natürlich in humanen Aquaporinen vorkommende Mutationen auf das homologe, bakterielle Aquaglyceroporin GlpF zu übertragen und den Einfluss der Mutationen auf die Aktivität und Oligomerisierung zu analysieren. Auf diese Weise können Informationen über zugrunde liegende Krankheitsmechanismen erhalten werden. Im Folgenden soll die Auswirkung der natürlich in AQP2 vorkommenden Punktmutation V71M auf die Aquaporin-Oligomerisierung und -Funktion untersucht werden. Die Vererbung der Substitution des Guanins durch Adenosin an Position 211 im *AQP2*-Gen erfolgt autosomal, rezessiv (102) und bewirkt in AQP2 den Austausch von Valin durch Methionin in Halbhelix 3 unmittelbar neben dem ersten NPA-Motiv. Homozygote Träger dieser Mutation erkranken an rezessiven NDI.

3.4.1 Strukturelle Voraussetzungen

Voraussetzung der Untersuchung natürlich in humanen Aquaporinen vorkommender Mutationen am homologen, bakteriellen Aquaglyceroporin GlpF, ist die Konservierung der mutierten Aminosäuren zwischen GlpF und mindestens dem betroffenen humanen Aquaporin. Um den Grad der Konservierung der AQP2 Mutation V71M zwischen GlpF und den anderen humanen Aquaporinen zu bestimmen, wurde ein Sequenzvergleich mittels des Programms ClustalW2 durchgeführt (Abbildung 31).

Der Sequenzvergleich zwischen Teilen der Schleife B und der Halbhelix 3 zeigte, dass Valin an Position 71 nicht nur zwischen GlpF und AQP2 konserviert ist, sondern insgesamt in neun Aquaporinen zu finden ist. In den Aquaporinen AQP5 und AQP10 ist Valin durch eine hydrophobe Aminosäure substituiert. So kommt es in AQP5 zu einem konservativen Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin und in AQP10 zu einem nicht-konservativen Austausch durch die größere, hydrophobe Aminosäure Phenylalanin. Insgesamt ist die Primärsequenz der Aquaporine im Bereich der Punktmutation hochkonserviert. Mutationen in diesem Bereich könnten daher besonders kritisch für die Aquaporin-Funktion sein.

	Halbhelix 3	
GlpF	SGAHLNPAVTIALWLF	78
AQP0	SGAHVNPAVTFAFLVG	78
AQP1	SGAHLNPAVTLGLLLS	86
AQP2	SGAHINPAVTVACLVG	78
AQP3	SGAHLNPAVTFAMCFL	93
AQP4	SGGHINPAVTVAMVCT	107
AQP5	SGGHINPAITLALLVG	79
AQP6	SGAHANPAVTLAFLVG	92
AQP7	SGAHMNAAVTFANCAL	104
AQP8	SGGHFNPAVSLAAML I	102
AQP9	SGGHINPAVSLAMCLF	94
AQP10	SGAHLNPAFSLAMCIV	92
	**:* *.*.:.:	

Abbildung 31. Sequenzvergleich zwischen GlpF und den humanen Aquaporinen.

Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW2 erstellt (161, 162). Nicht berücksichtigt beim Vergleich der Sequenzen wurden die unorthodoxen Aquaporine AQP11 und AQP12. Das hochkonservierte NPA-Motiv ist rot hinterlegt und das in AQP2 an Position 71 mutierte Valin blau, sofern dieses konserviert ist. Ein Punkt markiert konservierte Aminosäurereste, zwei Punkte hochkonservierte und ein Stern hebt identische Aminosäurereste hervor. Die Sequenzen wurden der UniProtKB/TrEMBL Datenbank entnommen (206).

Da sowohl für GlpF als auch AQP2 Kristallstrukturen zur Verfügung stehen (116, 207), konnten neben dem Sequenzvergleich auch durch Überlagerung der Kristallstrukturen die GlpF- und AQP2-Tertiärstruktur verglichen werden.

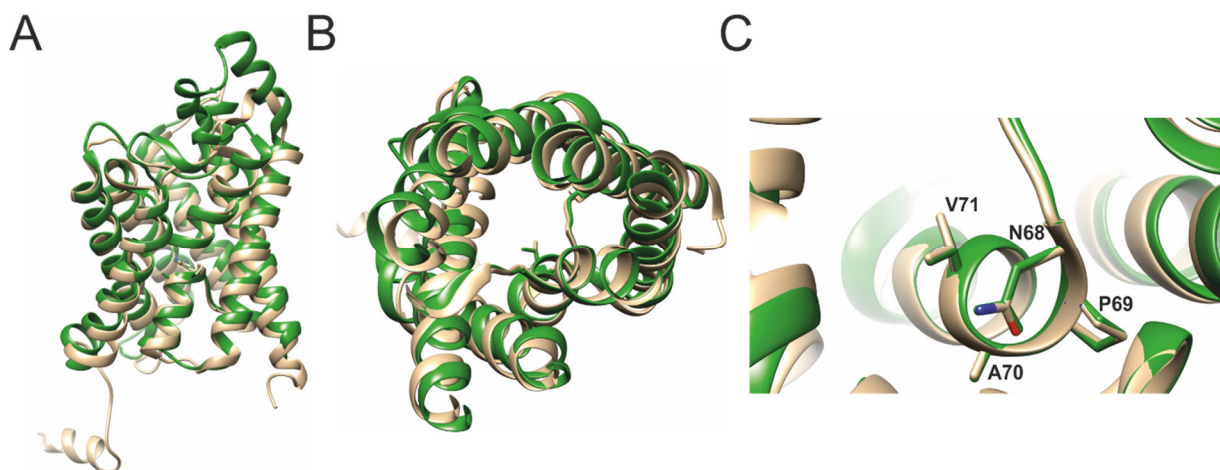


Abbildung 32: Strukturvergleich zwischen GlpF und humanem AQP2.

Die Überlagerung der Strukturen von GlpF (grün) und AQP2 (beige) verdeutlicht die hohe Konservierung der Aquaporin-Tertiärstruktur. Die strukturellen Diskrepanzen sind in den Schleifenregionen am größten, die allgemeine Orientierung der einzelnen Transmembranhelices dagegen ist konserviert. (A) Überlagerung der GlpF- und AQP2-Monomere aus seitlicher Perspektive. (B) Aufsicht auf die Translokationspore. Zur besseren Übersicht sind die periplasmatischen/extrazellulären Schleifenregionen nicht gezeigt. (C) Detailansicht der Strukturen im Bereich des ersten NPA-Motivs. Der Strukturvergleich wurde mit dem Programm Chimera durchgeführt (159). (PDB-ID: 1FX8 und 4NEF).

Der Strukturvergleich durch Überlagerung der Kristallstrukturen zeigte die hohe Konservierung der Aquaporin-Tertiärstruktur (Abbildung 32A). Insbesondere die Orientierung der Transmembranhelices ist zwischen GlpF und AQP2 sehr ähnlich, während in den Schleifenregionen größere Unterschiede existieren. Die Aufsicht auf die Translokationspore verdeutlichte, dass die Seitenkette der natürlich in AQP2 mutierten Aminosäure V71 in beiden Proteinen in die Pore zeigt (Abbildung 32B). Die hohe strukturelle Konservierung der einzelnen Aminosäuren im Bereich der Mutation wurde auch in der Detailansicht von Halbhelix 3 deutlich (Abbildung 32C).

3.4.2 Die *in vivo* Assemblierung der GlpF-Mutante V71M ist nicht beeinträchtigt

Da die Assemblierung von monomeren Aquaporinen zu tetrameren Strukturen in der Membran bedeutend für die Proteinaktivität ist (125), wurde zunächst der Einfluss der Punktmutation V71M auf die Oligomerisierung von gereinigtem GlpF mittels einer semi-nativen SDS-PAGE-Analyse *in vitro* untersucht (Abbildung 33A), in welcher der natürliche GlpF-Oligomerisierungsgrad erhalten bleibt (vgl. Abschnitt 3.1.4). Zum Vergleich wurde in der *in vitro* Analyse zusätzlich die gut charakterisierte GlpF-Mutante E43A berücksichtigt, die sowohl eine reduzierte Interaktionsfähigkeit als auch eine niedrigere Aktivität als der GlpF-Wildtyp aufweist. Wie aus Abbildung 33A hervorgeht, lag der GlpF-Wildtyp in der SDS-PAGE-Analyse als stabiles Tetramer vor, während die Mutante E43A hauptsächlich als Monomer mit leichter Tendenz zur Dimerbildung detektiert wurde. Auch die Mutante V71M lag in der SDS-PAGE-Analyse primär als monomeres Protein vor, jedoch war auch tetrameres GlpF zu erkennen. Daher scheint die Mutante V71M im Gegensatz zu GlpF-E43A grundsätzlich tetramere Strukturen ausbilden zu können. Die tetrameren Komplexe scheinen jedoch im Vergleich zum Wildtyp in der Detergenzmizelle destabilisiert zu sein. Um die Oligomerisierung der Mutante V71M auch *in vivo*, in einer Lipidmembran zu untersuchen, wurde das GALLEX-System angewandt (125). Hierzu wurde die Expression der LexA-GlpF-Fusionsproteine in SU101-Zellen durch steigende IPTG-Konzentrationen induziert und die β -Gal.-Akt. ermittelt. Um eventuelle Unterschiede im Expressionsniveau des Wildtyps und der Mutante V71M bei der Auswertung der Interaktionstendenzen zu berücksichtigen, wurden aus NT326-Zellen Membranen isoliert und mittels einer Western Blot-Analyse vorhandenes LexA-GlpF immunochemisch detektiert (Abbildung 33B und Abbildung A 10). Zur quantitativen Bestimmung der Proteinbandenintensitäten im Western Blot wurden diese mittels des Programms ImageJ grafisch erfasst und die Proteinbandenintensitäten durch Integration der Peakfläche bestimmt. Auf diese Weise zeigte sich, dass das Expressionsniveau bis zu einer Induktion der Proteinexpression mit 500 μ M IPTG kontinuierlich gesteigert werden konnte. Darüber hinaus wurde deutlich, dass das Expressionsniveau der Mutante V71M im Vergleich zum GlpF-Wildtyp etwa um 30% verringert ist (vgl. Abbildung A 10). Unter Berücksichtigung

des reduzierten Expressionsniveaus der Mutante V71M ist die Interaktionstendenz der Mutante V71M in der natürlichen Lipidmembran höher als die des Wildtyps. So ist die Kurve in der Auftragung der β -Gal.-Akt. gegen die tatsächliche Proteinkonzentration in der Membran nach links verschoben (Abbildung 33C). Die Mutante V71M erreichte demnach bereits bei niedrigeren effektiven Proteinkonzentrationen das Interaktionsniveau des GlpF-Wildtyps. Die Ergebnisse aus den GALLEX-Messungen erlauben es nicht, zwischen verschiedenen Oligomerisierungsgraden zu differenzieren. So könnte, die starke Interaktion der Mutante V71M auch auf eine Dimerbildung zurückzuführen sein. Da in der SDS-PAGE-Analyse der gereinigten Mutante V71M jedoch kein dimeres sondern tetrameres GlpF zu erkennen war, ist nicht zu erwarten, dass das GALLEX-Signal auf der Bildung von dimeren GlpF basiert. Damit scheint die Oligomerisierungstendenz der Mutante V71M *in vivo* nicht eingeschränkt zu sein. Die Destabilisierung gegenüber der Entfaltung mit SDS ist möglicherweise nur unter *in vitro* Bedingungen relevant.

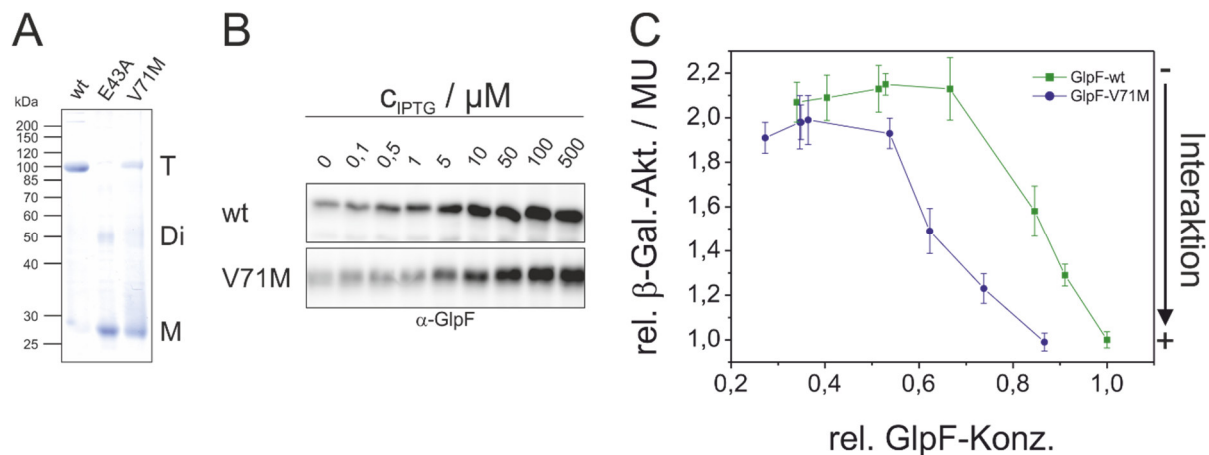


Abbildung 33: Oligomerisierungsverhalten des GlpF-Wildtyps und von GlpF-V71M *in vitro* und *in vivo*.

(A) Semi-native SDS-PAGE-Analyse des gereinigten GlpF-Wildtyps sowie der GlpF-Mutanten E43A und V71M. (T: Tetramer, Di: Dimer; M: Monomer). (B) Western Blot-Analyse zur Überprüfung und Quantifizierung des Expressionsniveaus des GlpF-Wildtyps und der GlpF-Mutante V71M in der *E. coli*-Membran. (C) Mittels des GALLEX-Systems wurde das Oligomerisierungsverhalten des GlpF-Wildtyps und der Mutante V71M *in vivo* analysiert ($n = 6 \pm \text{SE}$). Dargestellt ist die Oligomerisierungstendenz des GlpF-Wildtyps (grün) und der Mutante V71M (blau) in Abhängigkeit der Proteinkonzentration bezogen auf das Expressionsniveau des GlpF-Wildtyps nach Induktion der Proteinexpression mit 500 μM IPTG. (In Zusammenarbeit mit).

3.4.3 Die Mutation V71M beeinflusst die GlpF-Funktion nicht

Um den Einfluss der Punktmutation V71M auf die Proteinaktivität zu untersuchen, wurden der GlpF-Wildtyp und die GlpF-Mutante V71M in SK46-Zellen bei steigenden IPTG-Konzentrationen exprimiert und die Aktivität durch Messen der Ribitolleitfähigkeit an einem *Stopped-Flow*-UV/Vis-Spektrometer erfasst. Die erhaltenen Streulichtkurven zeigten einen gleichermaßen steilen Anstieg sowie einen ähnlich verlaufenden Abfall der Streulichtintensität für den GlpF-Wildtyp und die Mutante V71M. Um die Geschwindigkeitskonstanten des

Ribitofflusses zu ermitteln, wurde der GlpF charakteristische Abfall der Streulichtintensität mit einer einfach exponentiellen Zerfallsfunktion approximiert. Auch das Expressionsniveau des Wildtyps und der Mutante V71M in SK46-Zellen wurde mittels einer Western Blot-Analyse untersucht, um Unterschiede in der Analyse der Geschwindigkeitskonstanten zu berücksichtigen (Abbildung 34A und Abbildung A 11). Die Proteinbandenintensitäten wurden wie für die Expressionskontrolle der GALLEX-Messungen beschrieben durch Integration der Peakflächen mittels ImageJ bestimmt (vgl. 3.4.2). So war das Expressionsniveau der GlpF-Mutante V71M im Vergleich zum GlpF-Wildtyp um etwa 30% reduziert und konnte durch Induktion mit bis zu 500 μM IPTG kontinuierlich gesteigert werden. Um die Kinetik der GlpF-vermittelten Reaktion in Abhängigkeit der tatsächlich vorhandenen GlpF-Menge zu betrachten, wurden die Geschwindigkeitskonstanten gegen die in der Western Blot-Analyse ermittelten relativen GlpF-Konzentrationen aufgetragen (Abbildung 34B). Diese Auftragung zeigt, dass bei gleichen Proteinkonzentrationen etwa gleiche Geschwindigkeitskonstanten für den durch den GlpF-Wildtyp und die Mutante V71M vermittelten Ribitoffluss erreicht wurden. Es sind daher keine Unterschiede in der Aktivität des Wildtyps und der Mutante V71M zu erkennen.

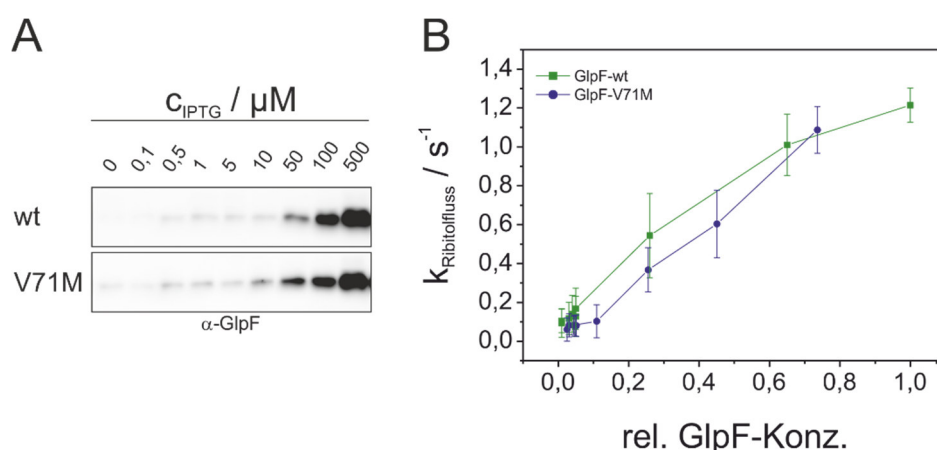


Abbildung 34: Funktion der GlpF-Mutante V71M.

(A) Western Blot-Analyse zur Überpfügung und Quantifizierung des Expressionsniveaus des GlpF-Wildtyps und der GlpF-Mutante V71M in der *E. coli*-Membran. (B) Kinetik des Ribitofflusses des GlpF-Wildtyps (grün) und der Mutante V71M (blau) in Abhängigkeit der Proteinkonzentration ($n = 5 \pm \text{SD}$). Die relative Proteinkonzentration wurde in Western Blot-Analysen ermittelt und ist auf das Expressionsniveau des GlpF-Wildtyps bei 500 μM IPTG normiert. (In Zusammenarbeit mit erstellt).

Sowohl der Aminosäuresequenzvergleich als auch der Vergleich der GlpF- und AQP2-Tertiärstrukturen verdeutlichten eine hohe Konservierung des an Position 71 im humanen AQP2 durch Methionin substituierten Valins. Die Untersuchungen der Konsequenzen der Mutation V71M auf die Oligomerisierung und Aktivität am homologen, bakteriellen Aquaglyceroporin GlpF zeigten *in vivo* eine erhöhte Oligomerisierungstendenz der GlpF-Mutante V71M sowie eine unveränderte Aktivität dieser Mutante.



4 Diskussion

4.1 Funktion und Oligomerisierung fusionierter GlpF-Monomere

Aquaporine liegen in biologischen Membranen als Homotetramere vor (116-118). Als Triebkraft dieser Oligomerisierung werden eine erhöhte Proteinstabilität sowie -funktion vermutet (125). Um weitere Aspekte der Oligomerisierung zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit fusionierte GlpF-Homooligomere sowie fusionierte GlpF-Tetramere mit einem steigenden Anteil mutierter GlpF-Monomeren mit eingeschränktem Translokationsmechanismus erstellt und die Funktion der Fusionsproteine untersucht. Es zeigte sich eine gesteigerte Funktion der GlpF-Fusionsproteine mit steigendem Fusionsgrad. Ferner wurde deutlich, dass mehr als zwei mutierte monomere Einheiten (GlpF-E43A) nötig waren, um eine drastische Inaktivierung des fusionierten Tetramers zu erzeugen.

4.1.1 Fusionierte GlpF-Homooligomere bilden Tetramere aus

Ein entscheidender Aspekt der fusionierten GlpF-Homooligomere ist die Tendenz dieser, intermolekulare Homointeraktionen auszubilden. Diese Wechselwirkungen sind grundlegend für die Bildung von Tetrameren, die dem nativen Oligomerisierungsgrad der Aquaporine entsprechen. Homointeraktionen wurden mittels des GALLEX-Systems für alle untersuchten fusionierten GlpF-Konstrukte festgestellt. Auch für das fusionierte GlpF-Tetramer wurden intermolekulare Interaktionen gezeigt, obwohl dieses Funktionskonstrukt aus hinreichend Monomeren besteht, um durch intramolekulare Wechselwirkungen zu tetrameren Einheiten zu assemblieren. Die gemessenen Interaktionen könnten daher Wechselwirkungen zwischen bereits assemblierten GlpF-Tetrameren darstellen. Eine Assemblierung von Aquaporin-Tetrameren zu höheren oligomeren Strukturen ist zwar für AQP0 und AQP4 beschrieben, diese ist jedoch für die genannten Aquaporine spezifisch. So existieren Wechselwirkungen von AQP0-Tetrameren zwischen gegenüberliegenden Zellen, um enge Zell-Zellkontakten zu gewährleisten (98, 99). Diese werden durch Prolinreste in Schleife A auf der extrazellulären Proteinoberfläche vermittelt. Interaktionen zwischen GlpF-Tetrameren in gegenüberliegenden Zellen könnten nicht mit dem GALLEX-System erfasst werden. Des Weiteren ist für AQP4 die Ausbildung von supramolekularen Komplexen, sogenannten orthogonalen Protein-Arrays, beschrieben in denen bis zu 600 Tetramere interagieren (208-210). Diese Art von Wechselwirkungen könnten zwar mit Hilfe des GALLEX-Systems erfasst werden, jedoch wird die Ausbildung dieser supramolekularen Komplexe durch bestimmte Aminosäuren im Bereich des AQP4-N-Terminus vermittelt und wurde bisher nur für AQP4 beschrieben. Außerdem sind Tetramer-Tetramer-Interaktionen von Aquaporinen, die normalerweise nicht in Form von höheren Aggregaten wie AQP4 vorliegen, energetisch nicht begünstigt (211). Darüber hinaus wurde in AQP0-2D-Kristallen deutlich, dass keine direkten, lateralen Interaktionen zwischen AQP0-Tetrameren existieren (147).

