

Zellfreie Synthese von schwer herstellbaren Proteinen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Sinja Bock

Kiel 2014

Erster Gutacher:

Prof. Dr. Eric Beitz

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Axel Scheidig

Tag der mündlichen Prüfung:

19.03.2014

Zum Druck genehmigt:

19.03.2014

gez. Prof. Dr. Wolfgang Duschl, Dekan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 Zellfreie Proteinsynthese	5
1.2 Schwierige Proteine	9
1.2.1 Aquaporin 11	10
1.2.2 Aquaporin 6	12
1.2.3 Formiat-Nitrit Transporter	13
1.2.4 Influenza M2 Protonenkanal	14
1.3 Faltung	15
1.4 Ziel	17
2 Material	19
2.1 Chemikalien und Enzyme	19
2.2 Geräte	22
2.3 Verwendete Plasmide	25
2.4 Verwendete Primer und Oligonukleotide	27
2.5 <i>E. coli</i> Stämme	27
2.6 <i>D. discoideum</i> Stamm	28
2.7 Protein codierende DNA	28
2.8 Antikörper	29
2.9 Puffer und Medien	29
2.9.1 Nucleinsäureanalytik	29

2.9.2	Proteinanalytik	30
2.9.3	Zellfreie Proteinsynthese	31
2.9.4	Surfe ² r Messungen	33
2.9.5	Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	33
2.9.6	Kristallisation	34
3	Methoden	39
3.1	Nukleinsäureanalytik	39
3.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	39
3.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	40
3.1.3	Kultivierung von <i>E. coli</i> und Anlegen von Dauerkulturen . . .	40
3.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
3.1.5	Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	41
3.1.6	DNA-Sequenzierung	41
3.1.7	DNA-Modifikationen	42
3.1.8	Mutagenese-Polymerasekettenreaktion	43
3.2	Codonoptimierung von DNA Sequenzen	43
3.3	Proteinanalytik	44
3.3.1	Quantitative Bestimmung	44
3.3.2	SDS PAGE	45
3.3.3	Western-Blotting	46
3.4	Zellfreie Proteinsynthese	47
3.4.1	S30 Extrakt Herstellung	47
3.4.2	T7-RNA-Polymerase Herstellung	48
3.4.3	Analytischer Ansatz	49
3.4.4	Präparativer Ansatz	51
3.4.5	Proteinreinigung der Ansätze	53
3.4.6	Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz	54
3.5	Kristallisation von PffNT	55
3.6	Proteoliposomen	56
3.6.1	Rekonstitution von Proteinen	56
3.6.2	Saccharose Gradient	57
3.7	Dynamische Lichtstreuungsmessung mit der <i>Stopped Flow</i> Apparatur	58
3.7.1	<i>Stopped Flow</i> Parameter	59
3.7.2	Auswertung der <i>Stopped Flow</i> Kurven	60

3.8	SURFE ² R Messungen	60
3.8.1	Herstellung von Proteoliposomen für SURFE ² R Messungen . .	60
3.8.2	Proteoliposomen mit Gramacidinporen	61
3.8.3	Sensorpräparation	61
3.8.4	Durchführung der SURFE ² R Messungen	62
3.8.5	Auswertung der SURFE ² R Messungen	64
3.9	Berechnung zum Wachstumsverhalten im <i>Batch</i> -Verfahren	64
3.10	Proteinherstellung und Funktionstestung in <i>Dictyostelium discoideum</i>	66
3.10.1	Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	66
3.10.2	Anlegen von <i>D. discoideum</i> Dauerkulturen und Entwicklung zu Sporen	66
3.10.3	Transformation von <i>D. discoideum</i>	67
3.10.4	Probenvorbereitung der Amöben für Western-Blotting	68
3.10.5	Probenvorbereitung der Amöben für <i>Stopped Flow</i> Messungen	68
3.10.6	Fluoreszenzmikroskopie	68
4	Ergebnisse	71
4.1	Zellfreie Proteinsynthese	71
4.1.1	S30 Extrakt Herstellung	71
4.1.2	T7-RNA-Polymerase Herstellung	75
4.1.3	Analytischer und präparativer Ansatz	76
4.1.4	Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz	82
4.1.5	Zellfreie Herstellung des Aquaporin 11	82
4.2	Mutagenese des internen GFP-Startcodons	86
4.3	Codonoptimierung von DNA Sequenzen	87
4.3.1	Codon Usage der <i>P. falciparum</i> Sequenzen	88
4.3.2	Codon Usage der optimierten <i>P. falciparum</i> Sequenzen	88
4.3.3	Zellfreie Expression nach der Codonoptimierung	93
4.4	Kristallisation von PffNT	95
4.5	Proteoliposomen	97
4.5.1	Saccharosegradient	99
4.6	Dynamische Lichtstreuungsmessung mit der <i>Stopped flow</i> Apparatur	101
4.7	SURFE ² R Messungen	102
4.7.1	Etablierung des SURFE ² R Systems mit Gramacidin	102
4.7.2	Influenza M2 Protonenkanal Messungen	106
4.7.3	Aquaporin 6	109

4.8	Proteinherstellung und Funktionstestung in <i>Dictyostelium discoideum</i>	110
4.8.1	Klonierung der <i>D. discoideum</i> Konstrukte	110
4.8.2	Transformation von <i>D. discoideum</i>	111
4.8.3	Western-Blotting und Fluoreszenzmikroskopie der in <i>D. discoideum</i> hergestellten Proteine	112
4.8.4	<i>Stopped Flow</i> Messungen mit <i>D. discoideum</i>	114
5	Diskussion	117
5.1	Zellfreie Proteinsynthese	117
5.2	Mutagenese des internen GFP-Startcodons	121
5.3	Codonoptimierung von DNA Sequenzen	122
5.4	Kristallisation von PffNT	124
5.5	Proteoliposomen	125
5.6	Dynamische Lichtstreuungsmessungen mit der <i>Stopped Flow</i> Apparatur	127
5.7	SURFE ² R Messungen	127
5.8	Proteinherstellung und Funktionstestung in <i>D. discoideum</i>	131
	Ausblick	135
	Literaturverzeichnis	137
	Lebenslauf	154
	Eidesstattliche Erklärung	155

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ADP	Adenosindiphosphat
A+T Gehalt	Adenin-Thymin-Gehalt
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CFU	<i>Colony forming units</i>
CMC	<i>critical micelle concentration</i> , kritische Mizellbildungskonzentration
CTP	Cytidintriphosphat
NTP	Nukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FM	<i>Feeding Mix</i>
fw	<i>forward</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hemagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB Medium	Luria-Bertani Medium
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

Inhaltsverzeichnis

MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
μ	spezifische Wachstumsrate
n	Anzahl
N	Zellzahlkonzentration (Zellzahl pro Volumen)
ν	spezifische Teilungsrate
β -OG	β Octylglycosid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PEG	Polyethylenglycol
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
Psi	<i>Pound-force per square inch</i>
RM	<i>Reaction Mix</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
rv	<i>reverse</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SPB	Sörensen-Phosphat Puffer
t_d	Verdopplungszeit
t_g	Generationszeit
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UTP	Uridintriphosphat
vvm	Luftvolumen pro Fermentervolumen pro Minute (1/(l · min))
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x	Biomassekonzentration
x_0	Biomassekonzentration zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase
YTPG Medium	Hefe-Tryptophan-Pepton-Glukose Medium

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der Vorgänge in einem CECF Verfahren. . .	7
1.2	Ermittlung der optimalen Magnesiumkonzentration mit dem Testprotein GFP (Grün Fluoreszierenden Protein) für einen S30 Extrakt . .	8
1.3	<i>Multiple Sequence Alignment</i> von kristallisierten Aquaporinen einschließlich AQP11	11
1.4	Die Struktur von FocA aus <i>Vibrio cholerae</i>	13
1.5	NMR Struktur eines Influenza A M2 Protonenkanals	14
2.1	pDXA-GFP2	25
2.2	pET21-hAQP6	25
2.3	pIVEX2.3w	26
2.4	pIVEX2.3wGFP	26
2.5	Verschiedene Kristallisationspuffer aus MemGold 1 und 2 (Molekular Dimensions)	34
3.1	Technische Zeichnungen der Reaktionsgefäße für den analytischen Ansatz	51
3.2	Technische Zeichnungen des Reaktionsgefäßes für den präparativen Ansatz	53
3.3	Foto des Reaktionsgefäßes für den präparativen Ansatz	53
3.4	Diskontinuierlicher Saccharose Gradient	58
4.1	Verhalten des Fermenters beim Aufheiz- und Abkühlvorgang.	72
4.2	Fermentation der BL21(DE3) <i>E. coli</i> Zellen bis zur stationären Phase	72
4.3	Chargen der Fermentation von BL21 <i>E. coli</i> Zellen für den S30 Extrakt.	73
4.4	Vergleich verschiedener Protokolle zur S30 Extrakterstellung.	74

4.5	Absorption der erhaltenen Fraktionen nach der Ionenaustauschchromatographie	75
4.6	Western-Blotting von ausgewählten Fraktionen der T7-RNA-Polymerase und Effizienz der Chargen.	76
4.7	Erster Detergenzienscreen von EcFocA-GFP.	77
4.8	Präparativ hergestelltes EcFocA-GFP in Brij58.	77
4.9	Vergleich von nicht gereinigten Ansätzen mit den gereinigten Ansätzen.	78
4.10	Detergenzienscreens aller zellfrei Hergestellten Proteine	79
4.11	In-Gel Fluoreszenzintensitäten der getesteten Detergenzien von allen zellfrei hergestellten Proteinen.	81
4.12	Silberfärbung vom zellfrei hergestellten Protein Amoebapore A.	81
4.13	Korrelation der Methoden zur Fluoreszenzquantifizierung von M2-GFP.	82
4.14	Detergenzienscreen vom hAQP11-GFP mit verschiedenen Detergenzien und variierender Brij78 Konzentration	83
4.15	Nickelreinigung des hAQP11-GFP aus dem präparativen Ansatz mit verschiedenen Detergenzien.	85
4.16	Beim pIVEX2.3wGFP Plasmid werden die beiden Startmethionine durch Asparagin und Valin ersetzt.	86
4.17	Detergenzienscreen von rUT-B-GFP mit und ohne mutierte Startmethionine.	87
4.18	In-Gel Fluoreszenz und Westernblot vom Detergenzienscreen von zellfrei hergestelltem PffNT-GFP vor der Optimierung	87
4.19	Einzelne Codonhäufigkeiten von <i>pffnt</i> vor der Optimierung.	89
4.20	Einzelne Codonhäufigkeiten von <i>pffnt</i> nach der Optimierung.	89
4.21	Optimierte DNA Sequenz von <i>pffnt</i>	90
4.22	Optimierte DNA Sequenz von <i>pf75</i>	91
4.23	Optimierte DNA Sequenz von <i>pf70</i>	92
4.24	In-Gel Fluoreszenz und Westernblot vom Detergenzienscreen von zellfrei hergestelltem PffNT-GFP nach der Optimierung	93
4.25	In-Gel Fluoreszenz und Westernblot vom Detergenzienscreen von zellfrei hergestelltem Pf70-GFP und Pf70 nach der Optimierung	94
4.26	In-Gel Fluoreszenz und Westernblot vom Detergenzienscreen von zellfrei hergestelltem Pf75-GFP und Pf75 nach der Optimierung	94
4.27	Das für die Kristallisationsansätze verwendete PffNT.	95
4.28	Die ersten erfolgreiche dreidimensionale Kristalle.	96
4.29	Reproduktion der erfolgreichen Kristallisationsbedingungen.	97