Daher wurden mittels des GALLEX-Experiments vermutlich keine Interaktionen zwischen bereits assemblierten GlpF-Tetrameren erfasst. Es ist anzunehmen, dass die gemessenen Interaktionen auf den spezifischen Wechselwirkungen der Monomere, die grundlegend für die GlpF-Tetramerisierung sind, basieren (Abbildung 35).

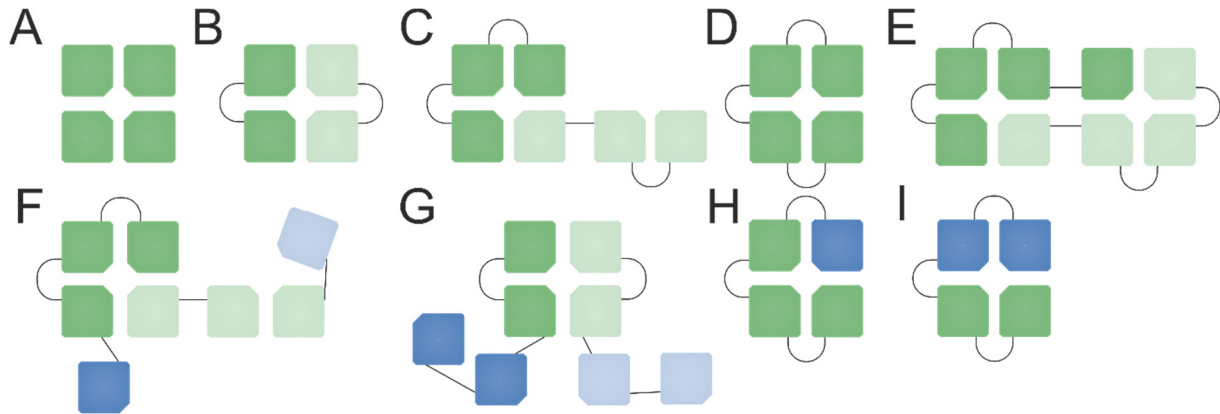


Abbildung 35: Mögliche Interaktionen der fusionierten GlpF-Homooligomere und -Heterotetramere.

Schematische Darstellung der Möglichkeiten der multimeren GlpF-Fusionsproteine, tetramere Strukturen auszubilden. Sowohl die inter- als auch die intramolekularen Wechselwirkungen basieren auf den Monomer-Interaktionsflächen (abgefaste Kante). Die grünen Quadrate stehen für die Wildtyp-Monomere, die blauen für die mutierten Monomere. An intermolekularen Wechselwirkungen beteiligte Fusionsproteine sind durch verschiedene Helligkeitsstufen dargestellt. (A) 1xGlpF. (B) 2xGlpF. (C) 3xGlpF. (D/E) 4xGlpF. (F/H) 3xGlpF-1xGlpF-E43A. (G/I) 2xGlpF-2xGlpF-E43A.

Die Tetramerisierung wird maßgeblich durch Interaktionen der Transmembranhelices 1 und 2 in einem Monomer und der Transmembranhelices 5 und 6 im benachbarten Monomer vermittelt (115, 116, 212). Die Transmembranhelices 2 und 6 sind zu kurz, um die Membran vollständig zu durchspannen und zudem weniger hydrophob als die Helices an der Lipid-Protein-Grenzfläche. Folglich ermöglicht die Interaktion zwischen den GlpF-Homooligomeren die Bildung von tetrameren Strukturen und sättigt einen Teil der Monomer-Interaktionsflächen, um eine energetisch ungünstige Exposition mit der Lipidumgebung zu vermeiden (Abbildung 35). Die Assemblierung des fusionierten GlpF-Dimers zu einem Tetramer konnte auch mittels SDS-PAGE-Analyse bestätigt werden (Abbildung 18B). Darüber hinaus zeigte die SDS-induzierte Entfaltung dieses artifiziellen Tetramers, dass die Tetramerstabilität gegenüber der Entfaltung mit SDS im Vergleich zum GlpF-Wildtyp unverändert bleibt (Abbildung 18C). Demzufolge ist anzunehmen, dass die Monomere in beiden Tetrameren ähnlich assembliert vorliegen und die Interaktionen auf den gleichen Wechselwirkungen beruhen.

An dieser Stelle kann nicht hinreichend geklärt werden, wie viele GlpF-Trimere an der Ausbildung von tetrameren Einheiten beteiligt sind. Die Formation des Tetramers setzt eine bestimmte Orientierung der Monomere voraus, die wahrscheinlich die Bildung von Vielfachen einer Tetramereinheit begrenzt und daher nicht alle Monomere an tetrameren Assemblierungen beteiligt (Abbildung 35C). Dies wurde bereits in Fusionsstudien mit dem

tetrameren Kalium-Kanal KV1.1 (213) sowie dem pentameren mechanosensitivem Kanal MscL (214) postuliert.

Da auch das fusionierte GlpF-Tetramer 4xGlpF eine deutliche Tendenz zur Homointeraktion im GALLEX-Experiment zeigte, ist davon auszugehen, dass Interaktionen zwischen Monomeren aus verschiedenen Fusionskonstrukten möglich sind, obwohl die monomeren Interaktionsflächen intramolekular gesättigt werden könnten (Abbildung 35D/E). Eine Analyse mit Heterotetrameren aus den pflanzlichen Aquaporinen NtAQP1 und NtPIP2;1 lässt jedoch vermuten, dass ein Großteil der tetrameren Fusionskonstrukte intramolekulare Tetramere bilden. So vermittelt das Heterotetramer 2NtAQP1-2NtPIP2;1, das aus zwei wasserleitenden NtPIP2;1- und zwei nichtleitenden NtAQP1-Monomeren besteht, einen Wasserfluss der dem Niveau des NtPIP2;1 Homotetramers entspricht (132). Innerhalb des Heterotetramers werden daher Konformationsänderungen übertragen, die den Wasserfluss auch durch die NtAQP1-Monomere ermöglichen (132). Zudem ist es wahrscheinlich, dass die Monomere eines Fusionskonstrukts durch die erzwungene räumliche Nähe unmittelbar nach der Translation interagieren und zu intramolekularen Tetrameren assemblieren.

Zusammengenommen zeigen die GALLEX-Messungen, dass die fusionierten GlpF-Homooligomere intermolekulare Wechselwirkungen ausbilden, die vermutlich über die Monomer-Interaktionsflächen im Tetramer vermittelt werden. Dabei entstehen Tetramere, die dem nativen Aquaporin-Oligomerisierungsgrad in Membranen entsprechen.

4.1.2 Die kovalente Verknüpfung der GlpF C- und N-Termini erhöht die GlpF-Aktivität

Die Aktivitätsmessungen der fusionierten GlpF-Homooligomere verdeutlichten eine erhöhte Funktion der GlpF-Fusionsproteine mit steigendem Fusionsgrad. So wurden für das fusionierte GlpF-Tetramer 4xGlpF die höchsten Ribitolflussraten ermittelt. Im Vergleich zu diesem betrug der durch das fusionierte GlpF-Trimer und Dimer vermittelte Ribitolfluss 95% bzw. 75%. Der Ribitolfluss durch das nichtfusionierte GlpF-Monomer betrug 40%. Da die fusionierten GlpF-Homooligomere alle zu Tetrameren assemblieren, muss neben der Oligomerisierung ein weiterer Faktor existieren, der die Funktion der fusionierten GlpF-Homooligomere *in vivo* beeinflusst. Die Aquaporin-Termini liegen innerhalb des Tetramers in direkter Nachbarschaft (121). Es wird daher vermutet, dass Interaktionen der Termini zur Stabilität der Tetramere beitragen (115, 215). Darüber hinaus ist für AQP0 beschrieben, dass eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen den AQP0-Termini die AQP0-Konformation maßgeblich beeinflusst (121, 147). So unterbindet die elektrostatische Interaktion zwischen Glu3 und Ser240 durch eine Konformationsänderung im Volllängenprotein die Ausbildung von AQP0-*Junctions*. Es erscheint daher möglich, dass durch die kovalente Verknüpfung der GlpF-Termini die Konformationsfreiheit dieser eingeschränkt wurde und dadurch Interaktionen stabilisiert

werden, welche wichtig für die Stabilität bzw. -Konformation der rigiden Aquaporinpore sein könnten (siehe Abbildung 8 A/B) (216, 217). Eine solche Stabilisierung könnte die sukzessive Zunahme der Aktivität der GlpF-Homooligomere mit dem Grad der Fusion erklären. Die entscheidenden Aminosäurereste der GlpF-Termini konnten in den publizierten GlpF-Kristallstrukturen nicht aufgelöst werden (116, 218). In den Strukturanalysen sind nur die Konformation der Aminosäurereste 6-259 von insgesamt 281 aufgelöst, sodass keine strukturellen Informationen über mögliche Interaktionen der Termini bestehen. Dennoch zeigt sich anhand der Kristallstruktur von GlpF, dass die Flexibilität der Aminosäurereste in den terminalen und extramembranären Bereichen höher ist als im Rest des Proteins (vgl. Abbildung 8). In den Kristallstrukturen verschiedener humaner Aquaporine (AQP0, 1, 2 und 5) ist am C-Terminus zusätzlich eine α -Helix aufgelöst (115, 145, 147, 207). In AQP0 konnten darüber hinaus die fehlenden Aminosäurereste der Termini modelliert werden (147). Hier zeigte sich, dass die AQP0-Termini geordnete Konformationen einnehmen, die ausschlaggebend für Interaktionen der Termini zwischen den jeweiligen Monomeren eines Tetramers sind. Sowohl die α -helikale Struktur am C-Terminus als auch die geordnete Konformation der Termini unterstützen die Annahme, dass eine eingeschränkte Konformationsfreiheit der Aquaporin-Termini wichtige, stabilisierende Interaktionen begünstigt.

4.1.3 Interaktion der GlpF-Monomere im Tetramer

Im Fall der fusionierten GlpF-Tetramere erscheint es möglich, dass die Monomere mit der Mutation E43A nicht an der Bildung von Tetrameren beteiligt sind, da in dieser Mutante Wechselwirkungen an der Monomer-Interaktionsfläche gestört sind (vgl. Abschnitt 20 (126)). So liegt die GlpF-Mutante E43A *in vivo* und *in vitro* hauptsächlich als monomeres Protein vor (vgl. Abbildung 33A) (125). Sollten die mutierten Monomere des Fusionsproteins nicht an der Ausbildung eines Tetramers beteiligt sein, interagieren die wildtypischen Einheiten aus verschiedenen fusionierten Tetrameren und die mutierten Monomere wären in der Peripherie eines solchen Tetramers lokalisiert (Abbildung 35F/G).

Um den Einfluss der mutierten Monomere in den fusionierten Tetrameren zu verstehen, sind Informationen über die Restaktivität des GlpF-Monomers 1xGlpF-E43A wichtig. Da 1xGlpF-E43A nicht in *E. coli* SK46-Zellen exprimiert werden konnte, war die Restaktivität des Monomers 1xGlpF-E43A experimentell nicht erfassbar. Obwohl das GlpF-Monomer 1xGlpF sich nur durch sechs zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus (MGSGLE) vom GlpF-Wildtyp unterscheidet (vgl. Abbildung 14A), ist die Aktivität von 1xGlpF im Vergleich zum GlpF-Wildtyp bereits um 65% reduziert (Abbildung A 4). Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass die verbleibende Restaktivität des GlpF-Monomers 1xGlpF-E43A nicht mehr vom basalen Ribitofluss zu unterscheiden ist. Während die Mutation E43A die Aktivität des GlpF-Wildtyps

nur um etwa 30% reduziert, scheint die Mutation E43A das GlpF-Monomer 1xGlpF nahezu komplett zu inaktivieren.

Ausgehend von der Annahme, dass die mutierten Monomere nahezu inaktiv sind, sind in den GlpF-Heterotetrameren 3xGlpF-1xGlpF-E43A, 2xGlpF-2xGlpF-E43A und 1xGlpF-3xGlpF-E43A 25, 50 bzw. 75% weniger aktive GlpF-Monomere vorhanden. Die gemessenen Aktivitäten waren jedoch im Vergleich zum fusionierten GlpF-Tetramer 4xGlpF nicht um diese Werte reduziert. Für die Heterotetramere 3xGlpF-1xGlpF-E43A und 2xGlpF-2xGlpF-E43A mit 95 bzw. 75% Aktivität ist daher von einem Beitrag der mutierten Monomere zur Gesamtaktivität auszugehen. Vermutlich liegen die Heterotetramere 3xGlpF-1xGlpF-E43A und 2xGlpF-2xGlpF-E43A, wie in Abbildung 35H und I gezeigt, in Form eines intramolekularen Tetramers vor. Interaktionen zwischen den wildtypischen und mutierten GlpF-Monomeren innerhalb des Tetramers erhöhen wahrscheinlich die Aktivität der mutierten Monomere durch die bereits beschriebene Stabilisierung der Aquaporinpore (vgl. 4.1.2.). Demzufolge können bis zu zwei der für die Tetramerisierung wichtigen Glutamatreste (vgl. 1.1.5.1) gegen Alanin ausgetauscht werden, ohne die Ausbildung eines stabilen Tetramers einzuschränken.

Das GlpF-Tetramer 4xGlpF-E43A ist dagegen nahezu inaktiv und das Tetramer 1xGlpF-3xGlpF-E43A weist eine deutlich eingeschränkte Aktivität auf. Für diese Konstrukte wurden bei vergleichbarem Expressionsniveau keine Ribitofflussraten festgestellt, die über den basalen Ribitoffluss hinausgingen. Demnach ist auch der Ribitoffluss durch das verbleibende, wildtypische Monomer im Heterotetramer 1xGlpF-3xGlpF-E43A signifikant reduziert. Lediglich bei erhöhter Proteinkonzentration konnten Ribitofflussraten erreicht werden, die den basalen Ribitoffluss übertrafen. Vermutlich beruht die geringe Restaktivität des Tetramers 1xGlpF-3xGlpF-E43A auf der verringerten Möglichkeit der verbleibenden wildtypischen Monomere zu interagieren. So können keine Interaktionen zwischen Monomeren ausgebildet werden, die wichtig für die Proteinaktivität sind. Daher weist auch die signifikant reduzierte Aktivität des Heterotetramers 1xGlpF-3xGlpF-E43A auf eine Interaktion der Monomere im fusionierten Tetramer hin.

Ähnliche Beobachtungen sind für ein AQP1-Heterodimer, bestehend aus einem wildtypischen und einem durch Mutation (A73M) inaktivierten Monomer (AQP1-AQP1-A73M), beschrieben (128). In diesem Heterodimer ist nicht nur die Assemblierung zum Tetramer verhindert, sondern auch der Wasserfluss durch das funktionale AQP1-Monomer inaktiviert (128). Im Falle von zwei unabhängig fungierenden Monomeren wäre ein uneingeschränkter Wasserfluss durch das wildtypische GlpF bzw. AQP1-Monomer zu detektieren gewesen.

Zusammengenommen weisen die Aktivitätsmessungen mit den GlpF-Heterotetrameren darauf hin, dass auch innerhalb eines fusionierten GlpF-Tetramers nicht jedes Monomer als absolut unabhängiger Kanal fungiert, sondern diese über die Monomeroberflächen interagieren. Dies wird auch dadurch gestützt, dass kein linearer Zusammenhang zwischen

der GlpF-Aktivität und dem Anteil an mutierten Monomeren innerhalb eines fusionierten Tetramers gefunden wurde (Abbildung 16). Diese Interaktionen sind wichtig für die Aktivität der einzelnen Monomere im Tetramer und stellen damit eine Triebkraft der Oligomerisierung dar.

4.2 Einfluss definierter Phospholipide auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF

Die Stabilität und Funktion von integralen Membranproteinen können sowohl durch die Lipidkomposition als auch durch die allgemeinen Membraneigenschaften beeinflusst werden (21, 51, 68, 190). So ist beispielsweise die Tetramerstabilität des Kaliumkanals KcsA von PE-induzierten Änderungen des lateralen Drucks in der Acylkettenregion abhängig (219) und PG für die Ionenleitfähigkeit von KcsA essentiell (220). Aktuell wird diskutiert, dass die Aktivität von Membranproteinen durch die Lipidzusammensetzung in der unmittelbaren Umgebung reguliert werden kann (152). Für das Aquaglyceroporin GlpF wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass sowohl die Tetramerstabilität als auch die Proteinaktivität eine hohe Toleranz gegenüber signifikanten Änderungen in der Lipidumgebung aufweisen. So war GlpF ab einer Membrandicke von 27,0 Å ($d_{C=O-C=O}$) in den für *E. coli*-Membranproteine nicht physiologischen PC-Membranen hoch aktiv. Auch Änderungen des lateralen Drucks in der Acylkettenregion blieben ohne Einfluss auf die Proteinaktivität. Jedoch wurde die Aktivität des polytopen, oligomeren Transmembranproteins GlpF durch anionische Lipide deutlich beeinflusst.

4.2.1 Eine ausreichende Abschirmung der hydrophoben GlpF-Oberfläche ist wichtig für die GlpF-Funktion

Die Dicke der hydrophoben GlpF-Oberfläche wird in der OPM-Datenbank (*Orientations of Proteins in Membranes*) mit $30,1 \pm 0,9$ Å ($d_{C=O-C=O}$) vorhergesagt (221). Während das GlpF-Tetramer in den dünnen diC14:1-PC- und diC16:1-PC-Membranen ($d_{C=O-C=O}$: 20,0 bzw. 23,5 Å) destabilisiert und inaktiv war, wurde in den diC18:1-PC und diC20:1-PC-Membranen ($d_{C=O-C=O}$: 27,0 bzw. 30,5 Å) eine hohe Stabilität des GlpF-Tetramers deutlich. Obwohl in den diC22:1-Membranen eine leichte Destabilisierung des GlpF-Tetramers detektiert wurde, nahm die GlpF-Aktivität in den diC18:1-PC bis diC22:1-PC-Membranen kontinuierlich zu (vgl. Abbildung 20C). Für die GlpF-Tetramerisierung scheint daher die Dicke des hydrophoben Membrankerns kritisch zu sein. Die chemische Struktur der Lipidkopfgruppen hatte dagegen nahezu keinen Einfluss auf diese. Um die Aktivität von GlpF zu gewährleisten, muss möglicherweise die hydrophobe GlpF-Oberfläche ausreichend durch hydrophobe Acylketten zur Stabilisierung der rigiden Aquaporinstruktur abgeschirmt sein (vgl. Abbildung 8). Die Acylketten der Lipide diC14:1-PC und diC16:1-PC sind für die Abschirmung der hydrophoben GlpF-Oberfläche offensichtlich zu kurz.

Die Dicke des hydrophoben *E. coli*-Membrankerns beträgt $37,5 \pm 0,5$ Å (d_{P-P}) (222), was in etwa einem Abstand von 27,5 Å zwischen den Carbonylgruppen der Lipide in den beiden Membranhälften entspricht ($d_{C=O-C=O}$). Die Dicke der natürlichen *E. coli*-Membran scheint daher optimal zu sein, um die GlpF-Tetramerstabilität und Aktivität zu gewährleisten. Obwohl der GlpF-Tetrameranteil in den diC22:1-Membranen leicht verringert war (Tetrameranteil 65%, vgl.

Abbildung A 5), wurde in den diC20:1-PC- und diC22:1-PC-Membranen mit größeren Abständen als 27,0 Å zwischen den Carbonylgruppen eine weitere Zunahme der GlpF-Aktivität festgestellt. Allgemein ist für Aquaporine beschrieben, dass diese die Dicke der Lipidmembran in der unmittelbaren Umgebung bestimmen. So ermöglichen Furchen auf der Aquaporin-Oberfläche die Anpassung von Lipiden unterschiedlichster Länge und Sättigung an die Proteinoberfläche (146, 147). Wahrscheinlich passen sich die PC-Lipide steigender Acylkettenlänge unterschiedlich an die rigide GlpF-Oberfläche an, um eine hydrophobe Diskrepanz zwischen der hydrophoben Proteinoberfläche und der Membran zu vermeiden (143). Dabei nehmen diese verschiedene Konformationen an der Protein-Lipid-Grenzfläche ein, die wiederum die Proteinaktivität beeinflussen.

Mit steigender Acylkettenlänge verändert sich jedoch nicht nur die Membrandicke. So nimmt mit zunehmender Acylkettenlänge die Membranfluidität ab (191) und die Biegesteifigkeit der Membran (k_c) zu (223-225). Letztere stellt den Energiebedarf für Fluktuationen der Lipide aus der Membranebene heraus dar. Aufgrund der Proportionalität der Biegesteifigkeit zum Quadrat der Membrandicke ist diese besonders in dünnen Membranen von Bedeutung. Ein simultaner Einfluss der veränderten Membranfluidität und Biegesteifigkeit auf die Oligomerisierung und Funktion von GlpF kann nicht ausgeschlossen werden.

4.2.2 Änderungen des lateralen Drucks in der Acylkettenregion beeinflussen die rigide GlpF-Tetramerstruktur und -Aktivität nicht

Der Einfluss des lateralen Drucks auf die GlpF-Aktivität wurde bereits in Moleküldynamik-Simulationen untersucht. In diesen Studien zeigte sich, dass GlpF in POPE-Membranen aktiver ist als in POPC-Membranen (148, 149). Die Aktivitätsunterschiede wurden auf Änderungen im Radius des GlpF-Glycerolkanals, der in POPE-Membran 10% kleiner war als in den POPC-Membranen, zurückgeführt. So scheint die sukzessive Auflösung und Neubildung von Wasserstoffbrückenbindungen während der Passage eines Glycerolmoleküls in einem Kanal mit vergrößertem Porendurchmesser weniger stringent zu sein. Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Studien konnten die gesteigerte GlpF-Aktivität in Membranen mit erhöhtem lateralem Druck in der Acylkettenregion nicht bestätigen.

Während GlpF in den Simulationen in eine POPE-Membran, bestehend aus einer gesättigten (C16:0) und einer ungesättigten Acylkette (C18:1), inkorporiert wurde, wurde GlpF in dieser Arbeit in diC18:1-PE-Membranen mit zwei ungesättigten Acylketten (C18:1) rekonstituiert. Obwohl die Übergangstemperatur von der lamellaren, kristallinen Phase in die invertierte, hexagonale Phase (H_{II}) von Lipiden mit kürzeren und gesättigten Acylketten erhöht ist (226), steigern sowohl POPE als auch diC18:1-PE bei Inkorporation in eine Lipiddoppelschicht den lateralen Druck in der Acylkettenregion (spontane Krümmung (J_0)) diC18:1-PE: -0,399 und POPE: -0,316) (16). Demzufolge kann die Verwendung von POPE in den Simulationen und

der Einsatz von diC18:1-PE in den *in vitro* Analysen dieser Arbeit die unterschiedlichen Ergebnisse nicht erklären.

Im Gegensatz zu den Simulationen wurde in dieser Arbeit deutlich, dass steigende PE-Stoffmengenanteile die Funktion des GlpF-Kanals nicht beeinflussen und daher die GlpF-Aktivität resistent gegenüber Änderungen des lateralen Drucks in der Acylkettenregion ist. Die durch 2-PEtOH signifikant reduzierte Aktivität von GlpF (vgl. 3.3.2) kann daher nicht auf eine 2-PEtOH abhängige Erhöhung des lateralen Drucks in der Membran zurückgeführt werden (vgl. 4.3.1.1). Im Allgemeinen wird die Tetramerstruktur der Aquaporine als rigide beschrieben (vgl. Abbildung 8) (216). Diese Rigidität scheint wichtig für die Stabilisierung der Translokationspore zu sein. Des Weiteren sind keine wesentlichen, strukturellen Änderungen zur Aktivierung der Aquaporine notwendig. Beide Aspekte können dazu beitragen, dass die Aquaporin-Funktion nicht durch Änderungen des lateralen Drucks in der Acylkettenregion beeinflusst wird (74).

Die Resistenz von GlpF gegenüber Änderungen des lateralen Drucks verdeutlicht nochmals, wie unempfindlich die GlpF-Oligomerisierung und -Aktivität gegenüber wesentlichen Änderungen in der Lipidumgebung sind. Diese Beobachtung deutet auf eine hohe strukturelle Stabilität von GlpF hin, und wurde ähnlich bereits für AQP0 beschrieben (227).

4.2.3 Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen anionischen Lipiden und basischen GlpF-Aminosäuren inaktivieren den Glycerolkanal

Während die Erhöhung des lateralen Drucks in der Acylkettenregion die GlpF-Funktion nicht beeinflusste, war die Aktivität von GlpF hoch sensitiv gegenüber Änderungen der negativen Ladungsdichte in der umgebenden Lipidmembran (vgl. Abbildung 22C/F und Abbildung 23C). Obwohl niedrige PG- bzw. CL-Stoffmengenanteile in den Membranen die GlpF-Aktivität leicht erhöhten, führte die weitere Steigerung des jeweiligen Stoffmengenanteils zu drastisch reduzierten Ribitolflussraten. Die anionischen Lipide PG und PS stabilisieren die Konformation von Transmembranhelices, die von kationischen Aminosäuren flankiert sind (228). Möglicherweise stabilisieren auch PG bzw. CL eine aktive GlpF-Struktur in einem Lipidsystem, das vorrangig aus PC besteht. Potentiell stabilisierende Effekte der Lipide PG bzw. CL scheinen über die Lipidkopfgruppe vermittelt zu werden, da das nicht natürlich in der *E. coli*-Membran vorkommende PS die GlpF-Aktivität nicht steigerte. Auch für das AqpZ-Tetramer wurde gezeigt, dass dieses durch verschiedene, anionische Lipide unterschiedlich effizient stabilisiert wird (152). Die weitere Erhöhung des Anteils der negativ geladenen Lipide PG, CL bzw. PS in den Membranen führte jedoch unabhängig von der chemischen Struktur der Lipidkopfgruppe zu einer deutlich eingeschränkten GlpF-Aktivität. Vermutlich wurden die potentiell stabilisierenden Effekte der Lipide PG und CL durch die negative Ladung überlagert. Eine direkte Interferenz der negativ geladenen Lipide mit dem Substratfluss ist

unwahrscheinlich, da die unmittelbar am Substratfluss beteiligten Aminosäuren nicht mit den Lipiden in der Membran interagieren (Abbildung 36) (116, 143).

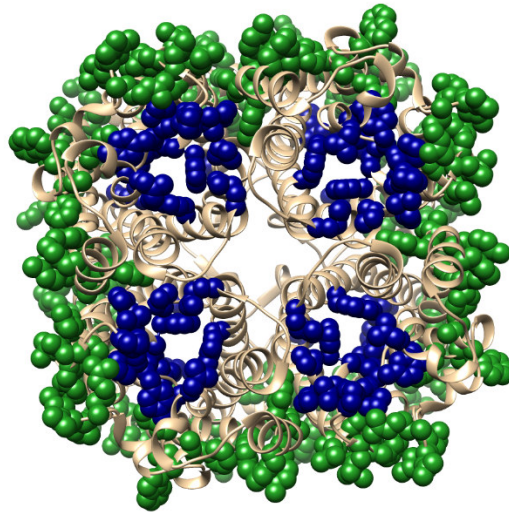


Abbildung 36: Mit Lipiden bzw. Glycerol interagierende GlpF-Aminosäuren.

In der Kristallstruktur des GlpF-Tetramers sind die Aminosäuren, die mit dem passierenden Substrat durch Wasserstoffbrückenbindungen wechselwirken, in blau dargestellt (116). Die Aminosäuren, die basierend auf den Resultaten aus Moleküldynamik-Simulationen mit den umgebenden Lipidkopfgruppen interagieren (143), sind in grün illustriert. (PDB-ID: 1FX8).

In biologischen Membranen wird das Gleichgewicht zwischen anionischen und neutralen Lipiden streng reguliert (229). Ferner sind in Transmembranproteinen positiv geladene Aminosäuren überdurchschnittlich häufig an der Membran-Wasser-Grenzfläche vertreten (230). Elektrostatische Interaktionen zwischen den positiv geladenen Aminosäuren und negativ geladenen Lipiden sind für die Positionierung von Transmembranproteinen in der Membran besonders wichtig und können darüber hinaus die Topologie von integralen Membranproteinen bestimmen (36, 231). In GlpF sind die Transmembranhelices 1, 4 und 8 auf der cytoplasmatischen Seite von den positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin flankiert. Da das Transmembranhelix-Dimer GpA durch elektrostatische Interaktionen signifikant destabilisiert wird (45, 232, 233), erscheint es möglich, dass auch innerhalb des GlpF-Monomers wichtige Helix-Helix-Interaktionen destabilisiert werden. So sind die Helices 1, 4 und 8 an Helix-Helix-Interaktionen beteiligt, die wichtig für die korrekte Faltung des GlpF-Monomers sind (234, 235). Diese strukturell wichtigen Interaktionen werden möglicherweise durch elektrostatische Wechselwirkungen moduliert und resultieren in Konformationsänderungen des GlpF-Monomers. Da jedoch in den durchgeführten *in vitro* Studien die Stabilität des GlpF-Tetramers durch die anionischen Lipide nicht beeinflusst wurde, scheint die Tetramer-Interaktionsfläche nicht gestört zu sein.

Weiterhin ist in Transmembranhelix 1 eines der beiden in Aquaporinen hochkonservierten ExxxTxxF/L-Motive (236) lokalisiert. Über ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen positionieren Glutamat und Threonin die Aminosäuren Ala65, His66 und Leu67 im nicht-

helikalen Bereich der Schleife B von GlpF. Der Substratfluss durch GlpF wird vor allem durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Substrat und den Carbonylsauerstoffatomen der Peptidbindungen in den nicht-helikalen Bereichen der die Membran halb durchspannenden Schleifen B und E vermittelt (vgl. Abbildung 9) (149, 237). Eine Konformationsänderung von Helix 1 basierend auf elektrostatischen Wechselwirkungen interferiert möglicherweise mit dem beschriebenen Netzwerk und wichtige Wasserstoffbrückenbindungen, die den Substratfluss energetisieren können nicht mehr ausgebildet werden.

Auch die reduzierte Aktivität von GlpF in EPL und PE/PG/CL-Membranen, im Vergleich zur GlpF-Aktivität in reinen PC-Membranen, kann durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Aminosäuren in GlpF und den anionischen Lipide erklärt werden.

4.2.4 Weder für die GlpF-Tetramerisierung noch die GlpF-Aktivität ist eine spezielle Lipidumgebung erforderlich

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der *in vitro* Studie über den Einfluss der Lipidumgebung auf die Oligomerisierung und Aktivität von GlpF, dass weder für die GlpF-Oligomerisierung noch für die GlpF-Aktivität bei Abschirmung negativer Ladungen eine spezielle Lipidumgebung erforderlich ist. Jedoch müssen die Acylketten der Lipide eine bestimmte Länge aufweisen, um das GlpF-Tetramer zu stabilisieren und die GlpF-Aktivität zu ermöglichen (Abbildung 37A). Insbesondere die hohe Toleranz der GlpF-Oligomerisierung und -Aktivität gegenüber dem für *E. coli*-Transmembranproteine nicht-physiologischen Lipid PC zeigt, dass die chemische Struktur der Lipidkopfgruppe für die Assemblierung und Aktivität von untergeordneter Bedeutung ist. Auch die Robustheit von GlpF gegenüber Änderungen des lateralen Drucks weist auf eine hohe strukturelle Stabilität von GlpF hin (Abbildung 37B), wie dies bereits auf Grundlage von AQP0-Strukturanalysen diskutiert wurde (227). Die Quartärstruktur und Funktion von GlpF scheinen damit unabhängig von einer speziellen Lipidkopfgruppen-Umgebung zu sein. Aufgrund der hochkonservierten Aquaporin-Tertiär- und Quartärstruktur (134, 205), sowie aufgrund konservierter Protein-Lipid-Interaktionen zwischen Aquaporinen (143), ist diese Eigenschaft vermutlich auf andere Aquaporine zu übertragen. Die hohe strukturelle Stabilität und Toleranz gegenüber Änderungen in der Lipidumgebung gewährleisten die Aquaporin-Aktivität in verschiedenen Zellen und Geweben unterschiedlichster Lipidzusammensetzung.

Auch der negative Einfluss der anionischen Lipide PG, CL und PS auf die GlpF-Aktivität ist nicht lipidspezifisch. Elektrostatische Interaktionen zwischen positiv geladenen Aminosäuren in GlpF und der negativ geladenen Lipidkopfgruppen führen wahrscheinlich zu Konformationsänderungen innerhalb des GlpF-Monomers, die wiederum die Funktion von GlpF beeinflussen (Abbildung 37C). Konformationsänderungen, die aus Unterschieden in der

Lipidumgebung resultieren und den Substratfluss durch die Translokationspore beeinflussen, wurden auch für die humanen Aquaporine 0 und 4 postuliert (150, 151).

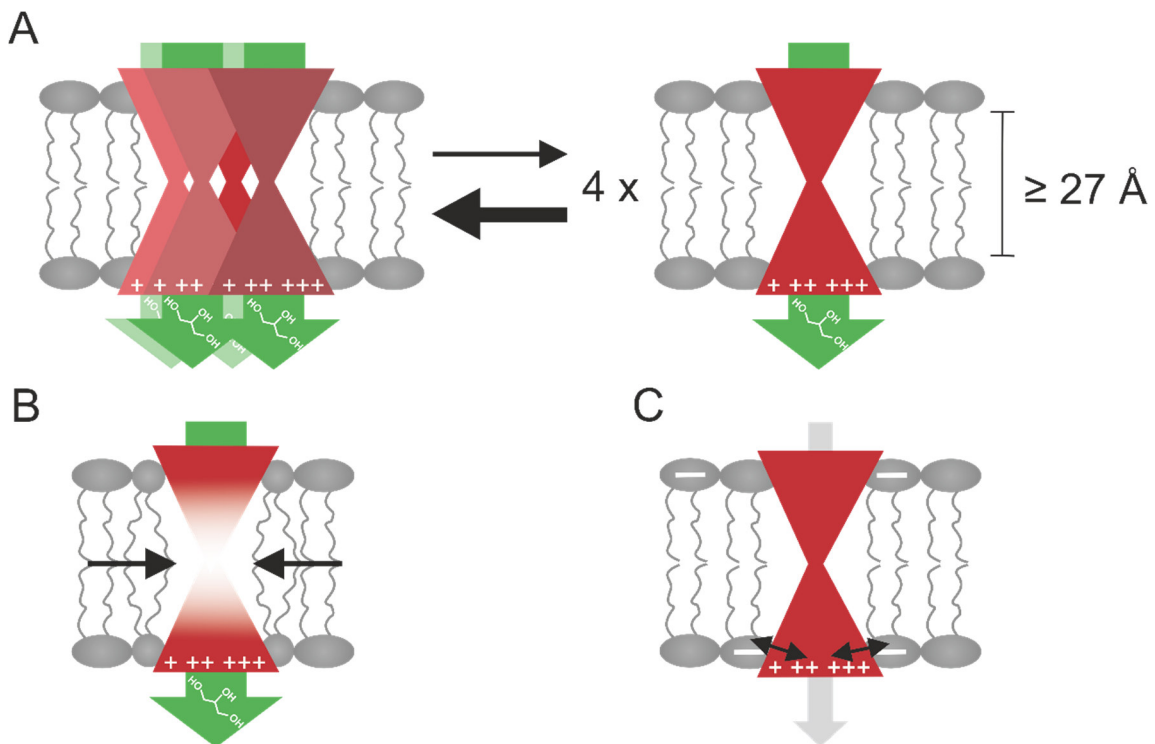


Abbildung 37: Schematische Darstellung des Einflusses unterschiedlicher Lipide auf die Oligomerisierung und Aktivität von GlpF.

(A) In Membranen einer minimalen Acylkettenlänge von C18:1, die einem Abstand von 27 Å zwischen den Carbonylgruppen in den verschiedenen Membranhälften entspricht, wurden hohe Anteile an tetramerem GlpF, unabhängig von der Lipidkomposition, detektiert und hohe Ribitolflussraten (grüner Pfeil) erfasst. (B) Der durch GlpF vermittelte Substratfluss wird nicht durch Änderungen des lateralen Drucks in der Acylkettenregion beeinflusst. (C) Elektrostatische Interaktionen zwischen positiv geladenen Aminosäuren auf der cytoplasmatischen Seite der Membran und anionischen Lipiden (durch Doppelpfeil dargestellt) führen vermutlich zu strukturellen Änderungen im GlpF-Monomer, die den Substratfluss signifikant einschränken (grauer, schmaler Pfeil), jedoch gleichzeitig die GlpF-Tetramerisierung nicht beeinflussen.

In vivo werden die Oberflächeneigenschaften von Zellmembranen und damit auch die negative Oberflächenladung durch die Bindung von Molekülen, wie peripheren Proteinen oder Zuckern, moduliert (238, 239). Da die Aktivität von GlpF in Membranen aus 50 mol% PC und 50 mol% PG durch Ladungsabschirmung erhöht werden konnte, erscheint es möglich, dass auch in der *E. coli*-Zelle durch eine Abschirmung der Zelloberflächenladung die GlpF-Aktivität gewährleistet wird.

Wie bereits erwähnt, wird aktuell die Lipidzusammensetzung in der unmittelbaren Umgebung als Faktor für die Regulation von Membranproteinen diskutiert (152). GlpF kann daher möglicherweise auch *in vivo* durch die selektive Anreicherung von negativ geladenen Lipiden in der unmittelbaren Protein-Umgebung reversibel reguliert werden. Eine Regulation basierend auf Variationen in der Lipidmembranzusammensetzung wurde auch für AQP0 und AQP4 vorgeschlagen (150, 151).

4.3 *In vivo* Einfluss veränderter physikochemischer Membraneigenschaften auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF

In der Literatur ist für das Anästhetikum 2-PEtOH beschrieben, dass dieses die Lipidordnung in verschiedenen Modellmembransystemen verringert (53, 195, 196). Zunächst wurde daher der Einfluss von 2-PEtOH auf die Ordnung von EPL-Membranen mittels Laurdan-Fluoreszenz- und SFG-Spektroskopie untersucht. Während die Laurdan-Fluoreszenzspektroskopie eine Abnahme der Lipidordnung mit steigenden 2-PEtOH-Konzentrationen aufzeigte, wurde mittels SFG-Spektroskopie eine Zunahme der Lipidordnung festgestellt. BAM-Aufnahmen zeigten, dass 2-PEtOH die laterale Lipidorganisation signifikant beeinflusst. So führte die Inkubation der EPL-Monolagen mit 16 mM 2-PEtOH zu einer Phasenseparation sowie einer ausgeprägten Lipiddomänenbildung. *In vivo* wurde deutlich, dass die 2-PEtOH-induzierte Phasenseparation eine Umverteilung und Akkumulation von polytopen, *E. coli* Transmembranproteinen induziert. Ferner war die Interaktionstendenz von GlpF in Gegenwart von 2-PEtOH deutlich erhöht, während der GlpF-vermittelte Ribitolfluss signifikant eingeschränkt war.

4.3.1 2-PEtOH induziert die Bildung lateraler Lipiddomänen unterschiedlicher Ordnung

Die Ergebnisse der Laurdan-Fluoreszenz- und der SFG-Spektroskopie stellen einen Mittelwert der Probengesamtheit dar. Die BAM-Aufnahmen zeigten jedoch, dass der Effekt von 2-PEtOH auf die Ordnung der *E. coli*-Lipide lokal unterschiedlich ist und eine Phasenseparation der Lipide bzw. eine Domänenbildung durch 2-PEtOH induziert wird. Vermutlich unterscheiden sich die neu gebildeten Domänen in der Lipidordnung und die Ergebnisse der Laurdan-Fluoreszenz- und der SFG-Spektroskopie repräsentieren jeweils die fluideren bzw. höher geordneten Lipiddomänen.

In den SFG-spektroskopischen Messungen wird direkt die Ordnung der Acylketten durch das Verhältnis der $\text{CH}_{3\text{-ss}}/\text{CH}_{2\text{-ss}}$ -Molekülschwingungen erfasst. Im Gegensatz dazu ist die Messung der Lipidordnung mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Laurdan eine indirekte Methode. Diese basiert auf der dipolaren Relaxation von Wassermolekülen, die in der Gel-Phase im Vergleich zur flüssig-kristallinen Phase nicht möglich ist (240). Die Bestimmung des GP-Wertes von Lipidsystemen, bestehend aus koexistierenden Phasen, basiert auf dem Gesetz der Additivität der Anisotropien nach Weber (175, 241). Der mittlere GP-Wert in einem solchen System ist daher gemäß Gleichung 7 gegeben (240).

$$GP = x_g GP_g + x_f GP_f \quad [7]$$

(x_g und x_f : relativer Anteil der Gel bzw. flüssig-kristallinen Phase mit $x_g + x_f = 1$, GP_g und GP_f : GP-Werte der reinen Gel bzw. flüssig-kristallinen Phase)

Da sowohl der Laurdan-Verteilungskoeffizient als auch der Laurdan-Absorptionskoeffizient nach Anregung bei 340 nm für die Gel- und flüssig-kristalline Phase gleich sind (240, 242), ist der relative Anteil x der beiden Phasen primär von der Fläche der Phasen abhängig. So werden vor allem geringe Flächenanteile der höher geordneten Gel-Phase im mittleren GP-Wert unterschätzt (243), da das eingenommene Volumen eines Lipidmoleküls in der flüssig-kristallinen Phase größer als das eines Lipidmoleküls in der Gel-Phase (244, 245) (Abbildung 38). Die Unterrepräsentation geordneter Domänen im mittleren GP-Wert, aufgrund eines kleineren Flächenanteils der geordneten Domänen, erklärt die Abnahme des GP-Wertes des gesamten Lipidsystems. Die mittels SFG-Spektroskopie festgestellte erhöhte Lipidordnung ist auch nicht auf eine globale Änderung in der EPL-Membran zurückzuführen, sondern auf eine lokal erhöhte Ordnung in Lipiddomänen. Aus den scheinbar widersprüchlichen Ergebnissen der beiden Methoden wird außerdem deutlich, dass die Fläche der Domänen mit geringerer Ordnung größer ist als die Fläche der geordneten Lipiddomänen, dabei aber gleichzeitig die effektive Konzentration der Lipide höherer Ordnung größer ist (Abbildung 38).

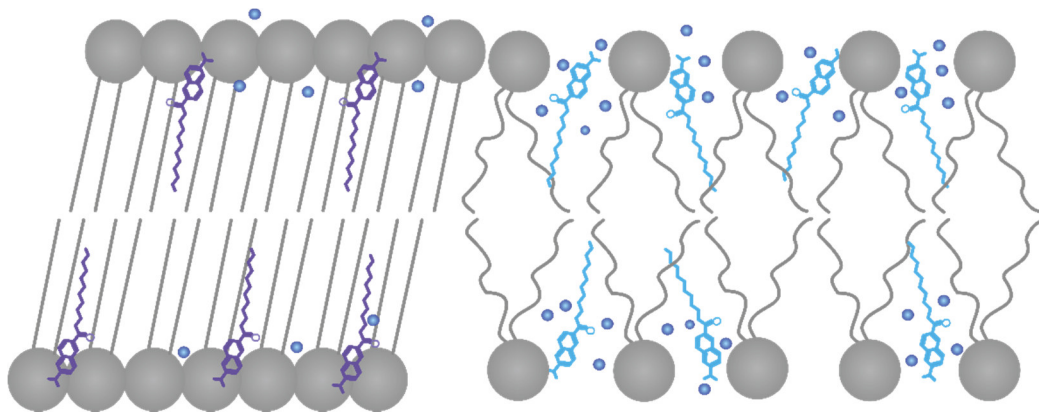


Abbildung 38: Verteilung und Emissionseigenschaften von Laurdan in der phasenseparierten Lipidmembranen.

Die Fläche von Lipidmolekülen in der Gel-Phase (links) ist kleiner als die eines Lipidmoleküls in der flüssig-kristallinen Phase (rechts). Die Verteilung von Laurdan in phasenseparierten Lipidmembranen ist abhängig von der Fläche der jeweiligen Phasen. Daher sind mehr Laurdanmoleküle in der flüssig-kristallinen Phase (blau) lokalisiert als in der Gel-Phase (lila). Demzufolge tragen mehr Laurdanmoleküle aus der flüssig-kristallinen Phase (blau), mit rotverschobenen Emissionsmaximum bei 490 nm zum mittleren GP-Wert bei, als Laurdanmoleküle in der Gel-Phase (lila) mit einem Emissionsmaximum bei 440 nm. Die dargestellten Größenverhältnisse sind nicht real.