4.30	Ablauf einer Rekonstitution mit ihren Variablen.	98
4.31	Saccharosegradient von EcFocA-GFP Proteoliposomen.	100
4.32	Verschiedene Aufarbeitungsmöglichkeiten der Saccharosegradienten- fraktionen.	100
4.33	Saccharosegradient von hAQP11 rekonstituiert mit verschiedenen De- tergenzien.	101
4.34	<i>Stopped flow</i> Wasserleitfähigkeitsmessungen von AQP11 in Proteoli- posomen.	102
4.35	Typische Kurven einer SURFE ² R Messungen mit Gramicidin.	103
4.36	SURFE ² R Messungen mit Gramicidin.	105
4.37	SURFE ² R Messungen mit Gramicidin mit NaCl-gefüllten Proteolipo- somen.	105
4.38	SURFE ² R Messungen mit dem M2-GFP Protonenkanal.	106
4.39	Inhibitionsmessungen des mit Amphipol hergestellten M2-GFP Pro- tonenkanals.	107
4.40	Saccharosegradienten, der für die SURFE ² R Messungen verwendete Proteoliposomen	108
4.41	SURFE ² R Messungen mit dem hAQP6.	110
4.42	Westernblot und In-Gel Fluoreszenz von <i>D. discoideum</i> Gesamtpro- teinen mit GFP-hAQP1, GFP-hAQP11 und GFP.	112
4.43	Fluoreszenzmikroskopie von <i>D. discoideum</i> mit hAQP11, hAQP1 und dem pDXA-GFP2 Leervektor.	113
4.44	<i>Stopped Flow</i> Messungen von <i>D. discoideum</i> mit hAQP11, hAQP1, dem pDXA-GFP2 Leervektor und Wildtypzellen.	114

Tabellenverzeichnis

3.1	PCR Programm für Sequenzierungs-PCR	42
3.2	PCR Programm für Mutagenese-PCR	43
3.3	Zusammensetzung von 12,5 % und 15 % SDS Gelen	46
3.4	Pipettierschema für einen analytischen Ansatz	50
3.5	Pipettierschema für einen präparativen Ansatz	52
3.6	Verwendete Detergenzien sowie deren Konzentrationen	54
3.7	<i>Stopped Flow</i> Einstellungen zur Vermessung von Proteoliposomen und <i>D. discoideum</i>	59
3.8	Sequenz einer SURFE ² R Messung	63
3.9	Sequenz der SURFE ² R Gramicidin-Messungen	63
3.10	Sequenz der SURFE ² R AQP6-Messungen	63
3.11	Sequenz der SURFE ² R EcFocA und PffNT Messungen	63
4.1	Vergleich der S30 Extrakte.	74
4.2	Prozentuale Anteile je Bewertung nach Begutachtung aller Kristalli- sationsansätze.	95
4.3	Verwendete Enzymschnittstellen der Spenderkonstrukte und dem Emp- fängervektor.	111

Zusammenfassung

Die zellfreie Proteinsynthese ermöglicht es auf eine alternative Weise *in vitro* Proteine herzustellen, die in den traditionellen *in vivo* Expressionssystemen, wie *E. coli*, Hefe oder *Xenopus* Oozyten eher schwierig zu produzieren sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daraufhin eine Faltungskontrolle entwickelt, bei der mithilfe der Fluoreszenz eines C-Terminal fusionierten GFP (grün fluoreszierendes Protein) auf die richtige Faltung des Proteins geschlossen werden kann. Hierzu wurden verschiedene Membranproteine unterschiedlichen Ursprungs in einem *E. coli* basierten, zellfreien System mit dem Zusatz von Detergenzien hergestellt und teilweise funktionell getestet. So konnte der Influenza A M2 Protonenkanal zellfrei hergestellt, in Liposomen rekonstituiert und anschließend elektrophysiologisch getestet werden.

Ebenso ließ sich das humane intrazelluläre Membranprotein Aquaporin 11 (AQP11) zellfrei und in der sozialen Amöbe *Dictyostelium discoideum* herstellen, was zuvor nicht in *E. coli*, Hefe oder *Xenopus* Oozyten gelang. Zusätzlich konnte in beiden Systemen mittels *Stopped Flow* Messungen eine sieben- bis achtfach höhere Wasserleitfähigkeit als in den Negativkontrollen ohne AQP11 gezeigt werden.

Das Membranprotein PffNT, ein Formiat-Nitrit Transporter aus dem parasitären Malariaerreger *Plasmodium falciparum* konnte ebenfalls zellfrei hergestellt werden. Allerdings war es hier nötig die sehr Adenin+Thymin (A+T) reiche DNA-Sequenz dem A+T Gehalt und der Codonhäufigkeit des *E. coli* Genoms anzupassen. Dann war es möglich das PffNT in größeren Mengen herzustellen, so dass erste Kristallisationsversuche durchgeführt werden konnten. Diese führten aber vorerst zu keinem Erfolg.

Des Weiteren konnte das lösliche Protein Amoebapore A aus dem Parasiten *Entamoeba histolytica* zellfrei hergestellt werden. Hier war es zuvor nicht möglich das Protein aufgrund seiner Toxizität heterolog in *E. coli* Zellen zu exprimieren.

Mit der zellfreien Proteinherstellung lassen sich also auch schwierige Proteine schnell

Tabellenverzeichnis

herstellen. Es lassen sich innerhalb von zwei Tagen aus 1 ml Ansatz um die 2,3 mg Protein herstellen und soweit reinigen, dass sie für die Funktionstestung verwendet werden können.

Abstract

The cell-free expression system allows to produce *in vitro* protein in an alternative manner, instead of using traditional *in vivo* expression systems, such as *E. coli*, yeast or *Xenopus* oocytes for difficult-to-express proteins. In this work, a folding control was generated to indicate the proper folding of a protein by fluorescence with a C-terminally fused GFP (green fluorescent protein). Different membrane proteins from various origin were therefore expressed with detergents in a *E. coli* based, cell-free system and in part functional tested. This way, the Influenza A M2 proton channel could be cell-free expressed, reconstituted into liposomes and then tested electrophysically.

Furthermore, the intracellular human membrane protein Aquaporin 11 (AQP11) could also be expressed in the cell-free system as well as in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. Previously it was not possible to produce this protein in *E. coli*, yeast or *Xenopus* oocytes. Additionally, measurements with the stopped flow apparatus showed seven to eight times higher water conductance of AQP11 than the negative control without AQP11 in both systems.

The membrane protein PfFNT, a formate-nitrit transporter from the malaria parasite *Plasmodium falciparum* was also cell-free expressed. In this case it was necessary to adapt the DNA sequence with very high adenine+thymine (A+T) content to the A+T content and codon usage of a *E. coli* genome. Thereafter, it was possible to produce PfFNT in sufficient amounts to try crystallization, which was not successful for now.

Another cell-free expressed protein was the soluble protein Amoebapore A from the parasite *Entamoeba histolytica*. Before, it was impossible to express it heterologously in *E. coli* cells due to its cell toxicity.

In summary, the cell-free protein expression allows to rapidly produce difficult-to-express proteins. Within two days 2.3 mg protein from 1 ml reaction mix can be

Tabellenverzeichnis

generated in as pure quality as it is needed for functional testing.

1 | Einleitung

1.1 Zellfreie Proteinsynthese

Die Proteinsynthese beschreibt den Prozess der Neubildung von Proteinen. Sie beginnt mit der Transkription, bei der die Polymerase eine Gensequenz der DNA abschreibt und somit die mRNA herstellt. Im nächsten Schritt werden die Triplets der mRNA im Zusammenspiel von Ribosomen und tRNA in Aminosäuren translatiert, die verbunden die Polypeptidkette bilden. Diese falten sich anschließend zu dem gewünschten Protein. Dieser Prozess findet in allen Lebewesen statt. [1]

Wenn nun ein Protein auf seine Funktion untersucht oder die Struktur aufgeklärt werden soll, dann werden größere Mengen des isolierten Proteins benötigt. Dies kann erreicht werden, indem es aus dem Ursprungsorganismus gewonnen wird, wo es aber meist nicht in großen Mengen vorliegt oder durch heterologe Überexpression in gut charakterisierten Systemen. Hierfür können sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Zellen genutzt werden, die z. B. mithilfe von Vektoren mit einem starken Promotor das entsprechende Gen enthalten und dieses dann überexprimieren. Nachdem sich genügend Biomasse von Zellen mit dem entsprechenden Protein gebildet hat, werden die Zellen aufgeschlossen und das Protein isoliert. [2]

Doch was ist, wenn hierbei Komplikationen auftreten?

Für diesen Fall bietet es sich an, an andere Möglichkeiten zu denken, im Besonderen an die zellfreie Proteinsynthese. Bei dieser Methode findet sowohl der Transkriptions- als auch der Translationsprozess in einer künstlichen Umgebung statt. Hierfür werden DNA, Polymerase, Nukleotide, Aminosäuren sowie ein Extrakt mit Transkriptions- und Translationsfaktoren, ein energieregenerierendes System und weitere Substanzen zusammen gegeben, für ca. 20 Stunden bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag können die entstandenen Proteine zur Reinigung entnommen werden

1 Einleitung

[3]. Bei der Herstellung von Membranproteinen werden Detergenzien zur Solubilisierung bereits zu dem Ansatz gegeben, somit entfallen hier aufwendige Zentrifugationsschritte zur Gewinnung von Membranfraktionen, die anschließende Destabilisierung dieser und die Solubilisierung der Proteine.

Erste Versuche zur zellfreien Proteinherstellung wurden schon in den frühen 60er Jahren unternommen [4]. Allerdings wurden erst Ende der 80er Jahre höhere Ausbeuten von 5 bis 20 nmol Polypeptid pro 1 ml Ansatz erhalten [5].

Die zellfreie Proteinsynthese basiert maßgeblich auf einem aus Zellen gewonnenen Extrakt. Hierzu wird typischerweise für Proteine ohne posttranslationale Modifikationen der *E. coli*-Extrakt verwendet und bei Proteinen, bei denen posttranslationale Modifikationen nötig sind, Weizenkeimextrakte [6], CHO Zellextrakte [7], Kaninchen Retikulozyten Zellextrakt [8] und HeLa Zellextrakte [9]. Die Extrakte enthalten wichtige Transkriptions- und Translationsfaktoren sowie Ribosomen und Energieregulationssysteme [3]. In den eukaryotischen Systemen sind zusätzlich noch Faktoren für posttranslationale Modifikationen enthalten. Im Gegensatz zu prokaryotischen *E. coli* Zellen können hier keine *Inclusion Bodies* entstehen. Dafür besteht allerdings das Problem der Proteinpräzipitation, dem teilweise mit Detergenzien entgegen gewirkt werden kann.

Die Zellextrakte werden zusammen mit der benötigten Polymerase häufig selber hergestellt. Beim *E. coli* basierten S30 Extrakt wird z. B. innerhalb einer Woche aus 5 l *E. coli* Kultur Extrakt für 60 präparative 1 ml Ansätze gewonnen.

Daneben werden auch kommerzielle Systeme von PromegaTM, New England BioLabTM und Life TechnologiesTM angeboten, die preislich aber deutlich höher liegen als die selbst hergestellten zellfreien Systeme.

Neben den Extrakten unterscheiden sich die Systeme auch im Aufbau. So ist es möglich, die Reaktion in einem einzigen Kompartiment im *Batch* Verfahren ablaufen zu lassen. Es werden also keine Komponenten zu- oder abgeführt und die Reaktion dauert im Allgemeinen zwischen 0,5 und 2 Stunden [3]. Dieses Verfahren eignet sich besonders für das *Screening* vieler Bedingungen und es können die erhaltenen Proteinmengen laut F. Bernhard *et al.* (2013) für NMR Messungen ausreichen. [10]

Des Weiteren gibt es die Möglichkeit, den Reaktionsansatz kontinuierlich mit neuen Substraten zu versorgen und die während der Reaktion entstehenden niedermolekularen Nebenprodukte zu verdünnen. Der Vorteil dieses Systems ist die verlängerte Reaktionslaufzeit auf ca. 12 bis 24 Stunden und entsprechend höhere Ausbeuten.

Die Versorgung von Substraten ist durch zwei Methoden durchführbar: Entweder wird ein Reaktionsansatz mit hoher Dichte unter einer *Feeding Mix* mit geringer Dichte geschichtet und mit der Zeit kommt es durch Diffusion zur langsamen Vermischung der beiden Schichten und somit zur Versorgung [11]. Oder der Reaktionsansatz wird vom *Feeding Mix* durch eine Dialysemembran mit Substraten versorgt (Abbildung 1.1). Dieses Verfahren nennt sich *Continuous Exchange Cell-free* (CECF)

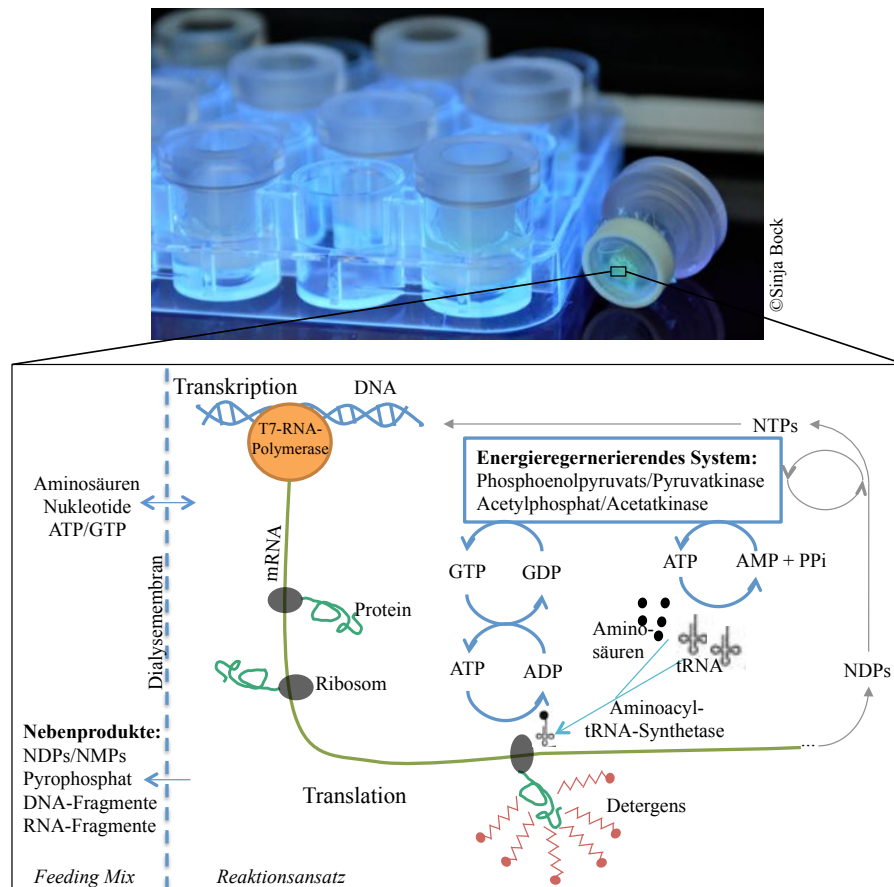


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Vorgänge in einem CECF-Verfahren. Zu sehen sind die Reaktionskammern für den analytischen Ansatz, das energieregenerierende System und die Transkriptions- und Translationsvorgänge. Abbildung verändert [12].

[3]. Das zweite Kompartiment macht es möglich, das System kontinuierlich mit Energie aus einem regenerierenden System zu versorgen. Typischerweise wird hierfür das System der Phosphoenolpyruvat/Pyruvatkinase genutzt. Hierbei wird der Transfer der Phosphatgruppe vom Phosphoenolpyruvat auf das ADP (Adenosindiphosphat) durch die Pyruvatkinase katalysiert, wodurch ATP (Adenosintriphosphat)

1 Einleitung

für weitere Reaktionen entsteht. Das Phosphoenolpyruvat befindet sich in dem äußeren Kompartiment und gelangt durch Diffusion zum Reaktionsansatz. Das bei der Rückreaktion von ATP zu ADP entstehende Pyrophosphat wirkt hingegen für die zellfreie Proteinsynthese inhibierend und muss deshalb entfernt werden. Das lässt sich ebenfalls durch das Zwei-Kammersystem bewerkstelligen: Das niedermolekulare Pyrophosphat und weitere Abbauprodukte werden durch den *Feeding Mix* verdünnt. Neben dem zugegebenen Phosphoenolpyruvat/Pyruvatkinase System befindet sich im S30 Extrakt bereits die Acetylkinase, die zusammen mit dem zugegebenem Acetylphosphat ebenfalls für die Bildung von neuem ATP zuständig ist [14].

Ein weiterer wichtiger Punkt ist bei der zellfreien Proteinsynthese die richtige Magnesiumkonzentration zu finden, da Magnesium ein Cofaktor für viele beteiligte Enzyme ist. Für jeden neu gefertigten S30 Extrakt wird also empirisch die optimale Magnesiumkonzentration in analytischen Ansätzen ermittelt (Abbildung 1.2).

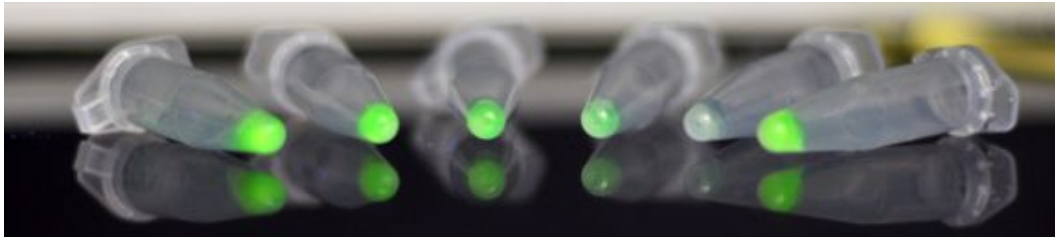


Abbildung 1.2: Ermittlung der optimalen Magnesiumkonzentration mit dem Testprotein GFP (Grün Fluoreszierendes Protein) für einen S30 Extrakt. Zu sehen ist eine von der Magnesiumkonzentration abhängige Fluoreszenz. ©Sinja Bock

Beim CECF handelt es sich um ein offenes System, das jederzeit erweitert oder verändert werden kann. So ist es möglich, bei der Herstellung von nicht-löslichen Proteinen, wie Membranproteinen, diese durch Detergenzien, Amphipole oder Nanodiscs direkt während der Reaktion in Lösung zu bringen oder gleich in Liposomen zu rekonstituieren. Hierbei werden diese Komponenten mit in den Reaktionsansatz gegeben. [15, 16]

Insgesamt lohnt sich die zellfreie Herstellung, wenn innerhalb von 20 Stunden das Protein in großen Mengen benötigt wird, wie z. B. für Kristallisationsansätze. Oder aber, wenn sich das entsprechende Protein nicht in den traditionellen Zellsystemen herstellen lässt. Ansonsten ist es im Vergleich zu den zellbasierten Methoden kostenaufwendiger.

Ein weiterer Vorteil des offenen Systems ist, dass Modifikationen vorgenommen

werden können. Zum einen können einzelne Komponenten an bestehende Limitierungen angepasst werden oder es können Komponenten ausgetauscht werden, wie z. B. Aminosäuren gegen isotopmarkierte Aminosäuren. Die resultierenden Proteine können dann für NMR Messungen verwendet werden. Auch können Teile der Aminosäuren durch unnatürliche Aminosäuren ausgetauscht werden, um Struktur-Funktionsbeziehungen aufzuklären.

1.2 Schwierige Proteine

Zu den schwierige Proteinen zählen Proteine, die sich aus verschiedenen Gründen nicht in den zellbasierten Systemen wie *E. coli*, Hefen oder *Xenopus* Oozyten herstellen lassen. Dies trifft besonders für integrale Membranproteine, zelltoxische Proteine und Proteine mit posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierungen oder Disulfidbrückenbildung zu.

Bei integralen Membranproteinen kommen Limitierungen während der heterologen Expression besonders häufig vor [17].

Zwar codieren 20 % bis 30 % der Gene Membranproteine [18], jedoch sind von 96692 Einträgen der *Protein Data Bank* (PDB) für geklärte Proteinstrukturen nur 277 integrale Membranproteine, davon 58 aus Eukaryoten (RCSB PDB, Januar 2014).

Wo liegen nun die Probleme in der Herstellung von Proteinen, besonders bei den Membranproteinen?

Die Probleme beginnen mit teilweise abweichenden Codonverwendung zwischen Spendersequenz und Empfängerorganismus [19] und der mRNA Sekundärstruktur [20].

Neben den Problemen auf DNA bzw. mRNA Ebene kann ein Großteil der Probleme während der Translation oder während den posttranslationalen Prozessen geschehen. Es findet z. B. eine schnellere Elongation in Prokaryoten als in Eukaryoten statt, was in Falschfaltung resultieren kann, da dem Polypeptid nicht genügend Zeit bleibt, sich entsprechend der Primärstruktur zu falten (Abschnitt 1.3) [21].

Im Weiteren werden Membranproteine bei ihrer Faltung in der Zellmembran (Prokaryoten) oder ER-Membran (Eukaryoten) oft von integralen Membranchaperonen [21] oder anderen coexprimierten Proteinen [22] unterstützt, die bei einer heterologen Überexpression in dem Zielorganismus eventuell nicht vorhanden oder durch die Menge an exprimiertem Protein überlastet sind. Neben den Chaperonen spielt bei der richtigen Faltung bei Eukaryoten teilweise auch die Glykosylierung eine Rolle,

allerdings existieren auch Beispiele, bei denen ein glykosyliertes Membranprotein in nicht-glykosylierenden *E. coli* Zellen funktionell exprimiert werden kann. [21]

Ein weiterer Punkt für mögliche Komplikationen sind unterschiedliche Lipidzusammensetzungen der Membranen von Spender- und Zielorganismus bei dem Einbau, der Faltung und der Funktion von Membranproteinen. Zusätzlich werden durch großes Vorkommen von fremdem Protein in der Membran häufig zelleigene Degradationsmechanismen ausgelöst oder *Inclusion Bodies* gebildet [23].