Die molekularen Mechanismen der 2-PEtOH-induzierten Phasenseparation und Domänenbildung sind jedoch unbekannt. Daher kann über die Triebkraft der Phasenseparation nur gemutmaßt werden. Anästhetika sind bevorzugt an den Grenzflächen von Lipiddomänen lokalisiert (200, 246). Dies ist auf die hohe Affinität der Anästhetika für

Lipide mit Beugung in der Acylkette aufgrund von *cis*-Doppelbindungen und Lipiden in der *gauche*-Konformation zurückzuführen. Diese Lipide sind häufig an Domänen-Grenzflächen lokalisiert. Darüber hinaus inserieren Alkohole bevorzugt in Membranen bestehend aus Lipiden mit längeren und ungesättigten Acylketten (247). Sowohl eine bevorzugte Interaktion mit Lipiden in der *gauche*-Konformation (200) als auch die allgemein für Alkohole beschriebene bevorzugte Interaktion mit langen, ungesättigten Fettsäureresten sind potentielle Triebkräfte der, in den BAM-Aufnahmen gezeigten, 2-PEtOH-induzierten lateralen Umstrukturierung der Lipide. Da die 2-PEtOH Hydroxylgruppe vermutlich, wie für Ethanol und Cholesterol beschrieben, auf Höhe des Glycerol-Rückgrates der Lipide in die Membran inseriert (13, 248), kann eine Beteiligung der Lipidkopfguppen an der Phasenseparation der Lipide auch von Bedeutung sein (27, 29). So ist die Affinität von Cholesterol für die anionischen Phospholipide PS und PG höher als für das zwitterionische PC (249). Ferner wurde in *E. coli*-Membranen bereits die Akkumulation von Lipiden gleicher Kopfgruppe innerhalb von Domänen beschrieben, deren Entstehung auf die chemischen Eigenschaften der Lipidkopfguppen zurückgeführt wurde (29).

4.3.1.1 GlpF aggregiert in den Lipiddomänen höherer Ordnung

Nach Inkubation mit 2-PEtOH waren GlpF sowie die Transmembranproteine NagE und PtsG nicht mehr homogen in der inneren *E. coli*-Membran verteilt. Daher scheint der Effekt von 2-PEtOH auf die Verteilung von GlpF nicht proteinspezifisch zu sein. Die heterogene Verteilung der drei untersuchten Transmembranproteine zeigt wahrscheinlich die bevorzugte Lokalisation dieser in einer der neu entstandenen Lipiddomänen. Die GALLEX-Messungen und Aktivitäts-Analysen bei steigenden 2-PEtOH-Konzentrationen lassen vermuten, dass GlpF in den Domänen höherer Ordnung lokalisiert ist. In diesen Domänen sind die GlpF-Tetramere möglicherweise aufgrund ungünstiger Protein-Lipid-Interaktionen oder der erhöhten lokalen Proteinkonzentration zur Ausbildung höherer Aggregate gezwungen (250). Diese Aggregatbildung wurde in den GALLEX-Messungen als erhöhte Interaktionstendenz erfasst. Die Messungen des Ribitolflusses in Gegenwart steigender 2-PEtOH-Konzentrationen zeigten, dass die Aktivität des in höheren Aggregaten vorliegenden GlpFs signifikant reduziert ist. Aus den Messungen der GlpF-Aktivität in Liposomen mit steigenden PE-Stoffmengenanteilen ist bekannt, dass Änderungen des lateralen Drucks die GlpF-Aktivität nicht beeinflussen. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass eine durch 2-PEtOH induzierte Erhöhung des lateralen Drucks die reduzierte Aktivität bewirkt. Demzufolge wirken sich Assemblierungen des Aquaglyceroporins GlpF über den natürlichen, tetrameren Oligomerisierungsgrad hinaus negativ auf die Aktivität aus. Die hier beobachteten Assemblierungen scheinen auf Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Tetrameroberflächen zu basieren, die, wie bereits vermutet, durch ungünstige Protein-Lipid-Interaktionen oder der erhöhten lokalen Proteinkonzentration entstehen und physiologisch

nicht relevant sind (vgl. Abschnitt 4.1.1.). Die Aggregatbildung führt vermutlich zu strukturellen Änderungen, die den reduzierten Substratfluss bewirken. Wechselwirkungen zwischen Aquaporin-Tetrameren sind bisher nur für AQP4 beschrieben (208-210) und sind für Aquaporine, die normalerweise nicht an höheren Assemblierungen der Tetramere beteiligt sind, energetisch nicht begünstigt (211). Im Gegensatz zu der reduzierten Aktivität von GlpF in höheren Aggregaten, besteht zwischen den einzelnen AQP4-Tetrameren und den in Form von *arrays* organisierten AQP4-Tetrameren kein Aktivitätsunterschied (251).

4.3.1.2 Lipiddomänenbildung als weiterer Aspekt des lipidvermittelten Wirkmechanismus von Anästhetika

Die Untersuchung der Effekte von 2-PEtOH auf EPL-Membranen zeigte, dass 2-PEtOH nicht nur, wie bisher in der Literatur beschrieben, die Lipidordnung in der Membran reduziert, sondern darüber hinaus eine Phasenseparation sowohl *in vivo* als auch *in vitro* induziert. Zusammengenommen lassen die Ergebnisse vermuten, dass Änderungen in der lateralen Lipidorganisation unmittelbar auf Transmembranproteine übertragen werden und dies wiederum Änderungen in der Proteinoligomerisierung und -funktion verursacht, wie es für GlpF gezeigt wurde. Die Beobachtung, dass 2-PEtOH die laterale Lipidorganisation in Systemen mit heterogener Lipidzusammensetzung beeinflusst und Lipiddomänen höherer Ordnung induziert, weist auf einen weiteren Aspekt im lipidvermittelten Wirkmechanismus des Anästhetikums 2-PEtOH hin. Da ein Einfluss von Anästhetika wie Isofluran, Halothan, Chloroform und Propofol auf die Membranheterogenität bereits diskutiert wird (197-199) bzw. in molekularen Simulationen gezeigt wurde (200), ist diese Wirkung eventuell auch auf andere Anästhetika zu übertragen.

Im Allgemeinen können Lipiddomänen die Aktivität von Transmembranproteinen durch die jeweils dominierenden Lipide beeinflussen und können daher ebenfalls Konsequenzen auf Signalkaskaden haben (252-254). Auch für die in der Anästhesie relevanten Ionenkanäle wurde bereits gezeigt, dass sowohl die Lokalisation als auch die Aktivität der Kanäle von der Lipidumgebung abhängen. Der nikotinische Acetylcholin-Rezeptor wird zum Beispiel durch annulare Lipide beeinflusst, die charakteristisch für die flüssig-kristalline Phase sind (255, 256). Auch der γ -Aminobuttersäure Rezeptor A weist eine Cholesterol-abhängige Lokalisation und Aktivität auf (257, 258). Eine laterale Reorganisation der Lipide, die wiederum die Struktur und Aktivität von Kanalproteinen beeinflusst, ist möglicherweise ein wichtiger Aspekt der lipidvermittelten Wirkung von Anästhetika. Allerdings kann an diese Stelle über die molekularen Mechanismen der Lipidseparation, welche Art von Lipiden bevorzugt in welchen Domänen lokalisiert sind, die genauen Effekte auf die Signaltransduktion und insbesondere die Weiterleitung von Aktionspotentialen in eukaryotischen Zellen nur spekuliert werden.

4.4 GlpF als Modell für humane Aquaporine: Einfluss einer Punktmutation auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF

Um den Einfluss der natürlich in AQP2 vorkommenden Punktmutation V71M auf die Proteinoligomerisierung und -aktivität am homologen, bakteriellen Aquaglyceroporin GlpF zu untersuchen, wurde zunächst durch einen Sequenzvergleich zwischen GlpF und den humanen Aquaporinen 0-10 sichergestellt, dass die mutierte Aminosäure konserviert ist. Der Sequenzvergleich verdeutlichte die Konservierung des Valins zwischen GlpF und neun der elf betrachteten, humanen Aquaporine. In zwei humanen Aquaporinen ist Valin an dieser Position durch die hydrophoben Aminosäuren Isoleucin bzw. Phenylalanin substituiert. Darüber hinaus sind die flankierenden Bereiche in der Primärsequenz der humanen Aquaporine und GlpF hochkonserviert, was auf die hohe strukturelle Bedeutung dieser Aminosäuren in den Aquaporinen sowie Aquaglyceroporinen schließen lässt. Durch den Vergleich der GlpF- und AQP2-Kristallstrukturen konnte zum einen die hohe Konservierung der Tertiärstruktur gezeigt werden und zum anderen, dass die Seitenkette der natürlich in AQP2 mutierten Aminosäure Val71 in beiden Proteinen identisch ausgerichtet ist und in die Translokationspore zeigt (vgl. Abbildung 32). Damit waren die strukturellen Voraussetzungen für die Untersuchung des Einflusses der Mutation V71M am homologen, bakteriellen GlpF erfüllt. Die Analyse der Auswirkung der Mutation V71M auf die Oligomerisierung sowie Aktivität am homologen GlpF zeigte, dass weder die *in vivo* Oligomerisierung noch die Aktivität der GlpF-Mutante V71M eingeschränkt sind. Demnach werden durch die Mutation V71M in GlpF keine wesentlichen, strukturellen Änderungen ausgelöst. Für die Mutante V71M wurde sogar eine erhöhte Oligomerisierungstendenz *in vivo* deutlich, wohingegen die *in vitro* Stabilität des Tetramers gegenüber SDS im Vergleich zum GlpF-Wildtyp verringert ist.

4.4.1 Strukturelle Anpassungen in GlpF gewährleisten vermutlich den unveränderten Substratfluss

Analysen der Funktion von AQP2-V71M in *Xenopus* Oozyten zeigten, dass die AQP2-Mutante im ER zurückgehalten wird und darüber hinaus inaktiv zu sein scheint (102). Die defekte zelluläre Prozessierung von AQP2-V71M wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie sowie durch den Nachweis der ER-charakteristischen Mannose-reichen N-Glykosylierung der AQP2-Mutante V71M in einer Western Blot-Analyse gezeigt (102, 259). Bei einem normalen Transport von AQP2 wird die Mannose-reiche N-Glykosylierung im Golgi-Apparat entfernt bzw. bei etwa 25% der AQP2-Monomere durch komplexe Oligosaccharide ersetzt (260, 261). Neben der funktionalen Analyse in *Xenopus* Oozyten beschreibt eine *in silico* Analyse die strukturellen Auswirkungen der Mutation V71M auf AQP2 (262). In dieser Studie wurde auf

Basis der AQP0-Kristallstruktur von Gonen *et al.* (147) ein homologiebasiertes AQP2-Strukturmodell mittels des Webservers SWISS-MODEL (263-265) erstellt, die Mutation V71M inseriert und die strukturellen Folgen der Aminosäuresubstitution Valin gegen Methionin untersucht. Die Autoren der Studie schlussfolgerten anhand dieses Modells, dass in der AQP2-Mutante V71M die Abstände zwischen Met71 und Thr149 in Transmembranhelix 5 sowie Ala65 in Schleife B zu gering sind (3,2 Å bzw. 3,4 Å) und daher keine Wassermoleküle die mutierte Pore passieren können (262).

Die in *Xenopus* Oozyten gezeigte verringerte Aktivität der AQP2-Mutante V71M (102), welche mit einem reduzierten Translokationsporendurchmesser begründet wurde (207, 262), steht im Widerspruch zu den Aktivitätsstudien am homologen, bakteriellen Protein GlpF. Diese zeigten, dass GlpF-V71M im Vergleich zum GlpF-Wildtyp keine eingeschränkte Aktivität aufweist. Folglich scheint Met71 in GlpF eine Konformation einzunehmen, die den Substratfluss nicht signifikant beeinflusst. Der Substratfluss durch die Pore der Aquaporine sowie Aquaglyceroporine wird maßgeblich durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wasser- bzw. Glycerolmolekülen und den Carbonylsauerstoffatomen der Peptidbindungen in den nicht-helikalen Bereichen der die Membran halb durchspannenden Schleifen B und E vermittelt (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 39A) (149, 237). Aufgrund der unmittelbaren Nähe des mutierten Valin zu den kritischen Aminosäuren in Schleife B scheint eine Störung des Substratflusses durch die größere Methioninseitenkette möglich. Da die GlpF-Mutante V71M im Vergleich zum GlpF-Wildtyp keinen signifikanten Funktionsverlust zeigte, können diese Interaktionen jedoch in der GlpF-Mutante V71M nicht wesentlich gestört sein. Wahrscheinlich weist die Methioninseitenkette nicht tiefer in die Pore als die Seitenkette von Valin im wildtypischen Protein, sodass der Substratfluss durch die mutierte Pore nicht eingeschränkt ist. Aufgrund der hohen Konservierung der AQP2- und GlpF-Tertiärstruktur im Bereich der Mutation, ist es möglich, dass auch die Konformation von Met71 in der GlpF- und AQP2-Mutante ähnlich ist. Da jedoch insbesondere im Bereich der NPA-Motive der Durchmesser der Translokationspore der klassischen Aquaporine etwa 1 Å kleiner ist als der Durchmesser der Aquaglyceroporinporen (266), könnte der Austausch von Valin durch eine größere Aminosäure in den Aquaporinen trotz des kleineren Substrats kritischer sein. Allerdings sind in AQP5 und -10 an der analogen Position in Halbhelix 3 statt Valin die größeren, hydrophoben Aminosäuren Isoleucin und Phenylalanin lokalisiert. Ein Vergleich der Konformationen der Halbhelices 3 in AQP5- und AQP2- zeigt, dass die AQP5 Halbhelix leicht gedehnt ist (Abbildung 39B), möglicherweise um die zusätzliche Methylgruppe zu platzieren ohne den Durchmesser der Translokationspore zu beeinflussen.

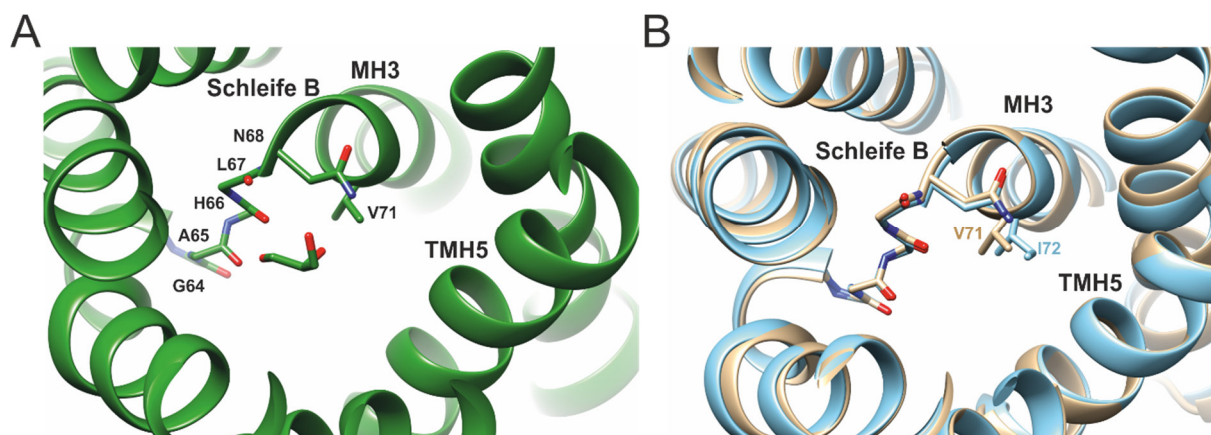


Abbildung 39: Die Aquaporin-Translokationspore.

(A) Am Glycerolfluss durch GlpF sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carbonylsauerstoffatomen der Peptidbindungen in den nicht-helikalen Bereichen der beiden die Membran halb durchspannenden Schleifen B und E sowie den Hydroxyl-Wasserstoffatomen des Substrats beteiligt. Diese Wasserstoffbrückenbindungen bestimmen den Verlauf der Substrat-Passage. In dieser Abbildung dargestellt ist, mit Sicht von der periplasmatischen Seite, die Orientierung eines Glycerolmoleküls in der cytoplasmatischen Hälfte der GlpF-Translokationspore. Das Glycerolmolekül ist zu den Protonenakzeptoren im nicht-helikalen Bereich der Schleife B (Aminosäurereste 64-67) orientiert. (PDB-ID: 1FX8) (B) Strukturvergleich von AQP2 (beige) und AQP5 (blau) mit Blick von der extrazellulären Seite auf die Pore. Halbhelix 3 ist in AQP5 gedehnt, sodass die zusätzliche Methylgruppe von Ile72 den Durchmesser der Translokationspore nicht verändert. (PDB-ID: 4NEF und 3D9S)

Im Gegensatz zur Studie mit AQP2-V71M in *Xenopus* Oozyten konnten in der inneren *E. coli*-Membran hinreichende Mengen der analogen GlpF-Mutante detektiert werden (das Expressionsniveau betrug etwa 70% im Vergleich zum GlpF-Wildtyp). Obwohl die deutlich geringere Konzentration von AQP2-V71M in der Plasmemembran im Vergleich zum AQP2-Wildtyp berücksichtigt wurde, ist der vollständige Funktionsverlust von AQP2-V71M wahrscheinlich primär auf die ER-Retardierung, einhergehend mit einer eventuell eingeschränkten Aktivität, zurückzuführen. Dies könnte zu einer Unterschätzung der Restaktivität der AQP2-Mutante geführt haben.

Daher ist es wahrscheinlich, dass auch im klassischen AQP2 der Austausch von Valin durch Methionin toleriert wird und in GlpF und AQP2 ähnliche Konformationsänderungen erfolgen, die den Durchmesser der Translokationspore nicht beeinflussen und in der beschriebenen *in silico* Analyse nicht erfasst wurden. Es ist möglich, dass diese strukturellen Anpassungen nach einem ähnlichem Mechanismus wie in AQP5 erfolgen.

Zusammengenommen lassen die Funktionsanalyse am homologen Aquaglyceroporin GlpF und die beschriebenen Studien in *Xenopus Oozyten* (102) darauf schließen, dass die AQP2-Mutante V71M vermutlich aktiv ist, allerdings im ER retardiert wird und daher als Klasse-II-Mutation (267) einzuordnen ist.

4.4.2 Physiologische Relevanz der Ergebnisse

Aufgrund der Funktionsanalysen am homologen, bakteriellen Aquaglyceroporin GlpF und der Studien in *Xenopus Oozyten* ist es möglich, dass die Mutation V71M Konformationsänderungen

bewirkt, welche die zelluläre Prozessierung in eukaryotischen Zellen beeinflussen, aber gleichzeitig die Proteinaktivität nicht bzw. nur teilweise einschränken (268). Eine solche Konformationsänderung wurde bereits für die AQP2-Mutante V126M beschrieben (269). In diesem Fall wird NDI durch die defekte zelluläre Prozessierung ausgelöst und nicht durch einen AQP2-Funktionsverlust (269). Bei dem Krankheitsbild des rezessiven NDI wird fehlgefaltetes AQP2 im ER retardiert (270) und der ER-assoziierten Degradation (ERAD) zugeführt (268). Fehlgefaltete Proteine werden hierbei durch das Qualitätskontrollsystem des ERs erkannt, zurück ins Zytosol transportiert und durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut (271, 272). Eine defekte zelluläre Prozessierung und der Protein-Abbau über den ERAD-Weg liegt auch bei der Mehrzahl der Patienten mit zystischer Fibrose zugrunde. So resultiert die Deletion von Phenylalanin an Position 508 im Gen des Chloridkanalproteins CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (273) in einer defekten zellulären Prozessierung und einer ERAD-abhängigen Degradation eines aktiven Chloridkanals (274). Die Korrektur des defekten Proteintransports ist daher eine mögliche, pharmakologische Strategie für die Behandlung von NDI (268, 275), sofern die Proteinaktivität nicht beeinflusst bzw. nur eingeschränkt ist. Die Korrektur von Transportdefekten ist auch aktueller Forschungsgegenstand für die Therapie von zystischer Fibrose (276). Für die AQP2-Mutante T126M wurden im Mausmodell 13 unterschiedliche Substanzen zur Korrektur des Transportdefekts getestet. Das Wirkungsspektrum der Substanzen umfasste die ERAD-Mechanismen sowie den eigentlichen Faltungsprozess. Von allen analysierten Modulatoren konnte nur der Hsp90-Inhibitor 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) den defekten Transportprozess teilweise korrigieren. Der genaue Mechanismus des Hsp90-Inhibitors ist unbekannt, beschrieben ist jedoch für Hsp90, dass dieses die ERAD-abhängige Degradation verschiedener fehlgefalteter Proteine begünstigt (275, 277, 278). Darüber hinaus konnte durch die chemischen Chaperone Glycerol und Trimethylamin, welche der Proteinaggregation durch Abschirmung hydrophober Bereiche entgegenwirken, der AQP2-Transport beeinflusst werden (96).

Die Untersuchung des Einflusses der Mutation V71M am homologen, bakteriellen Aquaglyceroporin zeigte, dass weder die Aktivität noch die *in vivo* Oligomerisierung durch den Austausch von Valin gegen Methionin eingeschränkt sind. Zusammen mit der für AQP2-V71M beschriebenen ER-Retardierung (102) ist daher zu vermuten, dass die Mutation V71M als Klasse-II-Mutation einzuordnen ist. Ferner lassen die Beobachtungen am homologen, bakteriellen Protein darauf schließen, dass eine Therapie durch pharmakologische Chaperone oder allgemeine Modulatoren der ERAD-abhängigen Degradation möglich ist, um den defekten Transport von der ER-Membran in die Membranen des Sammelrohrs der Niere zu korrigieren.

5 Literaturverzeichnis

1. Wallin, E., and G. von Heijne. 1998. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* 7:1029-1038.
2. Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, and E. L. Sonnhammer. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305:567-580.
3. Goldhor, S. 1968. Protein: lipid ratios of liver mitochondria during development. *J Cell Biol* 37:823-825.
4. Yurlova, L., N. Kahya, S. Aggarwal, H. J. Kaiser, S. Chiantia, M. Bakhti, Y. Pewzner-Jung, O. Ben-David, A. H. Futerman, B. Brugger, and M. Simons. 2011. Self-segregation of myelin membrane lipids in model membranes. *Biophys J* 101:2713-2720.
5. Sanders, C. R., and J. K. Myers. 2004. Disease-related misassembly of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33:25-51.
6. Ng, D. P., B. E. Poulsen, and C. M. Deber. 2012. Membrane protein misassembly in disease. *Biochim Biophys Acta* 1818:1115-1122.
7. Hopkins, A. L., and C. R. Groom. 2002. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* 1:727-730.
8. Overington, J. P., B. Al-Lazikani, and A. L. Hopkins. 2006. Opinion - How many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery* 5:993-996.
9. Arinaminpathy, Y., E. Khurana, D. M. Engelman, and M. B. Gerstein. 2009. Computational analysis of membrane proteins: the largest class of drug targets. *Drug discovery today* 14:1130-1135.
10. Carpenter, E. P., K. Beis, A. D. Cameron, and S. Iwata. 2008. Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol* 18:581-586.
11. White, S. H. 2009. Biophysical dissection of membrane proteins. *Nature* 459:344-346.
12. Kozma, D., I. Simon, and G. E. Tusnady. 2013. PDBTM: Protein Data Bank of transmembrane proteins after 8 years. *Nucleic acids research* 41:D524-529.
13. Ohvo-Rekila, H., B. Ramstedt, P. Leppimäki, and J. P. Slotte. 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research* 41:66-97.
14. Gruner, S. M. 1985. Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:3665-3669.
15. Seddon, J. M. 1990. Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids. *Biochim Biophys Acta* 1031:1-69.
16. Kollmitzer, B., P. Heftberger, M. Rappolt, and G. Pabst. 2013. Monolayer spontaneous curvature of raft-forming membrane lipids. *Soft matter* 9:10877-10884.
17. Luckey, M. 2014. *Membrane structural biology: With biochemical and biophysical foundations*. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
18. White, S. H., and W. C. Wimley. 1999. Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28:319-365.
19. Koynova, R., and M. Caffrey. 1998. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim Biophys Acta* 1376:91-145.
20. Ruocco, M. J., and G. G. Shipley. 1982. Characterization of the Sub-Transition of Hydrated Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers - X-Ray-Diffraction Study. *Biochimica Et Biophysica Acta* 684:59-66.
21. Lee, A. G. 2004. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1666:62-87.
22. van Meer, G., D. R. Voelker, and G. W. Feigenson. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112-124.
23. Lugtenberg, E. J., and R. Peters. 1976. Distribution of lipids in cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* K12. *Biochim Biophys Acta* 441:38-47.