Neben den posttranslationalen Problemen treten auch Komplikationen durch die spezifischen Proteineigenschaften auf. So ist es nur schwer möglich, zelltoxische Proteine in Organismen herzustellen, die keine Abwehrmechanismen besitzen.

1.2.1 Aquaporin 11

Das Aquaporin 11 (AQP11) gehört zu der Familie der zellulären Wasserkanäle. Diese Familie von tetrameren Membranproteinen lässt sich in zwei Unterfamilien unterteilen: Die orthodoxen Aquaporine, die nur Wasser transportieren und die Aquaglyceroporine, die zusätzlich Glycerol, Harnstoff und weitere kleine Solute transportieren. Das humane AQP11 wurde erstmals im Jahre 2000 im Rahmen des Humanen Genom Projekts [24] zusammen mit dem Aquaporin 12 von Ishibashi *et al.* [25, 26] entdeckt. Zunächst wurden sie wegen ihres unvollständigen NPA Motifs AQPX1 und AQPX2 genannt, aber anschließend in AQP11 und AQP12 umbenannt [27].

Das AQP11 zeigt nur eine geringe Verwandtschaft ($\sim 20\%$) mit den anderen Aquaporinen aus Säugetieren und wird deshalb zusammen mit dem Aquaporin 12 auch „Superaquaporin“ genannt [27, 28]. Bisher konnten keine weiteren Vertreter in Einzellern, wie Bakterien und Protozoen, gefunden werden [26].

Das AQP11 konnte intrazellulär in der Niere, der Leber, den Testikeln und im Gehirn nachgewiesen werden [28], wo es in der Membran des Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist [29].

Das AQP11 besitzt, wie alle Aquaporine, sechs Transmembranspannen und zwei Halbhelices, die zusammen mit einem NPC und einem NPA Motiv einen Teil des Kationenfilter [30] darstellen (Abbildung 1.3) [28, 29, 31].

Im Jahre 2005 konnte von Y. Morishita *et al.* [27] zwar keine heterologe Expression in *Xenopus* Oozyten gezeigt werden, aber es wurden erste *Knockout*-Mäuse erstellt. Diese Mäuse wurden normal geboren, starben aber vor der Entwöhnung an

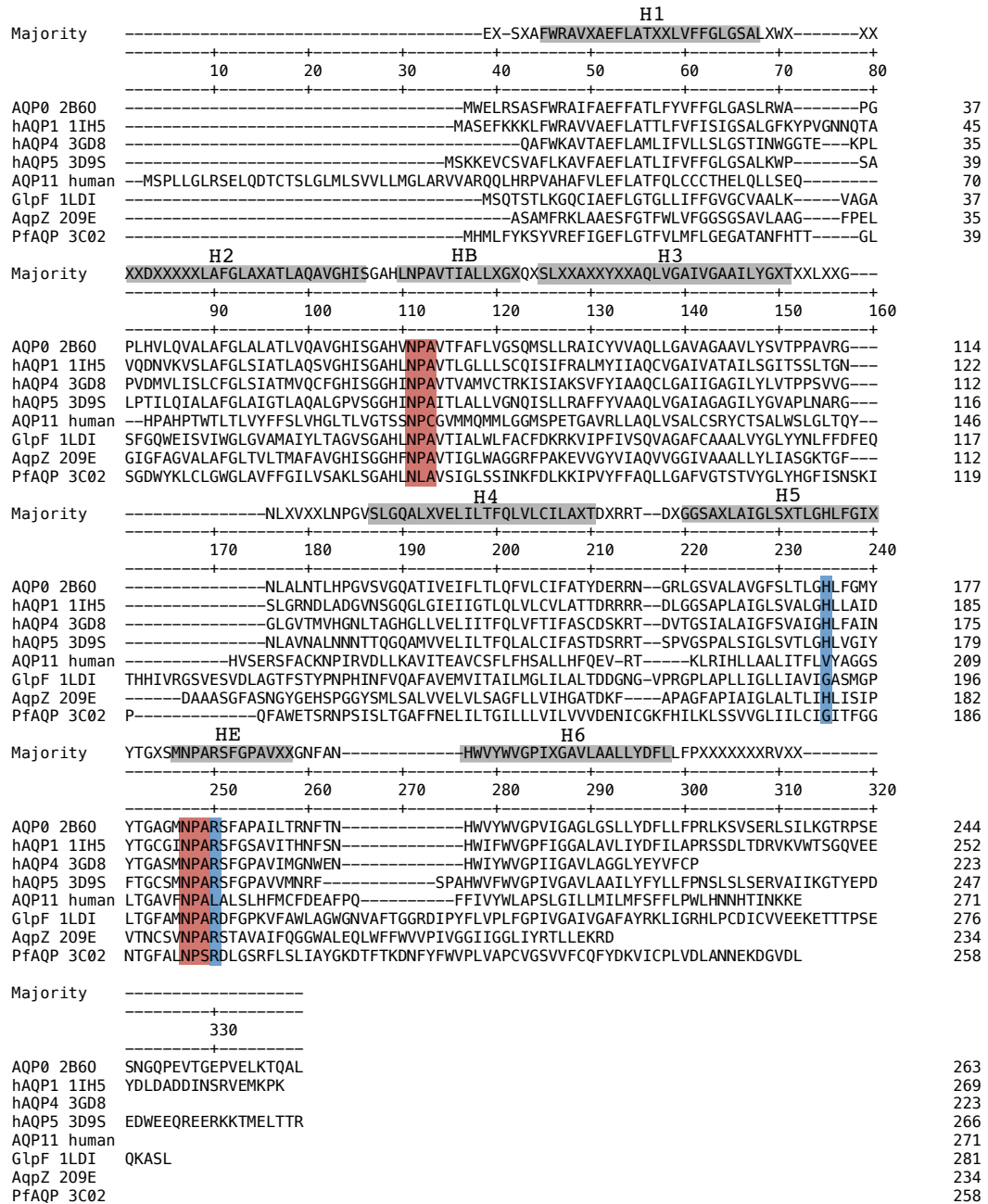


Abbildung 1.3: Multiple Sequence Alignment von kristallisierten Aquaporinen einschließlich Aquaporin 11. Gekennzeichnet sind die sechs Helices (grau), die beiden Halbhelices (grau), die NPA Regionen (rot) und die aromatische Argininregionen (blau).

Nierenversagen durch polyzystische Nieren. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das AQP11 essentiell an der Funktion des proximalen Tubulus beteiligt scheint [27]. Der gleiche Phänotyp wurde erreicht, wenn beim AQP11 an Position 227, in der E-Schleife des AQP11, ein konserviertes Cystein gegen ein Serin ausgetauscht wurde [32].

Im Weiteren wurde von S. Okada *et al.* 2008 [33] ein Expressionsprofil der *Knockout*-Mäuse erstellt. Es stellte sich heraus, dass besonders Gene, die am Zellmetabolismus beteiligt sind, geringer exprimiert werden. Außerdem stellte sich zu Beginn der Studie die Frage, ob eventuell andere Aquaporine die Rolle des AQP11 übernehmen. Bei Betrachtung des Expressionsprofils hinsichtlich der Aquaporine zeigten sich bei dreien eine veränderte Expression: wobei die Expression von AQP1 reduziert und bei AQP2 und AQP3 verstärkt wurde. [33]

Es war nicht möglich, das AQP11 funktionell in *Xenopus* Oozyten [27, 28] und der Hefe *Pichia pastoris* [34] herzustellen, allerdings war es möglich, es in Sf9 Insektenzellen [29, 35] und zellfrei [36] zu exprimieren. Hier konnten zuerst in Proteoliposomen und dann in Sf9 Vesikeln eine Wasserleitfähigkeit nachgewiesen werden. Weitere Funktion des AQP11 mit seinem unvollständigen NPA Motiv blieben bisher ungeklärt. Das NPC Motiv scheint aber essentiell für die volle Funktion zu sein [37].

1.2.2 Aquaporin 6

Das Aquaporin 6 (AQP6) ist wie das Aquaporin 11 ein intrazelluläres Membranprotein mit sechs transmembranen Helices und den AQP-typischen NPA Motiven. Im Gegensatz zum AQP11 ist es in den intrazellulären Vesikelmembranen von Zellen im Sammelrohr der Niere lokalisiert [38, 39].

Obwohl es sich um ein intrazelluläres Membranprotein handelt, lässt es sich in der Plasmamembran der *Xenopus* Oozyten exprimieren, weswegen die Funktion recht zügig aufgeklärt werden konnte [40].

Das AQP6 ist bisher das einzig bekannte Aquaporin, das permeabel für anorganische Anionen ist, wenn es entweder durch niedrigen pH oder durch Quecksilber aktiviert wird [41, 42]. Typischerweise ist Quecksilber ein Inhibitor für Aquaporine, doch in diesem Fall aktiviert es, indem es an das Cys190 bindet [38, 42] und die Permeabilitäten für $\text{NO}_3^- \gg \text{I}^- \gg \text{Br}^- > \text{Cl}^-$ und Hydronium Ionen induziert [43, 44]. Zusätzlich wurden von L. Holm *et al.* 2004 [45] Permeabilitäten von Gly-

cerol und Harnstoff festgestellt, womit es funktionell, aber nicht strukturell zu den Aquaglyceroporinen gehört.

1.2.3 Formiat-Nitrit Transporter

Die Formiat-Nitrit Transporter Familie ist ebenfalls eine gut charakterisierte Membranproteinfamilie, die bereits viele kristallisierte Vertreter besitzt [46, 47, 48, 49, 50].

Formiat-Nitrit Transporter sind pentamere aquaporin-ähnliche Transporter [46, 51] mit sechs Transmembranspannen (Abbildung 1.4) aus Bakterien, Archaea und Eukaryoten, die Formiat [48] und Nitrit [52, 53] als Metabolite der bakteriellen Atmung unter anaeroben Bedingungen und Hydrogensulfid [49] transportieren können. Bislang wurden aber keine Vertreter in Tieren gefunden, was sie zu einem potentiellen pharmazeutischen Angriffsziel von z. B. humanpathogenen Organismen macht [47]. Im Malariaerreger *Plasmodium falciparum* ist bisher der Export des Abbauprodukts Laktat aus der Glykolyse ungeklärt. Gleichzeitig existiert aber ein plasmodialer putativer Formiat-Nitrit Transporter (PF3D7-0316600), der Ähnlichkeiten zum EcFocA besitzt.

Zusätzlich wurde 2012 von W. Lü *et al.* [53] entdeckt, dass der Formiat Kanal FocA neben dem Formiat und Nitrit auch Chlorid und organische Anionen wie Laktat, Acetat und Pyruvat transportiert.

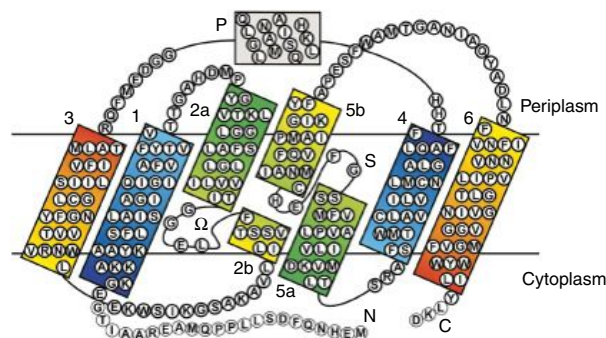


Abbildung 1.4: Die Struktur von FocA aus *Vibrio cholerae* [47]

1.2.4 Influenza M2 Protonenkanal

Das Matrix Protein 2 ist ein kristallisierter und gut charakterisierter Protonenkanal aus der Virushülle des Influenza A Virus [54].

In der Membran besitzt es nur eine Transmembranspanne, bildet aber eine pentamere Struktur mit einem zentralen Kanal aus. Es ist ein pH-abhängiger Protonenkanal. Sobald sich die Influenza A Viren in den Endosomen einer Zelle befinden, wird der M2 Kanal aktiviert und Protonen säuern das Virusinnere an, wodurch das virale Genom entpackt wird, die Virushülle mit der Membran verschmilzt und die virale RNA freigesetzt werden kann [55, 54].

Die Protonenleitfähigkeit lässt sich aber auch mit dem antiviralen Wirkstoff Amantadin inhibieren, was die weitere Vermehrung des Virus verhindert [56]. Amantadin bindet unter anderem am Trp41 und stabilisiert die geschlossene Konformation (Abbildung 1.5) [54, 57]. Ohne Amantadin würde es an dieser Stelle bei einem pH unter 7 zu einer Konformationsänderung kommen und der Protonenkanal wäre geöffnet [58, 59].

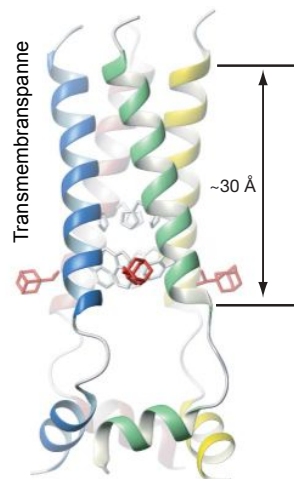


Abbildung 1.5: Die pentamere NMR Struktur eines Influenza A M2 Protonenkanals mit seinem Inhibitor Amantadin (rot) [54]

1.3 Faltung

Wenn die Polypeptide die Ribosomen nach der Translation verlassen, müssen sie ihre dreidimensionale Struktur einnehmen und diese, solange sie funktionell sind, beibehalten. Welche Faktoren beeinflussen nun die Entwicklung des eindimensionalen Peptidstranges zum dreidimensionalen Protein? Zum einen hat der *Backbone* eine natürliche Tendenz, sich in bestimmte Winkel zu beugen. Wasserstoffbrückenbindungen sind für die Interaktionen der Stränge bei α -Helikalen und β -Faltblatt Strukturen beteiligt, wie bereits von Linus Pauling vorhergesagt [60]. Van der Waals Interaktionen machen sich im bereits gefalteten Protein bei eng gefalteten Strukturen bemerkbar. Elektrostatische Interaktionen spielen eine Rolle, wenn sich manche Aminosäuren durch ihre positive oder negative Ladung entweder abstoßen oder anziehen. Hydrophobe Interaktionen sind bei der großflächigeren Anordnung der Aminosäuren wichtig, denn im Proteininneren sind größtenteils hydrophobe Aminosäuren, wohingegen sich die polaren Aminosäuren bei globulären Proteinen an der Oberfläche befinden. Eine etwas andere Anordnung gibt es bei Membranproteinen: hier befinden sich auch hydrophobe Flächen an der Außenflächen des Proteins, nämlich dort, wo das Protein in die Doppellipidschicht eingebunden wird [61]. Ein letzter großer Punkt bei der Proteinfaltung ist die Kettenentropie. Der Polypeptidstrang strebt immer nach der kleinsten Entropie, die durch die Faltung erreicht wird. [62]

Heute wird angenommen, dass die Proteinfaltung in kleinen Strukturen beginnt, indem erst die Sekundärstruktur ausgebildet wird und dann die weitere lokale Faltungen ausbildet. Danach entwickelt sich eine immer globalere Faltung. Durch die fortschreitende Faltung erhöht sich auch gleichzeitig die Stabilität [63]. Je kompakter das Protein während seiner Faltung wird, desto geringer ist seine Energie. Das Energieniveau der Proteine läuft während der Faltung trichterförmig zu: Für das ungefaltete, offene Protein existieren viele Konformationen, doch je weiter die Faltung voranschreitet, desto weniger niedrigenergiehaltige, native Konformationen bestehen. [64]

Immer noch bleiben aber viele Fragen hinsichtlich der Faltung von Membranproteinen offen.

In zellulärer Umgebung wird die Faltung von Proteinen durch Chaperone unter-

1 Einleitung

stützt. Chaperone sind Proteine, die die Proteinfaltung katalysieren, indem sie hydrophobe Seiten an ungefalteten Polypeptiden erkennen und unter Verbrauch von ATP korrekt falten. Alternativ setzen die Proteasen ein und degradieren die un- oder falschgefalteten Proteine. [65, 66]

1.4 Ziel

Das Ziel dieser Arbeit ist die Weiterentwicklung des zellfreien Systems, so dass eine größere Gewissheit besteht, dass auch bisher schwer herstellbare Proteine richtig produziert werden.

Da viele Probleme bei der zellfreien Expression auf der Falschfaltung der Proteine basieren, sollte hier zu Beginn eine Faltungskontrolle entwickelt werden. So bietet sich das GFP an, das C-Terminal an das zu untersuchende Protein fusioniert werden kann. Entsprechende Studien wurden bereits bei heterologen Expressionen in *E. coli* Zellen [67, 68, 69], Sf9 Insektenzellen [70] und *S. cerevisiae* [71] durchgeführt, die sich möglicherweise auf das zellfreie System übertragen lassen.

Mit der Faltungskontrolle kann der Versuch unternommen werden, das Aquaporin 11 zellfrei herzustellen. Bisher war es nur schwer möglich, das humane Aquaporin 11 auf seine Funktion zu testen, da es nicht gelang, es in den *in vivo* Systemen wie *E. coli*, Hefen und *Xenopus* Oozyten funktionell herzustellen.

Eine weiteres zu untersuchendes Protein ist der PF3D7-0316600 (PlasmoDB), ein putativer Formiat-Nitrit Transporter aus dem parasitären Malariaerreger *P. falciparum*. Es ähnelt den restlichen Vertretern der Formiat-Nitrit Familie und ist dort verantwortlich für den Export von Metaboliten der bakteriellen Atmung unter anaeroben Bedingungen. Vertreter der Formiat-Nitrit Transporter Familie wurden bisher nicht in Tieren gefunden, was es zu einem potentiellen pharmazeutischen Angriffsziel des *P. falciparum* bei der Malariaerkrankung macht. Mit der Synthese des Proteins in größeren Mengen kann sowohl mit der Funktions- als auch Strukturaufklärung begonnen werden.

2 | Material

2.1 Chemikalien und Enzyme

ABCR, Karlsruhe

Calciumfolinat

Affymetrix, Santa Clara, USA

FOS-CHOLINE Detergent Kit (Solid Kit)

AppliChem, Darmstadt

MES, Tween 20, SDS, Streptomycinsulfat, LB-Agar-Pulver, Brij35, Brij58, Brij98, Glycin, LB-Medium-Pulver, n-Octyl- β -D-glucopyranosid, Phosphoenolpyruvat, Magnesiumacetat

Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA

E. coli Polar Lipid Extract

Becton Dickinson and Company, Heidelberg

Bacto Proteose Peptone No. 3, Bacto Agar, Bacto Peptone, Bacto Tryptone, Bacto Yeast Extract

Bio-Rad, München

PolyPrep Chromatography Columns, Bio-Rad Protein Assay-Reagenz, Bio-Beads SM-2

Calbiochem

2 Material

G 418 Sulfate

Fermentas, St.Leon-Rot

Restriktionsenzyme, dNTPs, T4-DNA Ligase, RiboLock RNase Inhibitor

Formedium

HL5 Medium without glucose

Genaxxon BioScience, Ulm

Agarose LE, Ampicillin, TEMED

GE Healthcare, Freiburg

PD MidiTrap G25, ECL plus Western-Blotting Detection System, Hybond-P Western Blot-Membranen, Q-Sepharose Fast Flow, Whatman Nuclepore Track-Etch Membranes, Whatman Chromatography Paper 3MM

Glycon, Luckenwalde

n-Dodecyl- β -maltosid

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Deckglas rund silikonisiert 18 mm Stärke 2, ComboPlate 24 Well vorgefettet, 96 Well Microplate PS μ Clear Chimney Well

J.T.Baker, München

Methanol, Ethanol, Isopropanol, Essigsäure

Macherey-Nagel, Düren

NucleoBond PC500

Merck, Darmstadt

Glycin, Kaliumchlorid, di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Natriumformiat, Saccharose, Amicon Ultra-4 Centrifugal Filters 10k MWCO, DMSO

Molecular Dimensions, UK

MemGold MD 1-39, MemGold 2 MD 1-63

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

Ethidiumbromid

Peqlab, Erlangen

peqGOLD Prestained Protein Marker III

PerkinElmer, Waltham, USA

OptiPlate-96 (White Opaque)

Promega, Mannheim

Wizard Plus SV-Minipreps DNA Purification System

Roche Diagnostics, Mannheim

Pyruvat-Kinase, E. coli-tRNA, cOmplete EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets

Roth, Karlsruhe

Ammoniumperoxodisulfat, Ammoniumsulfat, Borsäure, Glycerin 86 %, Harnstoff, HEPES, di-Kaliumhydrogenphosphat, Kaliumchlorid, Lithiumchlorid, MOPS, MES, Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Natriumhydrogencarbonat, TRIS, Tween 20, Triton X 100, Natriumhydroxide, Natriumchloride, Kanamycetinsulfat, L-Arginin, L-Leucin, L-Proline, LB-Agar (Lennox), Milchpulver, Bromphenolblau, D(+)Glucosemonohydrat, LB-Medium (Lennox), D(+)-Saccharose, Rotiphorese Blau R, Calciumchlorid, Albumin Fraktion V (BSA), Trichloressigsäure, Dialysierschlauch Visking Cellulose, EDTA, Kaliumacetat, Natriumazid, Triton X-100, Saccharose, DTT, Tris, Borsäure, Pen/Strep-PreMix, 2-Mercaptoethanol,

Sigma-Aldrich, München

1-Adamantylamin, BrijS20, 1-Octadecanethiol, Octadecylamin, Poly(ethylen glycol) 8000, MES, CHAPS, Glass beads, Natriumformiat, Natriumglukonat, Natriumnitrat, Harnstoff, L-Asparagin Monohydrat, L-Arginine Monohydrochlorid, L-Asparaginsäure Natriumsalz Monohydrat, L-Cystein, L-Glutaminsäure Natriumsalz Monohydrat, L-Alanin, L-Glutamin, L-Histidin Monohydrochlorid Monohydrat, L-Isoleucin, L-Methionin, L-Lysin Monohydrochlorid, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Threonin, L-Valin, Hepes, Imidazol, Kalium-D-gluconate, N-Methyl-D-Glucamin, L-Serin, L-Prolin, Digitonin, Acetylphosphat, IPTG, Antifoam Y-30