24. Oursel, D., C. Loutelier-Bourhis, N. Orange, S. Chevalier, V. Norris, and C. M. Lange. 2007. Lipid composition of membranes of *Escherichia coli* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using negative electrospray ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21:1721-1728.
25. Singer, S. J., and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
26. Engelman, D. M. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438:578-580.
27. Barak, I., and K. Muchova. 2013. The role of lipid domains in bacterial cell processes. *Int J Mol Sci* 14:4050-4065.
28. Vanounou, S., A. H. Parola, and I. Fishov. 2003. Phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol are segregated into different domains in bacterial membrane. A study with pyrene-labelled phospholipids. *Molecular Microbiology* 49:1067-1079.
29. Matsumoto, K., J. Kusaka, A. Nishibori, and H. Hara. 2006. Lipid domains in bacterial membranes. *Mol Microbiol* 61:1110-1117.
30. Pauling, L., R. B. Corey, and H. R. Branson. 1951. The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 37:205-211.
31. Tamm, L. K., H. Hong, and B. Liang. 2004. Folding and assembly of beta-barrel membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1666:250-263.
32. Popot, J. L., and D. M. Engelman. 2000. Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annu Rev Biochem* 69:881-922.
33. Ulmschneider, M. B., and M. S. Sansom. 2001. Amino acid distributions in integral membrane protein structures. *Biochim Biophys Acta* 1512:1-14.
34. Arkin, I. T., and A. T. Brunger. 1998. Statistical analysis of predicted transmembrane alpha-helices. *Biochim Biophys Acta* 1429:113-128.
35. von Heijne, G. 2007. The membrane protein universe: what's out there and why bother? *Journal of internal medicine* 261:543-557.
36. Heijne, G. 1986. The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J* 5:3021-3027.
37. Popot, J. L., and D. M. Engelman. 1990. Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry* 29:4031-4037.
38. Engelman, D. M., Y. Chen, C. N. Chin, A. R. Curran, A. M. Dixon, A. D. Dupuy, A. S. Lee, U. Lehnert, E. E. Matthews, Y. K. Reshetnyak, A. Senes, and J. L. Popot. 2003. Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett* 555:122-125.
39. Neumann, J., N. Klein, D. E. Otzen, and D. Schneider. 2014. Folding energetics and oligomerization of polytopic alpha-helical transmembrane proteins. *Arch Biochem Biophys* 546:281-296.
40. Crick, F. H. C. 1953. The Packing of Alpha-Helices - Simple Coiled-Coils. *Acta Crystallogr* 6:689-697.
41. Langosch, D., and J. Heringa. 1998. Interaction of transmembrane helices by a knobs-into-holes packing characteristic of soluble coiled coils. *Proteins* 31:150-159.
42. Jahmig, F. 1983. Thermodynamics and kinetics of protein incorporation into membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:3691-3695.
43. Senes, A., M. Gerstein, and D. M. Engelman. 2000. Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol* 296:921-936.
44. Sternberg, M. J., and W. J. Gullick. 1990. A sequence motif in the transmembrane region of growth factor receptors with tyrosine kinase activity mediates dimerization. *Protein engineering* 3:245-248.
45. Russ, W. P., and D. M. Engelman. 2000. The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol* 296:911-919.
46. Senes, A., D. E. Engel, and W. F. DeGrado. 2004. Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol* 14:465-479.

47. Kim, S., T. J. Jeon, A. Oberai, D. Yang, J. J. Schmidt, and J. U. Bowie. 2005. Transmembrane glycine zippers: Physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14278-14283.
48. Zhou, F. X., H. J. Merianos, A. T. Brunger, and D. M. Engelman. 2001. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2250-2255.
49. Gratkowski, H., J. D. Lear, and W. F. DeGrado. 2001. Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:880-885.
50. Schneider, D. 2004. Rendezvous in a membrane: close packing, hydrogen bonding, and the formation of transmembrane helix oligomers. *FEBS Lett* 577:5-8.
51. Andersen, O. S., and R. E. Koeppe, 2nd. 2007. Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36:107-130.
52. Charalambous, K., D. Miller, P. Curnow, and P. J. Booth. 2008. Lipid bilayer composition influences small multidrug transporters. *BMC Biochem* 9:31.
53. Anbazhagan, V., C. Munz, L. Tome, and D. Schneider. 2010. Fluidizing the membrane by a local anesthetic: phenylethanol affects membrane protein oligomerization. *J Mol Biol* 404:773-777.
54. Marius, P., M. Zagnoni, M. E. Sandison, J. M. East, H. Morgan, and A. G. Lee. 2008. Binding of Anionic Lipids to at Least Three Nonannular Sites on the Potassium Channel KcsA is Required for Channel Opening(). *Biophysical Journal* 94:1689-1698.
55. Marius, P., M. R. de Planque, and P. T. Williamson. 2012. Probing the interaction of lipids with the non-annular binding sites of the potassium channel KcsA by magic-angle spinning NMR. *Biochim Biophys Acta* 1818:90-96.
56. Jiang, F., M. T. Ryan, M. Schlame, M. Zhao, Z. Gu, M. Klingenberg, N. Pfanner, and M. L. Greenberg. 2000. Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem* 275:22387-22394.
57. Gomez, B., Jr., and N. C. Robinson. 1999. Phospholipase digestion of bound cardiolipin reversibly inactivates bovine cytochrome bc1. *Biochemistry* 38:9031-9038.
58. Hoffmann, B., A. Stockl, M. Schlame, K. Beyer, and M. Klingenberg. 1994. The Reconstituted Adp Atp Carrier Activity Has an Absolute Requirement for Cardiolipin as Shown in Cysteine Mutants. *Journal of Biological Chemistry* 269:1940-1944.
59. Bogdanov, M., and W. Dowhan. 1998. Phospholipid-assisted protein folding: phosphatidylethanolamine is required at a late step of the conformational maturation of the polytopic membrane protein lactose permease. *EMBO J* 17:5255-5264.
60. Dowhan, W., and M. Bogdanov. 2012. Molecular genetic and biochemical approaches for defining lipid-dependent membrane protein folding. *Biochim Biophys Acta* 1818:1097-1107.
61. East, J. M., D. Melville, and A. G. Lee. 1985. Exchange-Rates and Numbers of Annular Lipids for the Calcium and Magnesium-Ion Dependent Adenosine-Triphosphatase. *Biochemistry* 24:2615-2623.
62. Marsh, D., and L. I. Horvath. 1998. Structure, dynamics and composition of the lipid-protein interface. Perspectives from spin-labelling. *Bba-Rev Biomembranes* 1376:267-296.
63. Mouritsen, O. G., and M. Bloom. 1984. Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophys J* 46:141-153.
64. Killian, J. A. 1998. Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim Biophys Acta* 1376:401-415.
65. Fattal, D. R., and A. Ben-Shaul. 1993. A molecular model for lipid-protein interaction in membranes: the role of hydrophobic mismatch. *Biophys J* 65:1795-1809.
66. Williamson, I. M., S. J. Alvis, J. M. East, and A. G. Lee. 2002. Interactions of phospholipids with the potassium channel KcsA. *Biophys J* 83:2026-2038.
67. Lee, A. G. 1998. How lipids interact with an intrinsic membrane protein: the case of the calcium pump. *Biochim Biophys Acta* 1376:381-390.

68. Lee, A. G. 2011. Lipid-protein interactions. *Biochemical Society transactions* 39:761-766.
69. Killian, J. A., M. R. R. de Planque, P. C. A. van der Wel, I. Salemink, B. de Kruijff, D. V. Greathouse, and R. E. Koeppe. 1998. Modulation of membrane structure and function by hydrophobic mismatch between proteins and lipids. *Pure and Applied Chemistry* 70:75-82.
70. Cantor, R. S. 1997. Lateral pressures in cell membranes: A mechanism for modulation of protein function. *Journal of Physical Chemistry B* 101:1723-1725.
71. Cantor, R. S. 1997. The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia. *Biochemistry* 36:2339-2344.
72. Morein, S., A. Andersson, L. Rilfors, and G. Lindblom. 1996. Wild-type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a "window" between gel and non-lamellar structures. *J Biol Chem* 271:6801-6809.
73. Rietveld, A. G., J. A. Killian, W. Dowhan, and B. de Kruijff. 1993. Polymorphic regulation of membrane phospholipid composition in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268:12427-12433.
74. van den Brink-van der Laan, E., J. A. Killian, and B. de Kruijff. 2004. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim Biophys Acta* 1666:275-288.
75. Starling, A. P., J. M. East, and A. G. Lee. 1993. Effects of phosphatidylcholine fatty acyl chain length on calcium binding and other functions of the (Ca(2+)-Mg2+)-ATPase. *Biochemistry* 32:1593-1600.
76. Pilot, J. D., J. M. East, and A. G. Lee. 2001. Effects of bilayer thickness on the activity of diacylglycerol kinase of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 40:8188-8195.
77. Brown, M. F. 1997. Influence of nonlamellar-forming lipids on rhodopsin. *Lipid Polymorphism and Membrane Properties* 44:285-356.
78. Bezrukov, S. M. 2000. Functional consequences of lipid packing stress. *Curr Opin Colloid In* 5:237-243.
79. Vitrac, H., M. Bogdanov, and W. Dowhan. 2013. Proper fatty acid composition rather than an ionizable lipid amine is required for full transport function of lactose permease from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 288:5873-5885.
80. Strichartz, G. R. 1973. The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine. *The Journal of general physiology* 62:37-57.
81. Park, J. S., T. S. Jung, Y. H. Noh, W. S. Kim, W. I. Park, Y. S. Kim, I. K. Chung, U. D. Sohn, S. K. Bae, M. K. Bae, H. O. Jang, and I. Yun. 2012. The Effect of Lidocaine . HCl on the Fluidity of Native and Model Membrane Lipid Bilayers. *Korean J Physiol Pharmacol* 16:413-422.
82. Reigada, R. 2013. Atomistic study of lipid membranes containing chloroform: looking for a lipid-mediated mechanism of anesthesia. *PLoS One* 8:e52631.
83. Sidel, V. W., and A. K. Solomon. 1957. Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient. *The Journal of general physiology* 41:243-257.
84. Solomon, A. K., B. Chasan, J. A. Dix, M. F. Lukacovic, M. R. Toon, and A. S. Verkman. 1983. The aqueous pore in the red cell membrane: band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes, and water. *Annals of the New York Academy of Sciences* 414:97-124.
85. Preston, G. M., T. P. Carroll, W. B. Guggino, and P. Agre. 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256:385-387.
86. Benga, G. 2012. On the definition, nomenclature and classification of water channel proteins (aquaporins and relatives). *Mol Aspects Med* 33:514-517.
87. Ishibashi, K., S. Kondo, S. Hara, and Y. Morishita. 2011. The evolutionary aspects of aquaporin family. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300:R566-576.
88. Wu, B., and E. Beitz. 2007. Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. *Cell Mol Life Sci* 64:2413-2421.
89. Yasui, M., A. Hazama, T. H. Kwon, S. Nielsen, W. B. Guggino, and P. Agre. 1999. Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* 402:184-187.

90. Bienert, G. P., A. L. Moller, K. A. Kristiansen, A. Schulz, I. M. Moller, J. K. Schjoerring, and T. P. Jahn. 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem* 282:1183-1192.
91. Liu, K., D. Kozono, Y. Kato, P. Agre, A. Hazama, and M. Yasui. 2005. Conversion of aquaporin 6 from an anion channel to a water-selective channel by a single amino acid substitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2192-2197.
92. Uehlein, N., C. Lovisollo, F. Siefritz, and R. Kaldenhoff. 2003. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* 425:734-737.
93. Herrera, M., and J. L. Garvin. 2011. Aquaporins as gas channels. *Pflug Arch Eur J Phy* 462:623-630.
94. Fang, X., B. Yang, M. A. Matthay, and A. S. Verkman. 2002. Evidence against aquaporin-1-dependent CO₂ permeability in lung and kidney. *The Journal of physiology* 542:63-69.
95. Tornroth-Horsefield, S., K. Hedfalk, G. Fischer, K. Lindkvist-Petersson, and R. Neutze. 2010. Structural insights into eukaryotic aquaporin regulation. *Febs Letters* 584:2580-2588.
96. Verkman, A. S., M. O. Anderson, and M. C. Papadopoulos. 2014. Aquaporins: important but elusive drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 13:259-277.
97. Verkman, A. S. 2013. Aquaporins. *Curr Biol* 23:R52-55.
98. Gonen, T., P. Sliz, J. Kistler, Y. Cheng, and T. Walz. 2004. Aquaporin-0 membrane junctions reveal the structure of a closed water pore. *Nature* 429:193-197.
99. Palanivelu, D. V., D. E. Kozono, A. Engel, K. Suda, A. Lustig, P. Agre, and T. Schirmer. 2006. Co-axial association of recombinant eye lens aquaporin-0 observed in loosely packed 3D crystals. *J Mol Biol* 355:605-611.
100. Francis, P., J. J. Chung, M. Yasui, V. Berry, A. Moore, M. K. Wyatt, G. Wistow, S. S. Bhattacharya, and P. Agre. 2000. Functional impairment of lens aquaporin in two families with dominantly inherited cataracts. *Hum Mol Genet* 9:2329-2334.
101. Nielsen, S., J. Frokiaer, D. Marples, T. H. Kwon, P. Agre, and M. A. Knepper. 2002. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiological reviews* 82:205-244.
102. Marr, N., D. G. Bichet, S. Hoefs, P. J. Savelkoul, I. B. Konings, F. De Mattia, M. P. Graat, M. F. Arthus, M. Lonergan, T. M. Fujiwara, N. V. Knoers, D. Landau, W. J. Balfe, A. Oksche, W. Rosenthal, D. Muller, C. H. Van Os, and P. M. Deen. 2002. Cell-biologic and functional analyses of five new Aquaporin-2 missense mutations that cause recessive nephrogenic diabetes insipidus. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 13:2267-2277.
103. Marr, N., E. J. Kamsteeg, M. van Raak, C. H. van Os, and P. M. Deen. 2001. Functionality of aquaporin-2 missense mutants in recessive nephrogenic diabetes insipidus. *Pflugers Arch* 442:73-77.
104. Deen, P. M., N. Marr, E. J. Kamsteeg, and B. W. van Balkom. 2000. Nephrogenic diabetes insipidus. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9:591-595.
105. Hasegawa, H., T. Ma, W. Skach, M. A. Matthay, and A. S. Verkman. 1994. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J Biol Chem* 269:5497-5500.
106. Ma, T., B. Yang, A. Gillespie, E. J. Carlson, C. J. Epstein, and A. S. Verkman. 1997. Generation and phenotype of a transgenic knockout mouse lacking the mercurial-insensitive water channel aquaporin-4. *The Journal of clinical investigation* 100:957-962.
107. Lennon, V. A., T. J. Kryzer, S. J. Pittock, A. S. Verkman, and S. R. Hinson. 2005. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *The Journal of experimental medicine* 202:473-477.
108. Raina, S., G. M. Preston, W. B. Guggino, and P. Agre. 1995. Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *J Biol Chem* 270:1908-1912.
109. Fox, R. I. 2005. Sjogren's syndrome. *Lancet* 366:321-331.

110. Ma, T., M. Hara, R. Sougrat, J. M. Verbavatz, and A. S. Verkman. 2002. Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3. *J Biol Chem* 277:17147-17153.
111. Hara-Chikuma, M., and A. S. Verkman. 2008. Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption. *Mol Cell Biol* 28:326-332.
112. Hibuse, T., N. Maeda, A. Nagasawa, and T. Funahashi. 2006. Aquaporins and glycerol metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1758:1004-1011.
113. Rojek, A. M., M. T. Skowronski, E. M. Fuchtbauer, A. C. Fuchtbauer, R. A. Fenton, P. Agre, J. Frokiaer, and S. Nielsen. 2007. Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3609-3614.
114. Zeidel, M. L., S. V. Ambudkar, B. L. Smith, and P. Agre. 1992. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry* 31:7436-7440.
115. Murata, K., K. Mitsuoka, T. Hirai, T. Walz, P. Agre, J. B. Heymann, A. Engel, and Y. Fujiyoshi. 2000. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407:599-605.
116. Fu, D., A. Libson, L. J. Miercke, C. Weitzman, P. Nollert, J. Krucinski, and R. M. Stroud. 2000. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* 290:481-486.
117. Lagree, V., A. Froger, S. Deschamps, I. Pellerin, C. Delamarche, G. Bonnet, J. Gouranton, D. Thomas, and J. F. Hubert. 1998. Oligomerization state of water channels and glycerol facilitators - Involvement of loop E. *Journal of Biological Chemistry* 273:33949-33953.
118. Smith, B. L., and P. Agre. 1991. Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. *J Biol Chem* 266:6407-6415.
119. Jung, J. S., G. M. Preston, B. L. Smith, W. B. Guggino, and P. Agre. 1994. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J Biol Chem* 269:14648-14654.
120. Fujiyoshi, Y., K. Mitsuoka, B. L. de Groot, A. Philippsen, H. Grubmuller, P. Agre, and A. Engel. 2002. Structure and function of water channels. *Curr Opin Struct Biol* 12:509-515.
121. Gonen, T., and T. Walz. 2006. The structure of aquaporins. *Quarterly Reviews of Biophysics* 39:361-396.
122. Pao, G. M., L. F. Wu, K. D. Johnson, H. Hofte, M. J. Chrispeels, G. Sweet, N. N. Sandal, and M. H. Saier, Jr. 1991. Evolution of the MIP family of integral membrane transport proteins. *Mol Microbiol* 5:33-37.
123. Reizer, J., A. Reizer, and M. H. Saier, Jr. 1993. The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 28:235-257.
124. Walther, D., F. Eisenhaber, and P. Argos. 1996. Principles of helix-helix packing in proteins: the helical lattice superposition model. *J Mol Biol* 255:536-553.
125. Cymer, F., and D. Schneider. 2010. A single glutamate residue controls the oligomerization, function, and stability of the aquaglyceroporin GlpF. *Biochemistry* 49:279-286.
126. Buck, T. M., J. Wagner, S. Grund, and W. R. Skach. 2007. A novel tripartite motif involved in aquaporin topogenesis, monomer folding and tetramerization. *Nature structural & molecular biology* 14:762-769.
127. Nemeth-Cahalan, K. L., D. M. Clemens, and J. E. Hall. 2013. Regulation of AQP0 water permeability is enhanced by cooperativity. *The Journal of general physiology* 141:287-295.
128. Mathai, J. C., and P. Agre. 1999. Hourglass pore-forming domains restrict aquaporin-1 tetramer assembly. *Biochemistry* 38:923-928.
129. Cymer, F., and D. Schneider. 2012. Oligomerization of polytopic alpha-helical membrane proteins: causes and consequences. *Biol Chem* 393:1215-1230.

130. Nemeth-Cahalan, K. L., K. Kalman, A. Froger, and J. E. Hall. 2007. Zinc modulation of water permeability reveals that aquaporin 0 functions as a cooperative tetramer. *The Journal of general physiology* 130:457-464.
131. Reichow, S. L., and T. Gonen. 2008. Noncanonical binding of calmodulin to aquaporin-0: implications for channel regulation. *Structure* 16:1389-1398.
132. Otto, B., N. Uehlein, S. Sdorra, M. Fischer, M. Ayaz, X. Belastegui-Macadam, M. Heckwolf, M. Lachnit, N. Pede, N. Priem, A. Reinhard, S. Siegfart, M. Urban, and R. Kaldenhoff. 2010. Aquaporin Tetramer Composition Modifies the Function of Tobacco Aquaporins. *Journal of Biological Chemistry* 285:31253-31260.
133. Sui, H., B. G. Han, J. K. Lee, P. Walian, and B. K. Jap. 2001. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* 414:872-878.
134. Savage, D. F., P. F. Egea, Y. Robles-Colmenares, J. D. O'Connell, 3rd, and R. M. Stroud. 2003. Architecture and selectivity in aquaporins: 2.5 Å X-ray structure of aquaporin Z. *PLoS biology* 1:E72.
135. Harries, W. E., D. Akhavan, L. J. Miercke, S. Khademi, and R. M. Stroud. 2004. The channel architecture of aquaporin 0 at a 2.2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14045-14050.
136. Maurel, C., J. Reizer, J. I. Schroeder, M. J. Chrispeels, and M. H. Saier, Jr. 1994. Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 269:11869-11872.
137. Bernal, J. D., and R. H. Fowler. 1933. A Theory of Water and Ionic Solution, with Particular Reference to Hydrogen and Hydroxyl Ions. *The Journal of Chemical Physics* 1:515-548.
138. Heller, K. B., E. C. Lin, and T. H. Wilson. 1980. Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 144:274-278.
139. de Groot, B. L., and H. Grubmuller. 2001. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science* 294:2353-2357.
140. Fujiyoshi, Y., K. Mitsuoka, B. L. de Groot, A. Philippsen, H. Grubmuller, P. Agre, and A. Engel. 2002. Structure and function of water channels. *Curr Opin Struct Biol* 12:509-515.
141. Kato, M., A. V. Pislakov, and A. Warshel. 2006. The barrier for proton transport in aquaporins as a challenge for electrostatic models: the role of protein relaxation in mutational calculations. *Proteins* 64:829-844.
142. Kosinska Eriksson, U., G. Fischer, R. Friemann, G. Enkavi, E. Tajkhorshid, and R. Neutze. 2013. Subångström resolution X-ray structure details aquaporin-water interactions. *Science* 340:1346-1349.
143. Stansfeld, P. J., E. E. Jefferys, and M. S. Sansom. 2013. Multiscale simulations reveal conserved patterns of lipid interactions with aquaporins. *Structure* 21:810-819.
144. Jiang, J., B. V. Daniels, and D. Fu. 2006. Crystal structure of AqpZ tetramer reveals two distinct Arg-189 conformations associated with water permeation through the narrowest constriction of the water-conducting channel. *J Biol Chem* 281:454-460.
145. Horsefield, R., K. Norden, M. Fellert, A. Backmark, S. Tornroth-Horsefield, A. C. Terwisscha van Scheltinga, J. Kvassman, P. Kjellbom, U. Johanson, and R. Neutze. 2008. High-resolution x-ray structure of human aquaporin 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:13327-13332.
146. Hite, R. K., Z. Li, and T. Walz. 2010. Principles of membrane protein interactions with annular lipids deduced from aquaporin-0 2D crystals. *EMBO J* 29:1652-1658.
147. Gonen, T., Y. Cheng, P. Sliz, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi, S. C. Harrison, and T. Walz. 2005. Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. *Nature* 438:633-638.
148. Jensen, M. O., and O. G. Mouritsen. 2004. Lipids do influence protein function-the hydrophobic matching hypothesis revisited. *Biochim Biophys Acta* 1666:205-226.
149. Jensen, M. O., and O. G. Mouritsen. 2006. Single-channel water permeabilities of *Escherichia coli* aquaporins AqpZ and GlpF. *Biophys J* 90:2270-2284.