2 Material

Emulsion, ATP, CTP, GTP, UTP, Brij98

Stratagene, La Jolla, USA

PfuTurbo DNA Polymerase

Südlaborbedarf, Gauting

High Yield PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit

Thermo Scientific, Schwerte

Brij78, Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes 10k MWCO 0.5-3 ml

Qiagen, Hilden

Ni-NTA Agarose

2.2 Geräte

Agilent Technologies, Waldbronn

UV/Vis-Spektrometer Varian Cary 50 UV-Vis

Avestin, Mannheim

Liposomen-Extruder LiposoFast

Bandelin, Berlin

Ultraschall-Sonotrode Sonoplus

Beckman Coulter, Krefeld

Optima XL-80K Ultracentrifuge, SW 60 Ti Rotor Swinging Bucket, 50.2 Ti, Centrifuge Tubes Microfuge Tube Polyallomer 1.5 ml, Centrifuge Bottles Polycarbonate 28 ml

Bio-Rad, München

Power Pac 2000, Transblot SD semidry transfer cell

Clemens, Waldbüttelbronn

PCR-Gerät Primus advanced HT2X und HT Manager Software

Eppendorf, Hamburg

Photometer BioPhotometer

Grant-bio, Hillsborough, USA

Rotator Mixer PTR-30

Jasco, Gross-Umstadt

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

Molecular Devices LLC, Sunnyvale, USA

ImageXpress MicroXLS Widefield High Content Screening System, MetaXpress Software 5.1.0.41

New Brunswick Scientific, Wesseling-Berzdorf

Tiefkühlschrank U535 innova

Olympus, Hamburg

Mikroskop CK2

PerkinElmer, Waltham, USA

Fluorimeter LS 55

Peqlab, Erlangen

SDS-Gel-Gießstand und -Laufkammer

Raytest, Straubenhardt

Gel-Dokumentations-System IDA

Roche Diagnostics, Mannheim

Bild-Dokumentationssystem Lumi Imager F1

2 Material

Sartorius, Göttingen

Fermenter BIOSTAT A plus

SETON Scientific, USA

Open-Top Centrifuge Tubes Polyclear

Schott Instruments, Mainz

pH-Meter Lab 850

Thermo Scientific, Schwerte

Hochdruck-Homogenisator French Press cell disrupter FA-078

2.3 Verwendete Plasmide

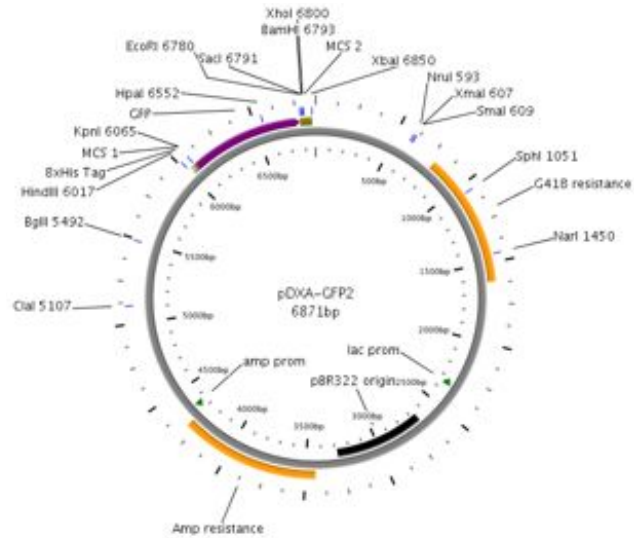


Abbildung 2.1: pDXA-GFP2 als Vektor für die Proteinherstellung in *D. discoideum*. Verwendet wurde er für die Proteine hAQP1 und hAQP11.

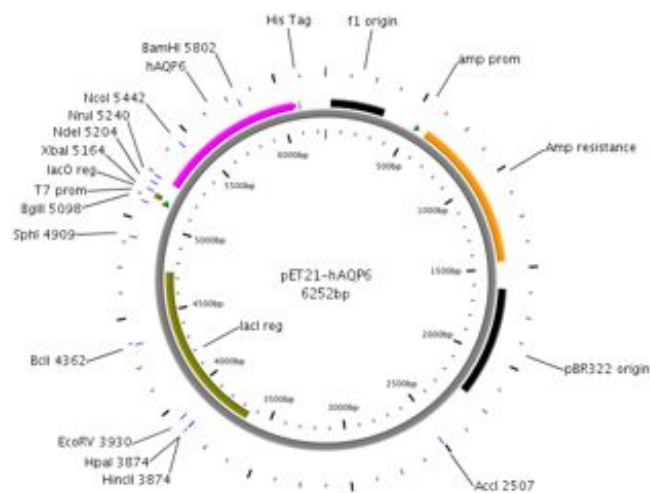


Abbildung 2.2: Der pET21 Vektor wurde nur als Konstrukt mit der proteinkodierenden DNA von hAQP6 für das zellfreie System verwendet.

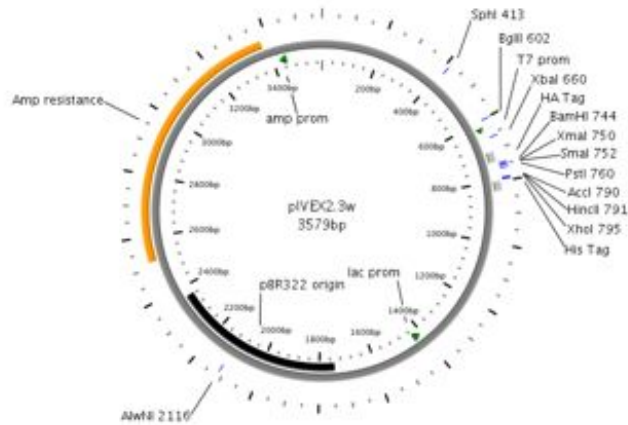


Abbildung 2.3: Der pIVEX2.3w als Vektor für die zellfreie Proteinherstellung. Er wurde für alle Proteine im präparativen Ansatz verwendet.

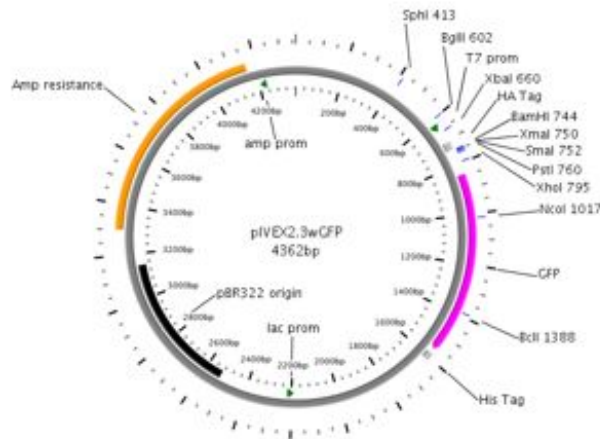


Abbildung 2.4: Der pIVEX2.3wGFP Vektor wurde ebenfalls für die zellfreie Proteinherstellung verwendet. Hiermit wurden die GFP-Fusionsproteine hergestellt.

2.4 Verwendete Primer und Oligonukleotide

Primername	Sequenz
pIVEX2.3w-(GFP) T7 Prom. fw	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
pIVEX2.3w-(GFP) T7 Term. rv	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
pIVEX2.3w-GFP GFP intern fw	GAC AAG CAA AAG AAC GGC ATC
pIVEX2.3w-GFP GFP intern rv	GTC TTC GAT GTT GTG GCG GGT CTT G
pIVEX2.3w-GFP Linker fw	ACC AGC TTG TAA GAT TCC AAA C
pIVEX2.3w-GFP Linker rv	AAA TCG TTT GGA ATC TTA CAA GCT GGT C
pIVEX2.3w-GFP Mutation fw	GAT TTG AAG CAA AAG GTT AAC AAC CAC GTG AGT AAA GGA GGA GAA C
pIVEX2.3w-GFP Mutation rv	GTT CTT CTC CTT TAC TCA CGT GGT TGT TAA CCT TTT GCT TCA AAT C
pDXA-GFP2 156 fw	GGT CCT TCT TGA GTT TGT AAC AG
pDXA-GFP2 157 rv	AAC TTG AAT TGA TCC TCT AGA T
Oligonukleotide	Sequenz
pDXA-GFP2 PfAQP linker fw	AAT TCA GAG CTA ATG CA
pDXA-GFP2 PfAQP linker rv	T GTG CTC TG

2.5 *E. coli* Stämme

Stammname	Genotyp
BL21(DE3)pRep4	F ⁻ <i>ompT hsdSB (r_B-m_B-) gal dcm (DE3) pRep4 (Neo)</i>
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB (r_B-m_B-) gal dcm (DE3)</i>
DH5α	F ⁻ <i>φ80lacZδM15 δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_K- m_K+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>

2.6 *D. discoideum* Stamm

Stammmname	Genotyp	Stamm ID
AX2	axeA2, axeB2, axeC2	DBS0235534 (dictyBase)

2.7 Protein codierende DNA

Proteinname	Beschreibung	Gene ID
hAQP1	Humanes Aquaporin 1	358
hAQP6	Humanes Aquaporin 6	363
hAQP11	Humanes Aquaporin 11	282679
hRhCG	Humaner Ammonium Transporter Rh Typ C	51458
EcFocA	Formiat Transporter aus <i>E. coli</i>	945513
rUT-B	Urea Transporter aus der Ratte	54301
PfAQP	Aquaporin aus <i>P. falciparum</i>	810885
<i>PlasmoDB</i>		
PfFNT	(putativer) Formiat-Nitrit Transporter aus <i>P. falciparum</i>	PF3D7-0316600
Pf70	Putativer Monocarboxylat Transporter aus <i>P. falciparum</i>	PF3D7-0926400
Pf75	Putativer Monocarboxylat Transporter aus <i>P. falciparum</i>	PF3D7-0210300
<i>Protein ID</i>		
M2	Influenza A Virus Matrix Protein 2 aus <i>A/Port Chalmers/1/1973(H3N2)</i>	AFM71947.1
mGFP5	Grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle <i>A. victoria</i> , modifiziert [72]	

2.8 Antikörper

Primärer Antikörper	Ursprung	1. AK/ 2. AK Verdünnung
AQP1 (C-20)	Ziege, polyklonal, Santa Cruz	1:1 000/ 1:1 000
Anti GFP	Maus, monoklonal, Roche	1:10 000/ 1:10 000
GFP (FL)	Kaninchen, polyklonal, Santa Cruz	1:10 000/ 1:10 000
Anti HA 12CA5	Maus, monoklonal, Roche	1:5 000/ 1:2 000
Penta-His	Maus, monoklonal, Qiagen	1:5 000/ 1:5 000
RGS-Anti His	Maus, monoklonal, Qiagen	1:2 000/ 1:2 000
T7-RNA-Polymerase	Maus, monoklonal, Novagen	1:5 000/ 1:2 000

Sekundärer Antikörper	Ursprung
HRP-Conjugatet Anti Mouse	Ziege, Jackson Immuno Research
HRP-Conjugatet Anti Rabbit	Ziege, Jackson Immuno Research
HRP-Conjugatet Anti Goat	Esel, Santa Cruz

2.9 Puffer und Medien

2.9.1 Nucleinsäureanalytik

<u>LB Medium</u>	<u>LB Agar</u>
10 g/l Trypton	10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt	5 g/l Hefeextrakt
5 g/l Natriumchlorid	5 g/l Natriumchlorid
pH 7,0	15 g/l Agar
	pH 7,0
<u>TAE Puffer</u>	<u>10× Probenpuffer orange</u>
40 mM Tris-acetat	0,4 % Orange G
1 mM EDTA, pH 8,0	30 % Glycerol
pH 8,5	100 mM EDTA

2 Material

Ethidiumbromidlösung

1 Tablette Ethidiumbromid (0,1 μg)

10 ml Aqua bidest.

Antibiotikum eingesetzte Konzentration

Ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Kanamycin 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$

2.9.2 Proteinanalytik

SDS PAGE

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris HCl, pH 6,8

0,4 % SDS

Trenngelpuffer

1,5 M Tris HCl, pH 8,8

0,4 % SDS

10 \times Kathodenpuffer

192 mM Glycin

25 mM Tris HCl, pH 8,3

0,1 % SDS

Entfärber

10 % Essigsäure

30 % Ethanol

60 % ddH₂O

4 \times SDS Ladepuffer

250 mM Tris, pH 6,8

40,0 % Glycerol

0,02 % Bromphenol Blau

8,00 % SDS

400 mM DTT

3,50 ml ddH₂O

Western-Blotting

5× Transferpuffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,0375 % SDS

Gebrauchsfertiger Transferpuffer

20 % 5× Transferpuffer
20 % Methanol
60 % ddH₂O

TBS Puffer

135 mM Natriumchlorid
20 mM Tris HCl, pH 7,6

TBS-T

135 mM Natriumchlorid
20 mM Tris HCl, pH 7,6
0,1 % Tween 20

Proteinreinigung

Reinigungspuffer

20 mM Tris, pH 8,0
300 mM Natriumchlorid
0,05 % n-Dodecyl- β -maltosid (Standard*)
0-500 mM Imidazol

*Bei abweichenden Detergenzien wird dies angegeben.

2.9.3 Zellfreie Proteinsynthese

S30 Puffer für CECF

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

Aminosäurenmix

4 mM je Aminosäure (20)

2 Material

RCWMDE

16,7 mM je Aminosäuren RCWMDE

NTP-Mix

360 mM ATP

240 mM GTP, CTP, UTP

HEPES/EDTA Puffer

2,5 M HEPES KOH, pH 8,0

0,5 M EDTA

T7-RNA-Polymerase

T7 Puffer

30 mM Tris HCl, pH 8,0

10 mM EDTA

50 mM Natriumchlorid

5 % Glycerol

10 mM 2-Mercaptoethanol

T7 Dialysepuffer

10 mM Tris, pH 8,0

1 mM EDTA

10 mM Natriumchlorid

1 mM DTT

T7 Lagerungspuffer

10 mM Tris, pH 8,0

1 mM EDTA

10 mM Natriumchlorid

1 mM DTT

50 % Glycerol

S30 Extrakt

S30 A Puffer

10 mM Tris-acetat, pH 8,2

14 mM Magnesiumacetat

0,6 mM Kaliumchlorid

6 mM 2-Mercaptoethanol

S30 B Puffer

10 mM Tris-acetat, pH 8,2

14 mM Magnesiumacetat

0,6 mM Kaliumchlorid

1 mM DTT

0,1 mM PMSF

<u>S30 C Puffer</u>	<u>2× YTPG Medium, 5 l</u>
10 mM Tris-acetat, pH 8,2	14,95 g KH_2PO_4
14 mM Magnesiumacetat	45,5 g K_2HPO_4
0,6 mM Kaliumacetat	50 g Hefeextrakt
0,5 mM DTT	90 g Baktotryptone
	25 g Natriumchlorid
	99 g Glucose (sterilfiltrieren)
	0,5 ml Antifoam Y-30
	(Phosphatpuffer separat autoklavieren)

2.9.4 Surfe²r Messungen

<u>SensorPrep A</u>	<u>SensorPrep B</u>
1 mM Octadecanthiol in Ethanol	15 mg/ml Diphytanoyl-Phosphatidylcholin 1:60 w/w Octadecylamin in n-Decane

2.9.5 Kultivierung von *D. discoideum*

<u>Sörensen-Phosphatpuffer</u>	<u>Sörensen-Phosphatpuffer-Agarplatten</u>
15 mM KH_2PO_4	Sörensen-Phosphatpuffer mit
2 mM Na_2HPO_4	1,5 % Agar
pH 6,0	
<u>H50 Puffer</u>	<u>HL 5 Medium</u>
20 mM HEPES	14 g/l Peptone
50 mM Kaliumchlorid	7 g/l Hefeextrakt
10 mM Natriumchlorid	0,5 g/l KH_2PO_4
1 mM Magnesiumsulfat	0,5 g/l NaH_2PO_4
5 mM Natriumhydrogencarbonat	<u>KK2 Puffer</u>
1 mM Natriumdihydrogenphosphat	2,2 g/l KH_2PO_4
pH 7,0	0,7 g/l K_2HPO_4

2.9.6 Kristallisation

Range	pH	Conc	Unit/Salt	Conc2	Units	Salt3	Conc2	Unit/Salt6	Conc2	Unit/Buffer	Conc/Unit/Buffer1	Conc	Unit/S1/Precipitant	Conc	Unit/S1/Precipitant16	
1	2.40	3.5	0.2	M	lithium sulfate					M	sodium citrate	28	% v/v	PEG 400		
2	1.45	3.8	0.1	M	ammonium sulfate					M	glycine	28	% w/v	tri-ethylene glycol		
3	2.29	4	0.2	M	magnesium chloride	0.100	M			0.025	M	sodium citrate	33	% w/v	PEG 400	
4	2.23	4	0.2	M	ammonium sulfate	0.020	M			0.05	M	sodium acetate	33	% v/v	PEG 200	
5	2.09	4	0.225	M	ammonium sulfate					0.05	M	Sodium Acetate	12	%	PEG 4000	
6	2.18	4	0.35	M	lithium sulfate					0.1	M	Sodium Acetate	11	%	PEG 600	
7	2.24	4	0.4	M	sodium thiocyanate					0.18	M	Sodium Citrate	16	%	PEG 4000	
8	2.42	4								0.1	M	sodium acetate	34	%	PEG 3350	
9	2.2	4.5								0.1	M	sodium acetate	17	% v/v	PEG 400	
10	2.24	4.5	0.07	M	sodium chloride					0.05	M	sodium citrate	22	% v/v	PEG 400	
11	1-08	4.5	0.1	M	cadmium chloride	0.1	M			0.1	M	Sodium Acetate	30	%	PEG 400	
12	1-11	4.5	0.2	M	ammonium phosphate	0.1	M			0.1	M	Sodium Citrate	32	%	PEG 400	
13	2-10	4.5	0.23	M	sodium chloride					0.05	M	Sodium Acetate	33	%	PEG 400	
14	2-23	4.5	0.4	M	ammonium thiocyanate					0.1	M	Sodium Acetate	15	%	PEG 4000	
15	2-33	4.5								0.07	M	Sodium Citrate	22	%	PEG 300	
16	2-25	4.6	0.2	M	ammonium sulfate					0.1	M	sodium acetate	28	% v/v	PEG 550 MME	
17	2.8	4.6								0.64	M	sodium acetate	18	% w/v	PEG 3350	
18	1.38	5	0.05	M	magnesium acetate					0.05	M	sodium acetate	28	% v/v	PEG 400	
19	2-02	5	0.2	M	sodium chloride					0.05	M	Calcium Acetate	29	%	PEG 400	
20	2-06	5	0.2	M	calcium acetate					0.1	M	Sodium Acetate	38	%	PEG 400	
21	1-45	5	0.2	M	calcium chloride					0.1	M	MES	20	%	PEG 350 MME	
22	2-27	5	0.8	M	potassium formate					0.1	M	Sodium Acetate	11	%	PEG 4000	
23	1.1	5.2								0.08	M	sodium citrate	2.2	M	ammonium sulfate	
24	1.41	5.4	0.05	M	magnesium acetate					0.05	M	sodium acetate	24	% v/v	PEG 400	
25	1-16	5.4	0.02	M	sodium chloride					0.05	M	MES	14	%	PEG 350 MME	
26	1-23*	5.5	0.2	M	potassium chloride					0.1	M	sodium citrate	37	% v/v	penterythritol propoxylate (5/4 POOH)	
27	2-33	5.5	0.05	M	sodium chloride					0.1	M	sodium citrate	26	% v/v	PEG 400	
28	1-29	5.5								0.1	M	sodium acetate	8.8	% w/v	PEG 2000 MME	
29	1-13	5.6	0.1	M	sodium chloride					0.02	M	sodium citrate	11	% w/v	PEG 3350	
30	1-14	5.6	0.1	M	sodium chloride					0.02	M	sodium citrate	5.5	% w/v	PEG 3350	
31	2-16	5.6	0.32	M	lithium chloride					0.1	M	Sodium Citrate	14	%	PEG 4000	
32	2-17	5.6	0.34	M	ammonium sulfate					0.1	M	Sodium Citrate	12	%	PEG 4000	
33	2-31	5.6								0.1	M	ADA	14	%	PEG 6000	
34	2-47	5.6								0.1	M	MES	3	M	Ammonium sulfate	
35	1-12	5.8	0.1	M	magnesium acetate					0.1	M	sodium citrate	14	% w/v	PEG 5000 MME	
36	1-14	5.8	0.01	M	nickel sulfate					0.1	M	Sodium Citrate	18	%	PEG 2000 MME	
37	1-26	5.8	0.08	M	magnesium acetate					0.1	M	Sodium Citrate	14	%	PEG 5000	
38	1-33	5.8	0.1	M	magnesium acetate					0.1	M	MES	22	%	PEG 4000	
39	1-36	6	0.1	M	potassium chloride					0.1	M	MES	32	%	PEG 400	
40	1-28	6	0.05	M	sodium chloride	0.020	M			0.1	M	sodium citrate	22	% v/v	PEG 400	
41	2-15	6	0.3	M	barium chloride					0.1	M	MES	34	%	PEG 400	
42	2-39	6	0.05	M	zinc acetate					0.1	M	sodium cacodylate	6.6	% w/v	PEG 8000	
43	1-03	6	0.08	M	magnesium sulfate	0.02	M			0.02	M	MES	10	%	PEG 1450	
44	1-09	6	0.2	M	ammonium sulfate	0.1	M			0.1	M	Sodium Citrate	20	%	PEG 2000	
45	1-20	6	0.04	M	magnesium acetate					0.1	M	MES	36	%	MPD	
46	1-27	6	0.05	M	zinc acetate					0.1	M	MES	2	M	Ammonium sulfate	
47	1-31	6	0.1	M	potassium chloride					0.1	M	Bi-Tris	18	%	PEG 4000	
48	1-34	6	0.1	M	calcium acetate					0.1	M	MES	22	%	PEG 8000	
49	2-44*	6	1	M	sodium chloride					0.1	M	sodium citrate	28	% w/v	PEG 4000	
50	1-15	6.1	0.05	M	magnesium chloride					0.02	M	MES	3.5	%	PEG 3350	
51	2-30	6.1	0.02	M	zinc acetate					0.05	M	MES	11	% w/v	PEG 8000	
52	1-16	6.2	0.05	M	sodium chloride					0.1	M	sodium phosphate	16	% w/v	PEG 4000	
53	2-18	6.2	0.02	M	sodium citrate					0.08	M	sodium phosphate	18	% w/v	PEG 2000	

Abbildung 2.5: Verschiedene Kristallisationspuffer aus MemGold 1 und 2 (Molekular Dimensionen)