150. Tong, J., J. T. Canty, M. M. Briggs, and T. J. McIntosh. 2013. The water permeability of lens aquaporin-0 depends on its lipid bilayer environment. *Exp Eye Res* 113:32-40.
151. Tong, J., M. M. Briggs, and T. J. McIntosh. 2012. Water permeability of aquaporin-4 channel depends on bilayer composition, thickness, and elasticity. *Biophys J* 103:1899-1908.
152. Laganowsky, A., E. Reading, T. M. Allison, M. B. Ulmschneider, M. T. Degiacomi, A. J. Baldwin, and C. V. Robinson. 2014. Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function. *Nature* 510:172-175.
153. Treptow, N. A., and H. A. Shuman. 1985. Genetic evidence for substrate and periplasmic-binding-protein recognition by the MalF and MalG proteins, cytoplasmic membrane components of the Escherichia coli maltose transport system. *J Bacteriol* 163:654-660.
154. Froger, A., J. P. Rolland, P. Bron, V. Lagree, F. Le Caherec, S. Deschamps, J. F. Hubert, I. Pellerin, D. Thomas, and C. Delamarche. 2001. Functional characterization of a microbial aquaglyceroporin. *Microbiology* 147:1129-1135.
155. Dmitrova, M., G. Younes-Cauet, P. Oertel-Buchheit, D. Porte, M. Schnarr, and M. Granger-Schnarr. 1998. A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in Escherichia coli. *Molecular & general genetics* : MGG 257:205-212.
156. Bullock, W. O., J. M. Fernandez, and J. M. Short. 1987. X11-Blue - a High-Efficiency Plasmid Transforming Reca Escherichia-Coli Strain with Beta-Galactosidase Selection. *Biotechniques* 5:376-&.
157. Nagai, T., K. Ibata, E. S. Park, M. Kubota, K. Mikoshiba, and A. Miyawaki. 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20:87-90.
158. Schneider, D., and D. M. Engelman. 2003. GALLEX, a measurement of heterologous association of transmembrane helices in a biological membrane. *Journal of Biological Chemistry* 278:3105-3111.
159. Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin. 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* 25:1605-1612.
160. Notredame, C., D. G. Higgins, and J. Heringa. 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology* 302:205-217.
161. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* 22:4673-4680.
162. Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
163. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
164. Chung, C. T., S. L. Niemela, and R. H. Miller. 1989. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2172-2175.
165. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
166. Fazekas de St Groth, S., R. G. Webster, and A. Datyner. 1963. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* 71:377-391.
167. Bearer, E. L. 2003. Overview of image analysis, image importing, and image processing using freeware. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.] Chapter 14:Unit 14*. 15.
168. Porath, J. 1992. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein expression and purification* 3:263-281.

169. Borgnia, M. J., and P. Agre. 2001. Reconstitution and functional comparison of purified GlpF and AqpZ, the glycerol and water channels from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2888-2893.
170. Lau, F. W., and J. U. Bowie. 1997. A method for assessing the stability of a membrane protein. *Biochemistry* 36:5884-5892.
171. Schnarr, M., P. Oertel-Buchheit, M. Kazmaier, and M. Granger-Schnarr. 1991. DNA binding properties of the LexA repressor. *Biochimie* 73:423-431.
172. Miller, J. H. 1972. A short course in bacterial genetics. A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
173. Lu, H., and T. L. Xu. 2002. The general anesthetic pentobarbital slows desensitization and deactivation of the glycine receptor in the rat spinal dorsal horn neurons. *J Biol Chem* 277:41369-41378.
174. Weber, G., and F. J. Farris. 1979. Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. *Biochemistry* 18:3075-3078.
175. Parasassi, T., G. De Stasio, A. d'Ubaldo, and E. Gratton. 1990. Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys J* 57:1179-1186.
176. Hassan, P. A., S. Rana, and G. Verma. 2015. Making sense of brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering. *Langmuir* 31:3-12.
177. Miranda, P. B., and Y. R. Shen. 1999. Liquid interfaces: A study by sum-frequency vibrational spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* 103:3292-3307.
178. Shen, Y. R. 1989. Optical 2nd Harmonic-Generation at Interfaces. *Annu Rev Phys Chem* 40:327-350.
179. Roke, S., J. Schins, M. Muller, and M. Bonn. 2003. Vibrational spectroscopic investigation of the phase diagram of a biomimetic lipid monolayer. *Physical review letters* 90:128101.
180. Liljeblad, J. F., V. Bulone, E. Tyrode, M. W. Rutland, and C. M. Johnson. 2010. Phospholipid monolayers probed by vibrational sum frequency spectroscopy: instability of unsaturated phospholipids. *Biophys J* 98:L50-52.
181. Backus, E. H. G., J. M. Kuiper, J. B. F. N. Engberts, B. Poolman, and M. Bonn. 2011. Reversible Optical Control of Monolayers on Water through Photoswitchable Lipids. *Journal of Physical Chemistry B* 115:2294-2302.
182. Henon, S., and J. Meunier. 1991. Microscope at the Brewster-Angle - Direct Observation of 1st-Order Phase-Transitions in Monolayers. *Rev Sci Instrum* 62:936-939.
183. Honig, D., and D. Mobius. 1991. Direct Visualization of Monolayers at the Air-Water-Interface by Brewster-Angle Microscopy. *J Phys Chem-U S A* 95:4590-4592.
184. Curnow, P., and P. J. Booth. 2007. Combined kinetic and thermodynamic analysis of alpha-helical membrane protein unfolding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18970-18975.
185. Otzen, D. E. 2003. Folding of DsbB in mixed micelles: a kinetic analysis of the stability of a bacterial membrane protein. *J Mol Biol* 330:641-649.
186. Mattice, W. L., J. M. Riser, and D. S. Clark. 1976. Conformational properties of the complexes formed by proteins and sodium dodecyl sulfate. *Biochemistry* 15:4264-4272.
187. Booth, P. J. 2000. Unravelling the folding of bacteriorhodopsin. *Biochim Biophys Acta* 1460:4-14.
188. Veerappan, A., F. Cymer, N. Klein, and D. Schneider. 2011. The tetrameric alpha-helical membrane protein GlpF unfolds via a dimeric folding intermediate. *Biochemistry* 50:10223-10230.
189. Galka, J. J., S. J. Baturin, D. M. Manley, A. J. Kehler, and J. D. O'Neil. 2008. Stability of the glycerol facilitator in detergent solutions. *Biochemistry* 47:3513-3524.
190. Adamian, L., H. Naveed, and J. Liang. 2011. Lipid-binding surfaces of membrane proteins: evidence from evolutionary and structural analysis. *Biochim Biophys Acta* 1808:1092-1102.

191. Anbazhagan, V., and D. Schneider. 2010. The membrane environment modulates self-association of the human GpA TM domain--implications for membrane protein folding and transmembrane signaling. *Biochim Biophys Acta* 1798:1899-1907.
192. Rawicz, W., K. C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, and E. Evans. 2000. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys J* 79:328-339.
193. Kucerka, N., J. Gallova, D. Uhríkova, P. Balgavy, M. Bulacu, S. J. Marrink, and J. Katsaras. 2009. Areas of monounsaturated diacylphosphatidylcholines. *Biophys J* 97:1926-1932.
194. Epand, R. M. 1998. Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochim Biophys Acta* 1376:353-368.
195. Jordi, W., R. Nibbeling, and B. de Kruijff. 1990. Phenethyl alcohol disorders phospholipid acyl chains and promotes translocation of the mitochondrial precursor protein apocytochrome c across a lipid bilayer. *FEBS Lett* 261:55-58.
196. Killian, J. A., C. H. Fabrie, W. Baart, S. Morein, and B. de Kruijff. 1992. Effects of temperature variation and phenethyl alcohol addition on acyl chain order and lipid organization in *Escherichia coli* derived membrane systems. A ²H- and ³¹P-NMR study. *Biochim Biophys Acta* 1105:253-262.
197. Turkyilmaz, S., P. F. Almeida, and S. L. Regen. 2011. Effects of isoflurane, halothane, and chloroform on the interactions and lateral organization of lipids in the liquid-ordered phase. *Langmuir* 27:14380-14385.
198. Gray, E., J. Karlake, B. B. Machta, and S. L. Veatch. 2013. Liquid general anesthetics lower critical temperatures in plasma membrane vesicles. *Biophys J* 105:2751-2759.
199. Balasubramanian, S. V., R. B. Campbell, and R. M. Straubinger. 2002. Propofol, a general anesthetic, promotes the formation of fluid phase domains in model membranes. *Chem Phys Lipids* 114:35-44.
200. Jorgensen, K., J. H. Ipsen, O. G. Mouritsen, and M. J. Zuckermann. 1993. The effect of anaesthetics on the dynamic heterogeneity of lipid membranes. *Chem Phys Lipids* 65:205-216.
201. Halegoua, S., and M. Inouye. 1979. Translocation and assembly of outer membrane proteins of *Escherichia coli*. Selective accumulation of precursors and novel assembly intermediates caused by phenethyl alcohol. *J Mol Biol* 130:39-61.
202. Zerrouk, Z., S. Alexandre, C. Lafontaine, V. Norris, and J. M. Valleton. 2008. Inner membrane lipids of *Escherichia coli* form domains. *Colloid Surface B* 63:306-310.
203. Sorani, M. D., G. T. Manley, and K. M. Giacomini. 2008. Genetic variation in human aquaporins and effects on phenotypes of water homeostasis. *Hum Mutat* 29:1108-1117.
204. King, L. S., D. Kozono, and P. Agre. 2004. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:687-698.
205. Wang, Y., and E. Tajkhorshid. 2007. Molecular mechanisms of conduction and selectivity in aquaporin water channels. *The Journal of nutrition* 137:1509S-1515S; discussion 1516S-1517S.
206. Apweiler, R., A. Bairoch, and C. H. Wu. 2004. Protein sequence databases. *Curr Opin Chem Biol* 8:76-80.
207. Frick, A., U. K. Eriksson, F. de Mattia, F. Oberg, K. Hedfalk, R. Neutze, W. J. de Grip, P. M. Deen, and S. Tornroth-Horsefield. 2014. X-ray structure of human aquaporin 2 and its implications for nephrogenic diabetes insipidus and trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:6305-6310.
208. Yang, B., D. Brown, and A. S. Verkman. 1996. The mercurial insensitive water channel (AQP-4) forms orthogonal arrays in stably transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 271:4577-4580.
209. Rossi, A., T. J. Moritz, J. Ratelade, and A. S. Verkman. 2012. Super-resolution imaging of aquaporin-4 orthogonal arrays of particles in cell membranes. *J Cell Sci* 125:4405-4412.
210. Crane, J. M., and A. S. Verkman. 2009. Determinants of aquaporin-4 assembly in orthogonal arrays revealed by live-cell single-molecule fluorescence imaging. *J Cell Sci* 122:813-821.

211. Hofinger, S., E. Yamamoto, Y. Hirano, F. Zerbetto, T. Narumi, K. Yasuoka, and M. Yasui. 2012. Structural features of aquaporin 4 supporting the formation of arrays and junctions in biomembranes. *Biochim Biophys Acta* 1818:2234-2243.
212. Unger, V. M. 2000. Fraternal twins: AQP1 and GlpF. *Nat Struct Biol* 7:1082-1084.
213. Liman, E. R., J. Tytgat, and P. Hess. 1992. Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9:861-871.
214. Folgering, J. H., J. C. Wolters, and B. Poolman. 2005. Engineering covalent oligomers of the mechanosensitive channel of large conductance from *Escherichia coli* with native conductance and gating characteristics. *Protein Sci* 14:2947-2954.
215. Zhu, F., E. Tajkhorshid, and K. Schulten. 2001. Molecular dynamics study of aquaporin-1 water channel in a lipid bilayer. *FEBS Lett* 504:212-218.
216. Beitz, E., S. Pavlovic-Djuranovic, M. Yasui, P. Agre, and J. E. Schultz. 2004. Molecular dissection of water and glycerol permeability of the aquaglyceroporin from *Plasmodium falciparum* by mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1153-1158.
217. Jensen, M. O., S. Park, E. Tajkhorshid, and K. Schulten. 2002. Energetics of glycerol conduction through aquaglyceroporin GlpF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6731-6736.
218. Tajkhorshid, E., P. Nollert, M. O. Jensen, L. J. W. Miercke, J. O'Connell, R. M. Stroud, and K. Schulten. 2002. Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science* 296:525-530.
219. van den Brink-van der Laan, E., V. Chupin, J. A. Killian, and B. de Kruijff. 2004. Stability of KcsA tetramer depends on membrane lateral pressure. *Biochemistry* 43:4240-4250.
220. Valiyaveetil, F. I., Y. Zhou, and R. MacKinnon. 2002. Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K⁺ channel. *Biochemistry* 41:10771-10777.
221. Lomize, A. L., I. D. Pogozheva, M. A. Lomize, and H. I. Mosberg. 2006. Positioning of proteins in membranes: a computational approach. *Protein Sci* 15:1318-1333.
222. Mitra, K., I. Ubarretxena-Belandia, T. Taguchi, G. Warren, and D. M. Engelman. 2004. Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4083-4088.
223. Marsh, D., B. Shanmugavadivu, and J. H. Kleinschmidt. 2006. Membrane elastic fluctuations and the insertion and tilt of beta-barrel proteins. *Biophys J* 91:227-232.
224. Marsh, D. 2008. Protein modulation of lipids, and vice-versa, in membranes. *Biochim Biophys Acta* 1778:1545-1575.
225. Helfrich, W. 1975. Out-of-plane fluctuations of lipid bilayers. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C: Biosciences* 30:841-842.
226. Koynova, R., and M. Caffrey. 1994. Phases and phase transitions of the hydrated phosphatidylethanolamines. *Chem Phys Lipids* 69:1-34.
227. Sanders, C. R., and K. F. Mittendorf. 2011. Tolerance to changes in membrane lipid composition as a selected trait of membrane proteins. *Biochemistry* 50:7858-7867.
228. Shahidullah, K., and E. London. 2008. Effect of lipid composition on the topography of membrane-associated hydrophobic helices: stabilization of transmembrane topography by anionic lipids. *J Mol Biol* 379:704-718.
229. Zhang, Y. M., and C. O. Rock. 2008. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature reviews. Microbiology* 6:222-233.
230. Ulmschneider, M. B., M. S. Sansom, and A. Di Nola. 2005. Properties of integral membrane protein structures: derivation of an implicit membrane potential. *Proteins* 59:252-265.
231. Seppala, S., J. S. Slusky, P. Lloris-Garcera, M. Rapp, and G. von Heijne. 2010. Control of membrane protein topology by a single C-terminal residue. *Science* 328:1698-1700.
232. Hong, H., and J. U. Bowie. 2011. Dramatic destabilization of transmembrane helix interactions by features of natural membrane environments. *J Am Chem Soc* 133:11389-11398.
233. Cymer, F., A. Veerappan, and D. Schneider. 2012. Transmembrane helix-helix interactions are modulated by the sequence context and by lipid bilayer properties. *Biochim Biophys Acta* 1818:963-973.

234. Senes, A., I. Ubarretxena-Belandia, and D. M. Engelman. 2001. The Calpha ---H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9056-9061.
235. Klein, N., J. Neumann, J. D. O'Neil, and D. Schneider. 2015. Folding and stability of the aquaglyceroporin GlpF: Implications for human aqua(glycero)porin diseases. *Biochim Biophys Acta* 1848:622-633.
236. Heymann, J. B., and A. Engel. 2000. Structural clues in the sequences of the aquaporins. *J Mol Biol* 295:1039-1053.
237. Jensen, M. O., E. Tajkhorshid, and K. Schulten. 2001. The mechanism of glycerol conduction in aquaglyceroporins. *Structure* 9:1083-1093.
238. Murray, D., A. Arbusova, B. Honig, and S. McLaughlin. 2002. The role of electrostatic and nonpolar interactions in the association of peripheral proteins with membranes. *Curr Top Membr* 52:277-307.
239. Goldenberg, N. M., and B. E. Steinberg. 2010. Surface charge: a key determinant of protein localization and function. *Cancer research* 70:1277-1280.
240. Parasassi, T., G. De Stasio, G. Ravagnan, R. M. Rusch, and E. Gratton. 1991. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys J* 60:179-189.
241. Weber, G. 1952. Polarization of the fluorescence of macromolecules. I. Theory and experimental method. *Biochem J* 51:145-155.
242. Bagatolli, L. A. 2006. To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1758:1541-1556.
243. Fidorra, M., L. Duelund, C. Leidy, A. C. Simonsen, and L. A. Bagatolli. 2006. Absence of fluid-ordered/fluid-disordered phase coexistence in ceramide/POPC mixtures containing cholesterol. *Biophys J* 90:4437-4451.
244. Nagle, J. F., and S. Tristram-Nagle. 2000. Lipid bilayer structure. *Curr Opin Struct Biol* 10:474-480.
245. Leekumjorn, S., and A. K. Sum. 2007. Molecular studies of the gel to liquid-crystalline phase transition for fully hydrated DPPC and DPPE bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1768:354-365.
246. Cruzeiro-Hansson, L., and O. G. Mouritsen. 1988. Passive ion permeability of lipid membranes modelled via lipid-domain interfacial area. *Biochim Biophys Acta* 944:63-72.
247. Cantor, R. S. 2001. Bilayer partition coefficients of alkanols: Predicted effects of varying lipid composition. *Journal of Physical Chemistry B* 105:7550-7553.
248. Holte, L. L., and K. Gawrisch. 1997. Determining ethanol distribution in phospholipid multilayers with MAS-NOESY spectra. *Biochemistry* 36:4669-4674.
249. van Dijck, P. W. 1979. Negatively charged phospholipids and their position in the cholesterol affinity sequence. *Biochim Biophys Acta* 555:89-101.
250. Lee, A. G. 2003. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta* 1612:1-40.
251. Smith, A. J., B. J. Jin, J. Ratelade, and A. S. Verkman. 2014. Aggregation state determines the localization and function of M1- and M23-aquaporin-4 in astrocytes. *J Cell Biol* 204:559-573.
252. Hinderliter, A., R. L. Biltonen, and P. F. F. Almeida. 2004. Lipid modulation of protein-induced membrane domains as a mechanism for controlling signal transduction. *Biochemistry* 43:7102-7110.
253. Salinas, D. G., M. De la Fuente, and J. G. Reyes. 2005. Changes of enzyme activity in lipid signaling pathways related to substrate reordering. *Biophysical Journal* 89:885-894.
254. Dibble, A. R., A. K. Hinderliter, J. J. Sando, and R. L. Biltonen. 1996. Lipid lateral heterogeneity in phosphatidylcholine/phosphatidylserine/diacylglycerol vesicles and its influence on protein kinase C activation. *Biophys J* 71:1877-1890.
255. Barrantes, F. J., V. Bermudez, M. V. Borroni, S. S. Antollini, M. F. Pediconi, J. C. Baier, I. Bonini, C. Gallegos, A. M. Roccamo, A. S. Valles, V. Ayala, and C. Kamerbeek. 2010.

- Boundary lipids in the nicotinic acetylcholine receptor microenvironment. *Journal of molecular neuroscience* : MN 40:87-90.
256. Zanello, L. P., E. Aztiria, S. Antollini, and F. J. Barrantes. 1996. Nicotinic acetylcholine receptor channels are influenced by the physical state of their membrane environment. *Biophys J* 70:2155-2164.
257. Sooksawate, T., and M. A. Simmonds. 2001. Effects of membrane cholesterol on the sensitivity of the GABA(A) receptor to GABA in acutely dissociated rat hippocampal neurones. *Neuropharmacology* 40:178-184.
258. Li, X., D. R. Serwanski, C. P. Miralles, B. A. Bahr, and A. L. De Blas. 2007. Two pools of Triton X-100-insoluble GABA(A) receptors are present in the brain, one associated to lipid rafts and another one to the post-synaptic GABAergic complex. *J Neurochem* 102:1329-1345.
259. Deen, P. M., H. Croes, R. A. van Aubel, L. A. Ginsel, and C. H. van Os. 1995. Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing. *The Journal of clinical investigation* 95:2291-2296.
260. Hendriks, G., M. Koudijs, B. W. van Balkom, V. Oorschot, J. Klumperman, P. M. Deen, and P. van der Sluijs. 2004. Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279:2975-2983.
261. Baumgarten, R., M. H. Van De Pol, J. F. Wetzels, C. H. Van Os, and P. M. Deen. 1998. Glycosylation is not essential for vasopressin-dependent routing of aquaporin-2 in transfected Madin-Darby canine kidney cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 9:1553-1559.
262. Bougacha-Elleuch, N., M. B. Lassoued, N. Miled, S. Zouari, and H. Ayadi. 2008. Characterization of V71M mutation in the aquaporin-2 gene causing nephrogenic diabetes insipidus. *Journal of genetics* 87:279-282.
263. Biasini, M., S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. G. Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli, and T. Schwede. 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research* 42:W252-258.
264. Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp, and T. Schwede. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22:195-201.
265. Guex, N., M. C. Peitsch, and T. Schwede. 2009. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis* 30 Suppl 1:S162-173.
266. Wang, Y., K. Schulten, and E. Tajkhorshid. 2005. What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF. *Structure* 13:1107-1118.
267. Zielenski, J. 2000. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration; international review of thoracic diseases* 67:117-133.
268. Tamarappoo, B. K., and A. S. Verkman. 1998. Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones. *The Journal of clinical investigation* 101:2257-2267.
269. Tamarappoo, B. K., B. Yang, and A. S. Verkman. 1999. Misfolding of mutant aquaporin-2 water channels in nephrogenic diabetes insipidus. *J Biol Chem* 274:34825-34831.
270. Iolascon, A., V. Aglio, G. Tamma, M. D'Apolito, F. Addabbo, G. Procino, M. C. Simonetti, G. Montini, L. Gesualdo, E. W. Debler, M. Svelto, and G. Valenti. 2007. Characterization of two novel missense mutations in the AQP2 gene causing nephrogenic diabetes insipidus. *Nephron. Physiology* 105:p33-41.
271. Bonifacino, J. S., and J. Lippincott-Schwartz. 1991. Degradation of proteins within the endoplasmic reticulum. *Current opinion in cell biology* 3:592-600.
272. Meusser, B., C. Hirsch, E. Jarosch, and T. Sommer. 2005. ERAD: the long road to destruction. *Nature cell biology* 7:766-772.
273. Tsui, L. C., and M. Buchwald. 1991. Biochemical and molecular genetics of cystic fibrosis. *Advances in human genetics* 20:153-266, 311-152.

274. Pasyk, E. A., and J. K. Foskett. 1995. Mutant (delta F508) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel is functional when retained in endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Biol Chem* 270:12347-12350.
275. Yang, B., D. Zhao, and A. S. Verkman. 2009. Hsp90 inhibitor partially corrects nephrogenic diabetes insipidus in a conditional knock-in mouse model of aquaporin-2 mutation. *FASEB J* 23:503-512.
276. Hanrahan, J. W., H. M. Sampson, and D. Y. Thomas. 2013. Novel pharmacological strategies to treat cystic fibrosis. *Trends Pharmacol Sci* 34:119-125.
277. Brodsky, J. L. 2007. The protective and destructive roles played by molecular chaperones during ERAD (endoplasmic-reticulum-associated degradation). *Biochem J* 404:353-363.
278. Jiang, C., S. L. Fang, Y. F. Xiao, S. P. O'Connor, S. G. Nadler, D. W. Lee, D. M. Jefferson, J. M. Kaplan, A. E. Smith, and S. H. Cheng. 1998. Partial restoration of cAMP-stimulated CFTR chloride channel activity in DeltaF508 cells by deoxyspergualin. *The American journal of physiology* 275:C171-178.

6 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
APS	Ammoniumpersulfat
AQP	Aquaporin
BAM	Brewster-Winkel-Mikroskopie (engl.: <i>Brewster angle microscopy</i>)
C-	Carboxy
CHIP28	<i>Channel forming Integral membrane Protein of 28 kDa</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CL	Cardiolipin
$c_{GlpF,rel.}$	Relative GlpF-Konzentration
D	Diffusionskoeffizient
$d_{C=O-C=O}$	Abstand zwischen den Carbonylgruppen der Esterbindungen in den gegenüberliegenden Membranhälften
d_{P-P}	Distanz zwischen den Phosphat-Gruppen in den gegenüberliegenden Membranhälften
Da	Dalton
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltosid
Di	Dimer
DLS	dynamischen Lichtstreuung (engl.: <i>dynamic light scattering</i>)
DMPC	Dimyristoylphosphocholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxiribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	Englisch
EPL	Polare <i>E. coli</i> -Lipide (engl.: <i>E. coli polar lipids</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierten Degradation
EZ	Intrazellulär
β -Gal.	β -Galaktosidase
GP	<i>Generalized Polarization</i>
GpA	Glykophorin A
GPC	Gelpermeationschromatographie
H _I	Hexagonale Phase
H _{II}	invertierte, hexagonale Phase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure

HK	Hauptkultur
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: <i>horseradish peroxidase</i>)
η	Dynamische Viskosität
IMAC	immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
IZ	Extrazellulär
J_0	spontane Krümmung
kb	Kilo Basen
k_w	Gewichtete Geschwindigkeitskonstante
$k_{w, \text{norm.}}$	Normierte, gewichtete Geschwindigkeitskonstante
$k_{w, \text{rel.}}$	Relative, gewichtete Geschwindigkeitskonstante
L	lamellare Phase
Laurdan	6-Dodecanoyl-N,N-dimethyl-2-naphtylamin
LB	Luria-Bertani
L_c	kristalline Phase
L_o	flüssig-geordnete Phase
LUV	Große, unilammellare Vesikel
L_α	flüssig-kristalline Phase
L_β	Gel-Phase
M	Monomer
MH	Membranhelix
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MU	Miller Einheiten (engl.: <i>miller units</i>)
n	Probenanzahl bzw. Brechungsindex
N-	Amino
NDI	<i>nephrogenem Diabetes insipidus</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD_x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
OG	Octyl- β -D-glucopyranosid
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid
π	Lateraler Druck
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	Proteindatenbank
PDI	Polydispersitätsindex
PE	Phosphatidylethanolamin

PEG	Polyethylenglycol
2-PEtOH	2-Phenylethanol
PG	Phosphatidylglycerol
POPC	Palmitoyloleoylphosphatidylcholin
POPE	Palmitoyloleoylphosphatidylethanolamin
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
P _β	Rippelphase
Q	kubischen Phase
rel.	relativ
R _H	hydrodynamischer Radius
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung (engl.: <i>small-angle X-ray scattering</i>)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis</i>)
SE	Standardfehler
SFG	Summenfrequenzerzeugungsspektroskopie (engl.: <i>sum frequency generation</i>)
Std.	Standard
T	Tetramer
T _M	Phasenübergangstemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline + Tween 20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
t _{ind.}	Zeitpunkt der Induktion der Proteinexpression mit IPTG
TMH	Transmembranhelix
Tri	Trimer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolet
vgl.	Vergleiche
Vis	Sichtbarer Spektralbereich (engl.: <i>visible</i>)
VK	Vorkultur
wt	Wildtyp
X	Stoffmengenanteil
z	Membrantiefe

Z-Mittel Intensitätsmittel

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der Glycerophospholipide.....	4
Abbildung 2: Lipidpolymorphismus und das korrespondierende Phasenverhalten.....	6
Abbildung 3: Strukturen unterschiedlicher lamellarer Lipid-Phasen.....	7
Abbildung 4: Periphere und integrale Membranproteine.....	10
Abbildung 5: Stufen-Modell zur Faltung von α -helikalen Transmembranproteinen.....	11
Abbildung 6: Laterales Druckprofil einer Lipiddoppelschicht.....	14
Abbildung 7: Topologie und Struktur der Aquaporine.....	19
Abbildung 8: Rigidität des GlpF-Tetramers.....	21
Abbildung 9: Glycerolfluss durch die amphiphatische Aquaglyceroporin Pore.....	22
Abbildung 10: Klonierungsschema der GlpF-Fusionskonstrukte.....	40
Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines <i>Stopped-Flow</i> -UV/Vis-Spektrometers.....	49
Abbildung 12: Laurdan-Fluoreszenzspektroskopie.....	50
Abbildung 13: SFG-Spektroskopie.....	53
Abbildung 14: Aktivität der fusionierten GlpF-Homooligomere.....	56
Abbildung 15: Aktivität der fusionierten GlpF-Tetramere mit steigenden Anteilen an mutierten Monomeren.....	58
Abbildung 16: Korrelation zwischen der Tetramer-Aktivität und dem Anteil mutierter Monomere.....	60
Abbildung 17: Oligomerisierung der GlpF-Homooligomere.....	61
Abbildung 18: Stabilität des GlpF-Tetramers aus zwei fusionierten GlpF-Dimeren.....	62
Abbildung 19: SDS-PAGE-Analyse der GlpF-Oligomerisierung und Inkorporation in Liposomen.....	67
Abbildung 20: Abhängigkeit der GlpF-Oligomerisierung und der -Aktivität von der Acylkettenlänge.....	68
Abbildung 21: Abhängigkeit der GlpF-Oligomerisierung Aktivität von steigenden PE-Stoffmengenanteilen.....	70
Abbildung 22: Abhängigkeit der GlpF-Oligomerisierung und der -Aktivität von steigenden PG- bzw. CL-Stoffmengenanteilen.....	71
Abbildung 23: Abhängigkeit der GlpF-Oligomerisierung und der -Aktivität von steigenden PS-Stoffmengenanteilen.....	72
Abbildung 24: Regeneration der GlpF-Aktivität durch Ladungsabschirmung.....	73
Abbildung 25: Laurdan-Fluoreszenzspektroskopie an EPL-Membranen zur Analyse der Lipidordnung.....	74
Abbildung 26: SFG-Spektroskopie an EPL-Membranen zur Analyse der Lipidordnung.....	75
Abbildung 27: Brewster-Winkel-Mikroskopie an EPL-Membranen.....	76

Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopie des Aquaglyceroporins GlpF in An- und Abwesenheit von 2-PEtOH.	77
Abbildung 29: <i>In vivo</i> Oligomerisierung von GlpF bei steigenden 2-PEtOH-Konzentrationen.	78
Abbildung 30: GlpF-Aktivität in der inneren <i>E. coli</i> -Membran bei steigenden 2-PEtOH-Konzentrationen.	79
Abbildung 31. Sequenzvergleich zwischen GlpF und den humanen Aquaporinen.....	82
Abbildung 32: Strukturvergleich zwischen GlpF und humanem AQP2.....	82
Abbildung 33: Oligomerisierungsverhalten des GlpF-Wildtyps und von GlpF-V71M <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	84
Abbildung 34: Funktion der GlpF-Mutante V71M.	85
Abbildung 35: Mögliche Interaktionen der fusionierten GlpF-Homooligomere und - Heterotetramere.	88
Abbildung 36: Mit Lipiden bzw. Glycerol interagierende GlpF-Aminosäuren.	96
Abbildung 37: Schematische Darstellung des Einflusses unterschiedlicher Lipide auf die Oligomerisierung und Aktivität von GlpF.....	98
Abbildung 38: Verteilung und Emissionseigenschaften von Laurdan in der phasenseparierten Lipidmembranen.....	100
Abbildung 39: Die Aquaporin-Translokationspore.....	105

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Enzyme und dazugehörige Puffer.	27
Tabelle 2: Verwendete Kits und Größenstandards.	27
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	28
Tabelle 4: Verwendete Geräte.	28
Tabelle 5: Verwendete Puffer, Lösungen und Kulturmedien.	30
Tabelle 6: Verwendete <i>E. coli</i> -Stammkulturen.	33
Tabelle 7: Verwendete Antikörper.	34
Tabelle 8: Verwendete Plasmide.	34
Tabelle 9: Verwendete Computerprogramme.	35
Tabelle 10: PCR Standardreaktionsansatz.	37
Tabelle 11: PCR-Temperatur-Zeitprogramm.	38
Tabelle 12: Primer für die ortspezifische Mutagenese.	39
Tabelle 13: Primer für die Klonierung der künstlichen GlpF-Fusionsvarianten.	41
Tabelle 14: Primer für die Klonierung des Venus-GlpF-Fusionsproteins.	41
Tabelle 15: Sequenzierprimer.	42
Tabelle 16: Variable Parameter zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	43
Tabelle 17: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele nach Laemmli.	44
Tabelle 18: Dicke des hydrophoben Kerns von PC-Doppellipidschichten.	64



9 Anhang

9.1 Material und Methoden

Tabelle A 1: Verwendete Chemikalien und Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
Aceton VWR	VWR, Ismaning
Acrylamid 4K-Lösung (40%), Mix 37,5:1	AppliChem, Darmstadt
Adonitol	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, München
Riderserumalbumin (100x) (BSA, engl.: <i>bovine serum albumin</i>)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Calciumchlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	VWR, Ismaning
Coomassie Brilliant Blau R250	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Finnzymes, Espoo, Finnland
n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)	Roth, Karlsruhe
Desoxiribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas
<i>E. coli</i> Polar Lipid Extract	Avanti, Alabaster, AL, USA
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Sigma-Aldrich, München- Aldrich
Ethanol	VWR, Ismaning
Ethidiumbromid (1%)	AppliChem, Darmstadt
Glycerin wasserfrei	AppliChem, Darmstadt
HCl (37%)	VWR, Ismaning
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem, Darmstadt
Imidazol	AppliChem, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin Sulfat	Fluka, Taufkirchen
6-Dodecanoyl-N,N-dimethyl-2-naphtylamin (Laurdan)	Sigma-Aldrich, München

Chemikalie	Hersteller
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid 50mM	Finnzymes, Espoo, Finnland
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol, technisch	AppliChem, Darmstadt
N-Methylglucamin	Acros Organics, Morris Plains, NJ, USA
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, München-Aldrich
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Venlo, Niederlande
o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG)	Fluka, Taufkirchen
Octyl- β -D-glucopyranosid (OG)	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol (PEG) 4000	Roth, Karlsruhe
2-Phenylethanol	Sigma-Aldrich, München
2-Propanol	Sigma-Aldrich, München
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
Wasser (sterile, Nuklease frei)	Sigma-Aldrich, München

Tabelle A 2: Bezeichnung der verwendeten Phospholipide.

Kurzbezeichnung	Vollständiger Name	R1	R2	Ladung
diC14:1-PC	1,2-Dimyristoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	14:1	14:1	0
diC16:1-PC	1,2-Dipalmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	16:1	16:1	0
diC18:1-PC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	18:1	18:1	0
diC20:1-PC	1,2-Dieicosenoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	20:1	20:1	0
diC22:1-PC	1,2-Dierucoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	22:1	22:1	0
diC18:1-PE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin	18:1	18:1	0

Kurzbezeichnung	Vollständiger Name	R1	R2	Ladung
diC18:1-PG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol)	18:1	18:1	-1
diC18:1-PS	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serine	18:1	18:1	-1
tetrC18:1-CL	1',3'-Bis[1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho]- <i>sn</i> -glycerol	/	/	-2
EPL	<i>E. coli</i> polar lipid extract	/	/	/

9.2 Funktion und Oligomerisierung fusionierter GlpF-Monomere

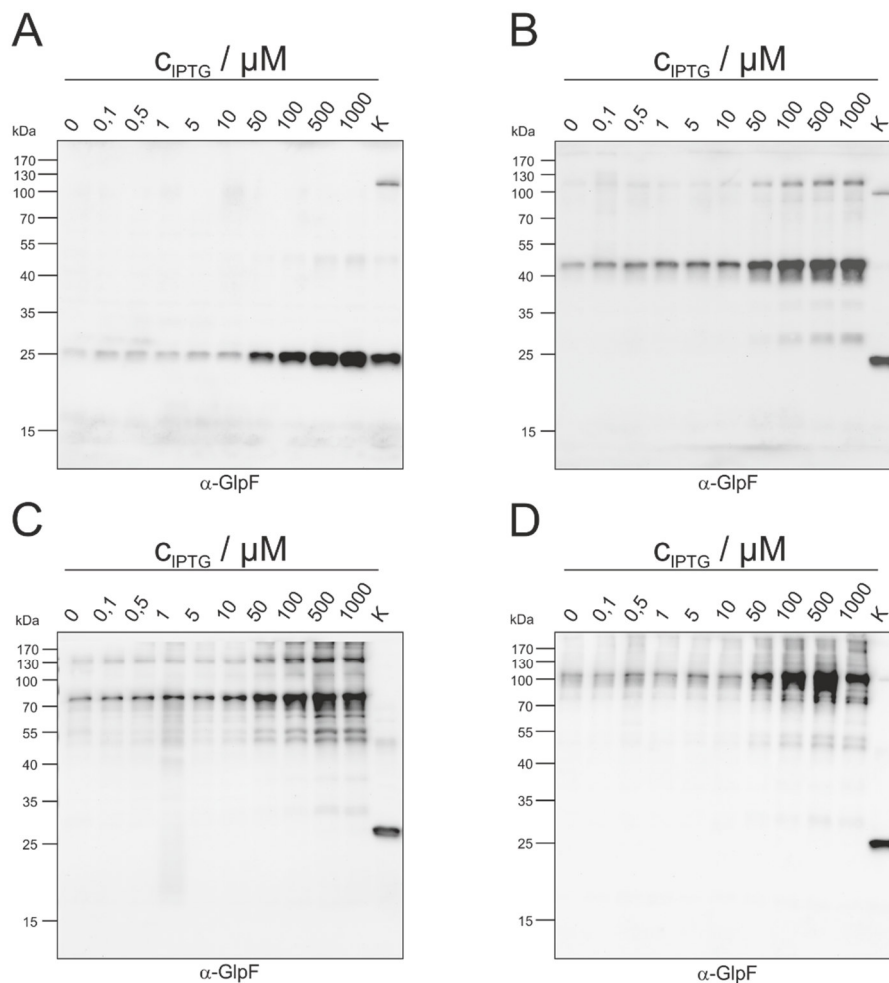


Abbildung A 1: Western Blot-Analyse zur Expressionskontrolle der fusionierten GlpF-Homooligomere in *E. coli* SK46-Zellen.

Zur Kontrolle des Expressionsniveaus der verschiedenen fusionierten GlpF-Homooligomere in *E. coli* SK46-Zellen wurden Western Blot-Analysen der *E. coli*-Membranen durchgeführt. Als Kontrolle (K) wurden in jeder Analyse 1xGlpF-haltige Membranen nach Induktion der Expression mit 500 μM IPTG verwendet. (A) 1xGlpF. (B) 2xGlpF. (C) 3xGlpF. (D) 4xGlpF. Es wurden jeweils 2,4 μg Gesamtprotein aufgetragen.

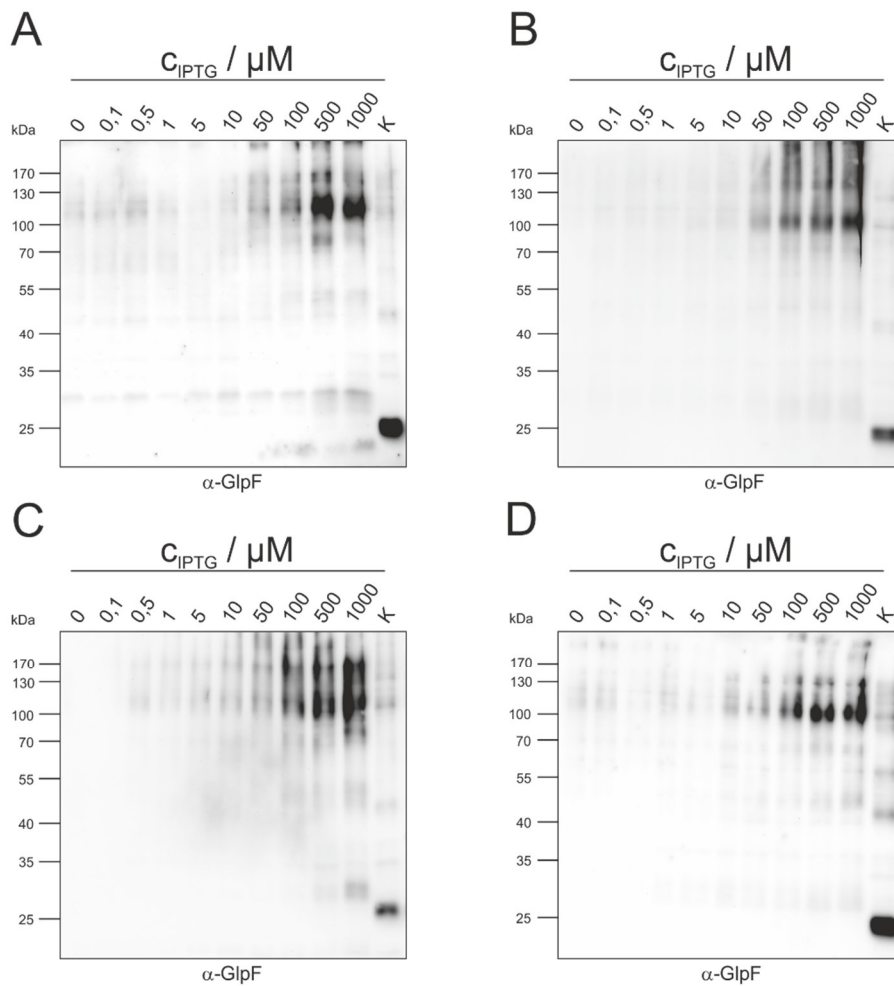


Abbildung A 2: Western Blot-Analyse zur Expressionskontrolle der fusionierten GlpF-Tetramere mit steigenden Anteilen an mutierten Monomeren in *E. coli* SK46-Zellen.

Zur Kontrolle des Expressionsniveaus der verschiedenen GlpF-Heterotetramere in *E. coli* SK46-Zellen wurden Western Blot-Analysen der *E. coli*-Membranen durchgeführt. Als Kontrolle (K) wurden in jeder Analyse 1xGlpF-haltige Membranen nach Induktion der Expression mit 500 μM IPTG verwendet. (A) 3xGlpF-1xGlpF-E43A. (B) 2xGlpF-2xGlpF-E43A. (C) 1xGlpF-3xGlpF-E43A. (D) 4xGlpF-E43A. Es wurden jeweils 2,4 μg Gesamtprotein aufgetragen.

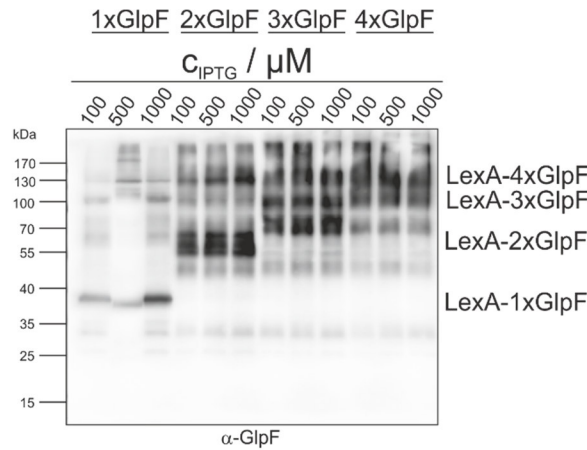


Abbildung A 3: Western Blot-Analyse zur Expressionskontrolle der fusionierten LexA-GlpF-Homooligomere in *E. coli*-NT326-Zellen.

Zur Kontrolle des Expressionsniveaus der verschiedenen GlpF-Homooligomere in den GALLEX-Messungen wurden Western Blot-Analysen der *E. coli*-Membranen durchgeführt. Zum direkten Vergleich der Intensitäten der verschiedenen Homooligomer-Banden wurden Membranen nach Induktion mit 100, 500 und 1000 μM IPTG verwendet. Es wurden jeweils 2,4 μg Gesamtprotein aufgetragen.

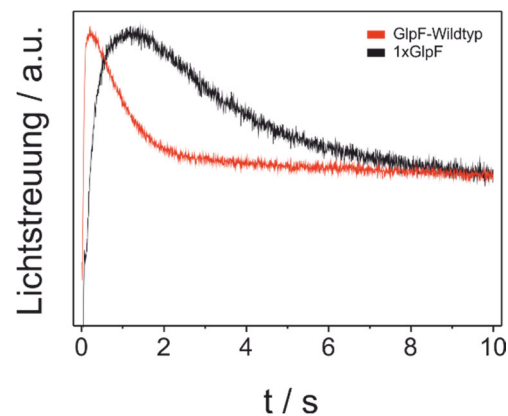


Abbildung A 4: Aktivität des GlpF-Wildtyps und des GlpF-Monomers 1xGlpF.

Zur Bestimmung der Aktivität des GlpF-Wildtyps und des GlpF-Monomers 1xGlpF wurde die Kinetik des Ribitolflusses an einem *Stopped-Flow*-UV/Vis-Spektrometer analysiert. Gezeigt sind die Streulichtkurven des GlpF-Wildtyps (rot) und des GlpF-Monomers 1xGlpF (schwarz) nach Induktion mit 500 μM IPTG. Die Kurven sind aus fünf Messungen gemittelt. Obwohl das GlpF-Monomer 1xGlpF sich nur durch 6 Aminosäuren am N-Terminus (MSGGLE) vom GlpF-Wildtyp unterscheidet, ist die Aktivität des GlpF-Monomers 1xGlpF im Vergleich zum GlpF-Wildtyp deutlich eingeschränkt.

9.3 Einfluss definierter Phospholipide auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF

Tabelle A 3: Größenbestimmung der Proteoliposomen mit steigenden Acylkettenlängen und EPL.

Probe	Z-Mittel (r / nm)	PDI	Zahlenmittel (r / nm)
diC14:1-PC	1925	0,680	79
diC16:1-PC	3086	0,374	31
diC18:1-PC	124	0,814	38
diC20:1-PC	601	1,000	31
diC22:1-PC	436	1,000	26
EPL	347	0,727	43

Tabelle A 4: Größenbestimmung der Proteoliposomen mit steigendem PE-Stoffmengenanteil.

mol% diC18:1-PE	Z-Mittel (r / nm)	PDI	Zahlenmittel (r / nm)
0	124	0,814	38
10	438	1,000	42
20	361	1,000	43
30	717	1,000	38
40	1213	1,000	40
50	902	1,000	39
60	787	1,000	37
70	184	0,745	48

Tabelle A 5: Größenbestimmung der Proteoliposomen mit steigendem PG-Stoffmengenanteil.

mol% diC18:1-PG	Z-Mittel (r / nm)	PDI	Zahlenmittel (r / nm)
0	124	0,814	38
10	109	0,615	33
20	132	0,640	38
30	124	0,668	35
40	110	0,678	33
50	103	0,582	47
60	84	0,516	37
70	79	0,465	41
80	99	0,557	47
90	106	0,578	47
100	178	0,833	64

Tabelle A 6: Größenbestimmung der Proteoliposomen mit steigendem CL-Stoffmengenanteil.

mol% tetrC18:1-CL	Z-Mittel (r / nm)	PDI	Zahlenmittel (r / nm)
0	124	0,814	38
2	188	1,000	47
4	264	1,000	41
5	174	1,000	37
6	235	1,000	48
8	198	1,000	28
10	209	1,000	40
15	250	0,792	25
20	231	0,716	33
25	226	0,687	24
30	221	0,650	26

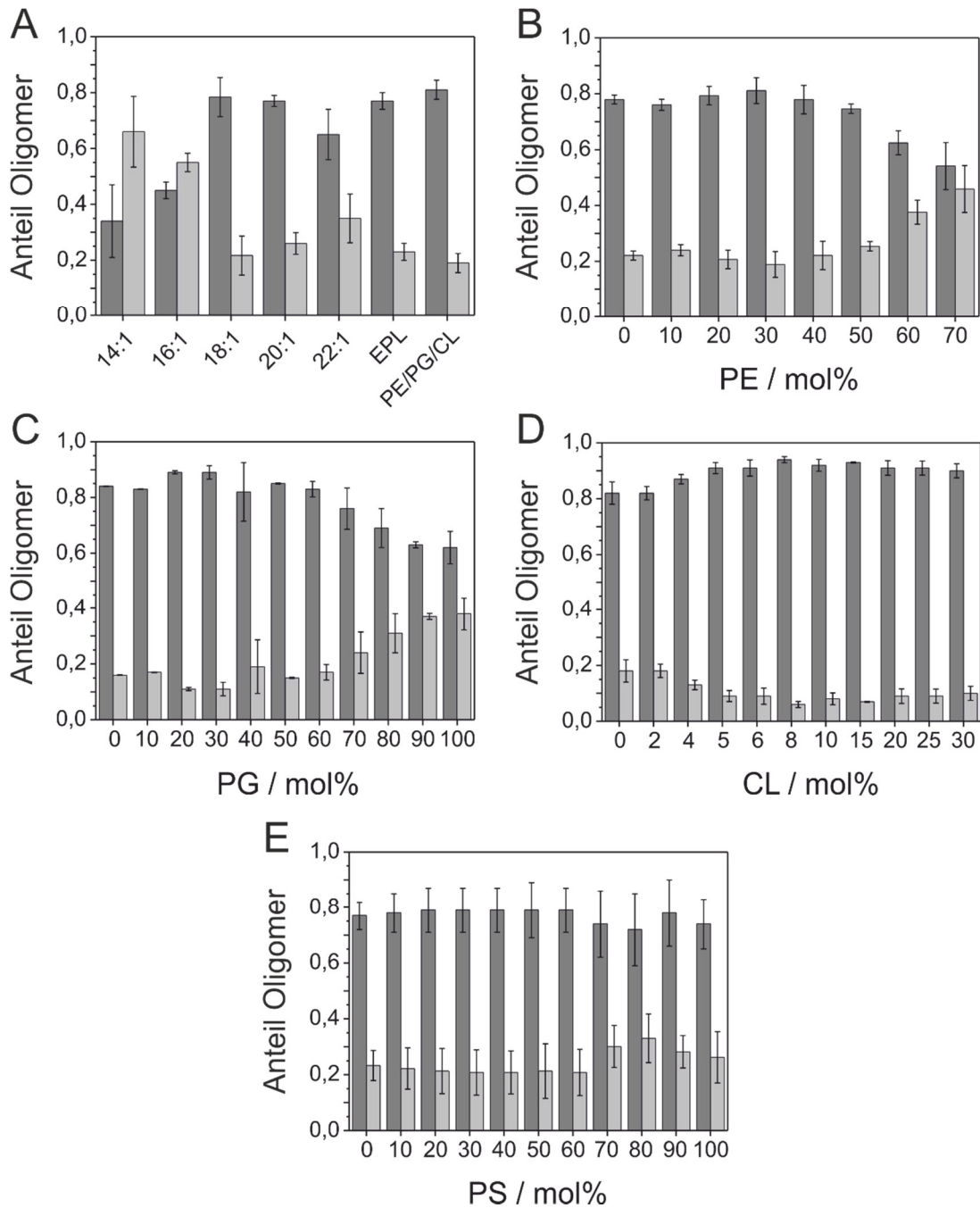


Abbildung A 5: GlpF-Tetramerstabilität in Liposomen mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung.

Der Oligomerisierungsgrad von GlpF in Liposomen mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung wurde mittels einer semi-nativen SDS-PAGE-Analyse erfasst und die Proteinbandenintensitäten des GlpF-Tetramers, -Dimers und -Monomers mit dem Programm ImageJ grafisch erfasst. Aufgezeigt sind die Anteile an tetramerem GlpF (dunkelgrau) sowie die Summe der Anteile an monomerem und dimerem GlpF (hellgrau) in Abhängigkeit der Lipidzusammensetzung der Liposomen. (A) Inkorporation in PC-Membranen steigender Acylkettenlänge sowie in EPL- und PE/PG/CL-Membranen. Inkorporation in Liposomen mit steigendem (B) PE-, (C) PG-, (D) CL- und (E) PS-Stoffmengenanteilen.

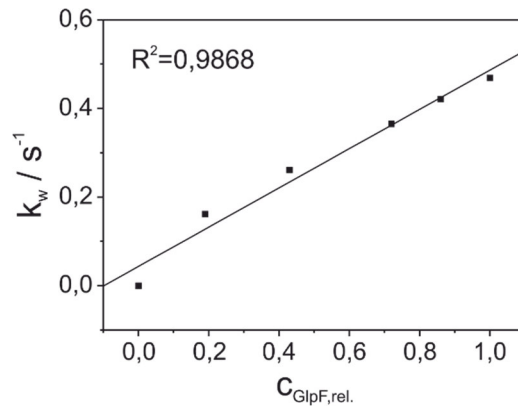


Abbildung A 6: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der GlpF-Konzentration.

Zwischen der Menge an inkorporiertem GlpF und der GlpF-Aktivität besteht ein linearer Zusammenhang. Steigende Mengen an GlpF (3-15 μ M) wurden bei konstanter Lipidkonzentration (5 mM) in Liposomen inkorporiert. Die Menge an inkorporiertem GlpF wurde durch eine SDS-PAGE-Analyse bestimmt und gegen die gewichtete Geschwindigkeitskonstante k_w aufgetragen.

9.4 *In vivo* Einfluss veränderter physikochemischer Membraneigenschaften auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF

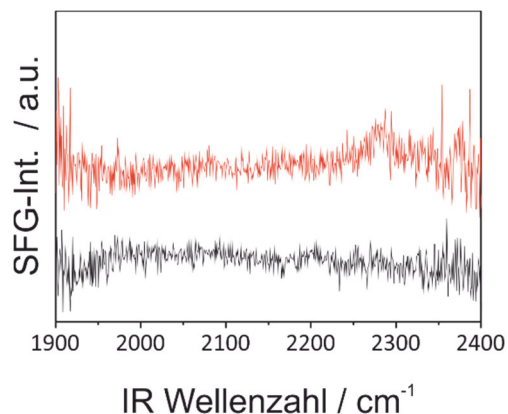
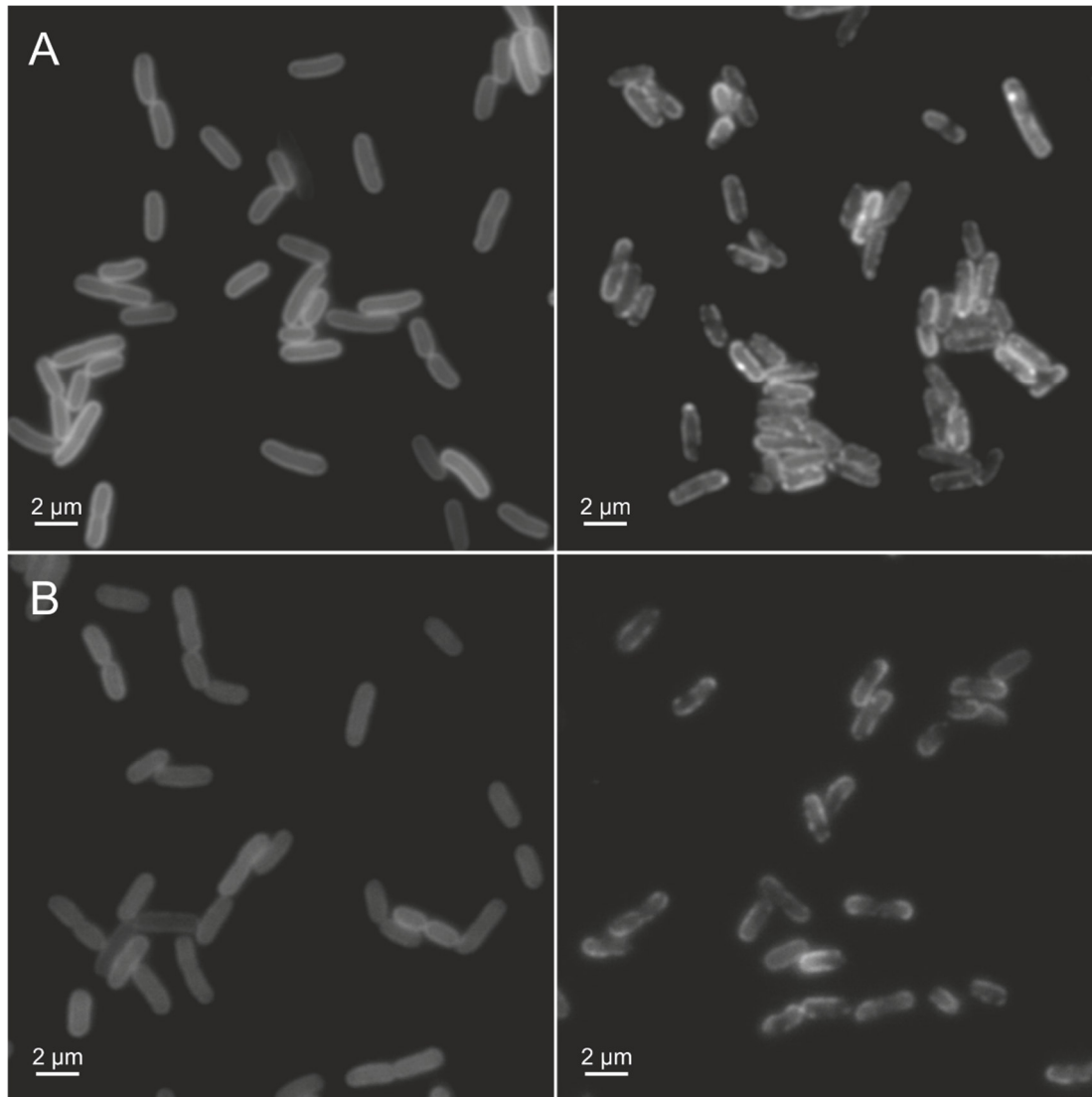


Abbildung A 7: SFG-Spektren im Bereich der C-D-Molekülschwingungen.

SFG-Spektren der EPL-Monolagen vor (schwarz) und nach (rot) Injektion von 2-Phenyl- d_5 -ethan-1,1,2,2- d_4 -ol im Bereich der C-D-Molekülschwingungen. Die Spektren wurden in der ssp Polarisationskombination aufgenommen. Aufgrund der Molekülsymmetrie ist nur ein SFG-Signal bei 2300 cm^{-1} zu detektieren. Es sind keine Beiträge von Molekülschwingungen der CD_2 -Gruppen zu erkennen. (In Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz).



0 mM 2-PEtOH

16 mM 2-PEtOH

Abbildung A 8: Verteilung der Transmembranproteine NagE und PtsG in der inneren *E. coli*-Membran.

Die polytopen *E. coli*-Transmembranproteine sind mit dem gelb fluoreszierenden Protein (YFP) fusioniert und die Verteilung in der inneren *E. coli*-Membran von MG1655-Zellen wurde unter natürlichen Bedingungen (0 mM 2-PEtOH) und nach Inkubation mit 16 mM 2-PEtOH untersucht. (A) YFP-NagE. (B) YFP-PtsG (In Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg).

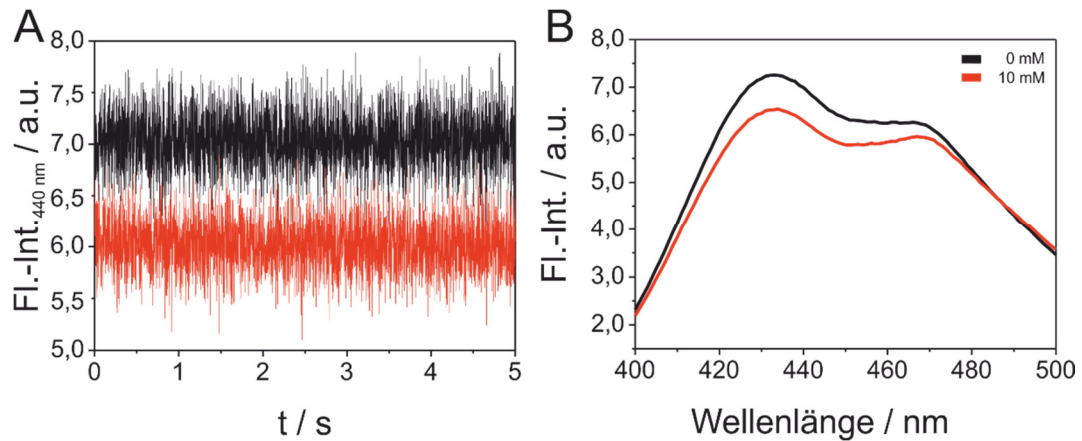


Abbildung A 9: Kinetik der Insertion von 2-PEtOH in EPL-Membranen.

Um die Kinetik der Insertion von 2-PEtOH in die Lipidmembran zu bestimmen wurden, an einem *Stopped-Flow*-UV/VIS-Spektrometer mit 0,2 mol% Laurdan versetzte EPL-Liposomen mit steigenden 2-PEtOH-Konzentrationen gemischt und nach Anregung bei 340 nm die Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 440 nm verfolgt. Beispielhaft sind die Messungen mit 2-PEtOH-Endkonzentrationen von 0 und 10 mM 2-PEtOH gezeigt. Die Insertion von 2-PEtOH in die EPL-Membranen erfolgt schneller als 1 ms (Totzeit des *Stopped-Flow*-UV/VIS-Spektrometers), da die gemessene Fluoreszenzintensität bei 440 nm unmittelbar verringert ist und den Endwert erreicht hat, der auch unter Gleichgewichtsbedingungen (siehe Fluoreszenzspektrum) gemessen wurde. (B) *Steady State* Fluoreszenzspektrum der Laurdan-Fluoreszenzemission nach Anregung bei 340 nm im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 500 nm.

9.5 GlpF als Modell für humane Aquaporine: Einfluss einer Punktmutation auf die Oligomerisierung und Funktion des Aquaglyceroporins GlpF

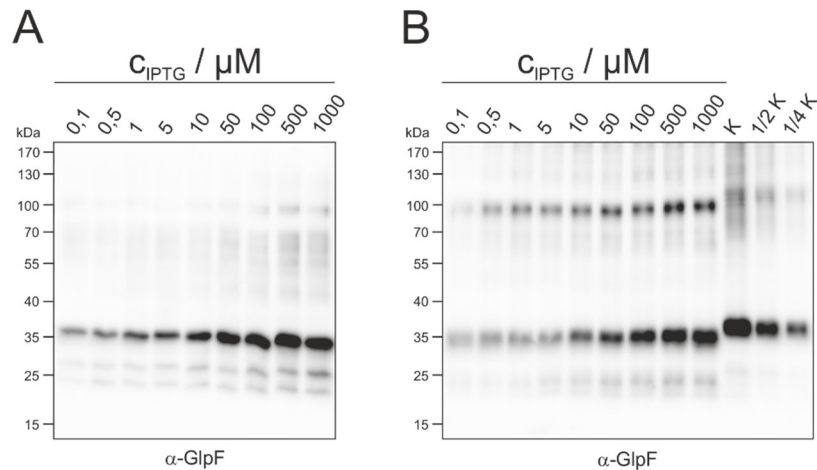


Abbildung A 10: Western Blot-Analyse zur Kontrolle des Expressionsniveaus von GlpF-Wildtyp und GlpF-V71M in NT326-Zellen.

Zur Kontrolle des Expressionsniveaus des GlpF-Wildtyps und der Mutante V71M in *E. coli* NT326-Zellen wurden die GlpF-haltigen Membranen isoliert und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Von links nach rechts sind isolierte Membranen nach Induktion mit steigenden IPTG-Konzentrationen gezeigt. Als Kontrolle (K) wurde in der Analyse von GlpF-V71M Membranen des GlpF-Wildtyps nach Induktion mit 500 μM IPTG verwendet. (A) GlpF-Wildtyp. (B) GlpF-V71M. Es wurden jeweils 2,4 μg Gesamtprotein aufgetragen.

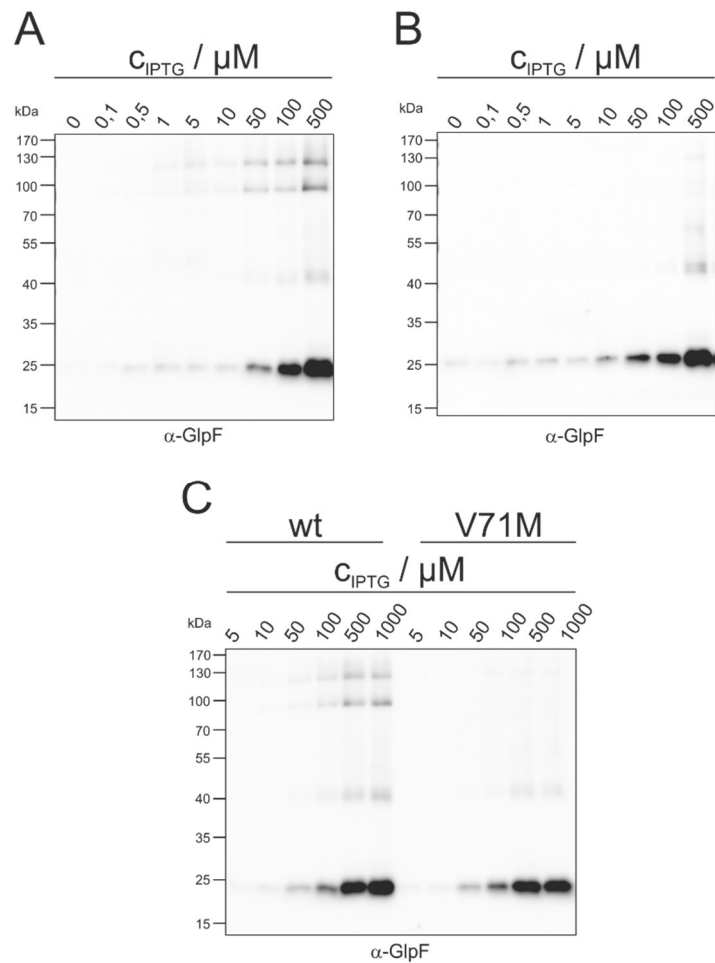


Abbildung A 11: Western Blot-Analyse zur Kontrolle des Expressionsniveaus von GlpF-Wildtyp und GlpF-V71M in SK46-Zellen.

Zur Kontrolle des Expressionsniveaus des GlpF-Wildtyps und der Mutante V71M in *E. coli* SK46-Zellen wurden GlpF-haltige Membranen isoliert und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Von links nach rechts sind isolierte Membranen nach Induktion mit steigenden IPTG-Konzentrationen gezeigt. (A) GlpF-Wildtyp. (B) GlpF-V71M. (C) Zum Quantifizieren des Expressionsniveaus wurden die GlpF-haltigen Membranen nach Induktion mit 5-1000 μM IPTG auf ein Gel aufgetragen und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Es wurden jeweils 2,4 μg Gesamtprotein aufgetragen.

Danksagung

Lebenslauf