54	1-12	6.2	0.05	M	sodium citrate	0.12	M	potassium chloride	0.08	M	Bis-Tris	14	%	PEG 4000
55	2-29	6.2		M					0.1	M	MES	11	%	PEG 20000
56	1-21	6.3	0.05	M	zinc acetate				0.05	M	ADA	11	%	PEG 8000
57	1-25	6.5	0.75	M	magnesium chloride				0.1	M	Sodium Cacodylate	30	%	PEG 2000 MME
58	1,11	6.5		M					0.15	M	potassium phosphate	3.3	M	ammonium sulfate
59	1-42	6.5	0.2	M	calcium chloride				0.1	M	MES	26	% v/v	PEG 350 MME
60	1-48	6.5	0.2	M	potassium chloride				0.1	M	MES	18	% w/v	PEG 6000
61	2.7	6.5	0.2	M	magnesium chloride				0.1	M	sodium cacodylate	31	% w/v	PEG 2000
62	1-07	6.5	0.1	M	sodium chloride	0.1	M	lithium sulfate	0.1	M	ADA	12	%	PEG 4000
63	1-13	6.5	0.1	M	sodium chloride	0.15	M	ammonium sulfate	0.01	M	MES	19	%	PEG 1000
64	1-40	6.5	0.2	M	ammonium sulfate				0.05	M	ADA	13	%	PEG 4000
65	2-01	6.5	0.2	M	sodium acetate				0.1	M	MES	28	%	PEG 400
66	2-08	6.5	0.2	M	sodium chloride				0.1	M	Sodium Cacodylate	2	M	Ammonium sulfate
67	2-11	6.5	0.25	M	magnesium formate				0.1	M	Sodium Cacodylate	22	%	PEG 3000
68	2-13	6.5	0.3	M	lithium sulfate				0.1	M	MES	25	%	PEG 400
69	2-32	6.5	0.1	M	sodium chloride				0.1	M	MES	33	% v/v	PEG 400
70	1-18	6.5	0.03	M	magnesium chloride				0.1	M	MES	28	%	PEG 400
71	1-22	6.5	0.05	M	magnesium acetate				0.1	M	MES	26	%	PEG 400
72	2-43*	6.5	0.2	M	calcium chloride				0.1	M	MES	33	% v/v	PEG 400
73	2-47*	6.5	0.001	M	cadmium chloride	0.030	M	magnesium chloride	0.1	M	MES	30	% v/v	PEG 400
74	2-19	6.5	0.37	M	potassium nitrate				0.1	M	MES	22	%	PEG 400
75	2-25	6.5	0.5	M	potassium chloride				0.05	M	HEPES	20	%	PEG 400
76	2-30	6.5		M					0.1	M	MES	13	%	PEG 400
77	2-34	6.5		M					0.05	M	ADA	24	%	PEG 400
78	1.8	6.5	0.02	M	calcium chloride	0.010	M	magnesium sulfate	0.02	M	sodium chloride	7.7	% w/v	PEG 1500
79	2.19	6.5	0.02	M	potassium nitrate				0.03	M	potassium citrate	7.7	% w/v	PEG 4000
80	2.22	6.5	0.1	M	calcium chloride				0.1	M	tris	13	% w/v	PEG 2000 MME
81	1-04	6.5	0.02	M	calcium chloride	0.04	M	magnesium sulfate	0.02	M	MES	8	%	PEG 1450
82	1-37	6.5	0.1	M	sodium chloride				0.1	M	MES	36	%	PEG 300
83	2-20	6.5	0.4	M	ammonium sulfate				0.1	M	MES	10	%	PEG 3350
84	2-35	6.5		M					0.1	M	Sodium Cacodylate	24	%	PEG 1500
85	1.6	6.6		M					0.1	M	MES/bis-tris	6.6	% w/v	PEG 8000
86	1.22	6.7	0.05	M	magnesium chloride	0.100	% w/v	sodium azide	0.225	M	MES/bis-tris	6.6	% w/v	PEG 3350
87	1-17	6.7	0.025	M	magnesium chloride				0.02	M	MOPS	35	%	PEG 550 MME
88	1.20	6.7	0.1	M	sodium chloride				0.02	M	KMES	6.6	% w/v	PEG 4000
89	1-47	6.8		M					0.2	M	sodium acetate	8.8	% w/v	PEG 6000
90	1-02	7	0.1	M	potassium acetate	0.01	M	potassium chloride	0.02	M	Tris	44	%	PEG 3000
91	1-34	7	0.2	M	sodium acetate	0.200	M	potassium chloride	0.1	M	HEPES	22	% w/v	PEG 3000
92	2.16	7	0.2	M	sodium chloride				0.1	M	HEPES	22	% v/v	PEG 550 MME
93	1-30	7	0.1	M	magnesium formate				0.1	M	MOPS	17	%	PEG 3350
94	1-42	7	0.2	M	sodium chloride				0.05	M	MOPS	19	%	PEG 6000
95	1-43	7	0.05	M	sodium chloride				0.05	M	MOPS	19	%	PEG 6000
96	1-46	7	0.2	M	ammonium nitrate				0.05	M	HEPES	20	%	PEG 3350
97	2-46*	7	0.002	M	zinc sulfate				0.08	M	HEPES	25	% v/v	Jeffamine ED2001
98	2-04	7	0.2	M	ammonium formate				0.1	M	Tris	31	%	pentacythricl ethoxyate 15/04
99	2-21	7	0.2	M	calcium chloride				0.1	M	HEPES	33	% v/v	PEG 400
100	1-10	7	0.2	M	lithium sulfate				0.1	M	HEPES	31	%	PEG 400
101	1-48	7	0.2	M	calcium acetate				0.1	M	HEPES	24	%	PEG 400
102	2-03	7	0.2	M	sodium chloride				0.1	M	HEPES	29	%	PEG 400
103	1-21	7	0.1	M	potassium chloride				0.02	M	tris	20	% w/v	PEG 4000
104	1-25	7	0.1	M	sodium chloride				0.02	M	tris	7.7	% w/v	PEG 4000
105	1-31	7		M					0.02	M	bis Tris	15	% w/v	PEG 2000
106	1-35	7	0.02	M	nickel sulfate				0.01	M	HEPES	33	% v/v	Jeffamine-M600
107	1.4	7	0.36	M	sodium chloride	0.100	% w/v	sodium azide	0.015	M	sodium phosphate	9.9	% w/v	PEG 4000
108	2-37	7	0.1	M	sodium chloride				0.1	M	sodium phosphate	33	% v/v	PEG 300
109	2-48*	7		M					0.1	M	bis-tris-propane	3	M	sodium chloride
110	2-28	7		M					0.1	M	MOPS	9	%	PEG 8000

111	2:45	7	M						0.025	M	Bis-Tris	2.8	M	Ammonium Chloride
112	2:39	7.1	M					0.1	M	ADA		31	%	PEG 600
113	1:46	7.2	0.15	M	sodium formate			0.1	M	HEPES		18	% w/v	PEG 3350
114	1:28	7.2	0.087	M	ammonium sulfate			0.05	M	Tris		22	%	PEG 250 DME
115	2:26	7.3	0.5	M	magnesium chloride			0.05	M	Tris		21	%	PEG 350 MME
116	2:42*	7.4	0.05	M	lithium sulfate			0.1	M	Tricine		7	% w/v	PEG 3000
117	2:32	7.4	M					0.05	M	Tris		17	% w/v	PEG 350 MME
118	2:4	7.5	M					0.02	M	Tris		22	% w/v	PEG 550 MME
119	1:29	7.5	0.1	M	magnesium chloride			0.1	M	Tris		13	%	PEG 6000
120	1:19	7.5	0.1	M	HEPES			0.1	M	HEPES		11	% w/v	PEG 3350
121	1:18	7.5	0.2	M	sodium chloride			0.025	M	HEPES		13	% w/v	PEG 4000
122	1:32	7.5	0.1	M	sodium chloride			0.02	M	Tris		11	% w/v	PEG 1500
123	1:01	7.5	0.2	M	magnesium chloride		0.100	M			magnesium chloride			
124	1:06	7.5	0.1	M	cadmium chloride		0.005	M			cadmium chloride			
125	1:41	7.5	0.1	M	sodium phosphate			0.1	M		potassium phosphate			
126	2:07	7.5	0.2	M	choline chloride			0.1	M	Bis-Tris Propane		10	%	PEG 3350
127	1:26	7.5	0.2	M	sodium chloride			0.1	M	Tris		14	%	PEG 2000 MME
128	1:37	7.5	0.1	M	magnesium chloride			0.1	M	MOPS		38	%	PEG 400
129	2:21	7.5	0.05	M	calcium chloride			0.1	M	Tris		22	% w/v	PEG 400
130	2:22	7.5	0.05	M	sodium chloride			0.1	M	HEPES		53	% w/v	PEG 400
131	2:41	7.5	0.4	M	potassium chloride		0.04	M				32	%	PEG 400
132	1:39	7.5	M					0.05	M	HEPES		12	%	PEG 400
133	1:7	7.5	0.1	M	ammonium sulfate			0.05	M	HEPES		22	% w/v	PEG 4000
134	1:9	7.5	M					0.1	M	HEPES		12	% w/v	PEG 4000
135	2:41	7.5	0.1	M	sodium chloride			0.05	M	HEPES		2.5	M	ammonium sulfate
136	1:10	7.5	M					0.1	M	Tris		11	% w/v	PEG 4000
137	1:24	7.5	0.66	M	sodium chloride			0.067	M	HEPES		1.1	M	tri-sodium citrate
138	1:32	7.5	0.1	M	potassium chloride			0.02	M	Tris		3	%	PEG 4000
139	2:45*	7.5	0.1	M	HEPES			0.1	M	Potassium Phosphate		0.2	%	PEG 200
140	2:36	7.5	M					0.1	M	HEPES		11	% w/v	PEG 4000
141	2:46	7.5	M					0.1	M	HEPES		28	%	PEG 600
142	2:48	7.5	M					0.075	M	HEPES		2.8	M	Ammonium Chloride
143	2:36	7.8	0.001	M	zinc sulfate			0.1	M	HEPES		3.3	M	1,6 Hexandiol
144	1:2	8	M					0.05	M	HEPES		28	% w/v	PEG 600
145	1:24	8	M					0.01	M	Tris		1.2	M	sodium citrate
146	1:27	8	0.04	M	sodium chloride			0.1	M	Tris		55	% w/v	PEG 4000
147	1:33	8	0.15	M	sodium chloride			0.04	M	Tris		27	% w/v	PEG 350 MME
148	1:36	8	0.15	M	sodium chloride		0.100	M			magnesium chloride			
149	1:5	8	0.3	M	sodium chloride			0.1	M	Tris		13	% w/v	PEG 1500
150	2:13	8	0.3	M	magnesium nitrate			0.01	M	Tris		28	% w/v	PEG 4000
151	2:31	8	0.3	M	magnesium nitrate			0.1	M	Tris		23	% w/v	PEG 2000
152	1:30	8	M					0.4	M	ammonium acetate		22	% w/v	PEG 8000
153	1:19	8	0.04	M	sodium chloride			0.05	M	Tris		13	% w/v	PEG 2000 MME
154	1:44	8	0.2	M	magnesium formate			0.04	M	Tris		25	%	PEG 350 MME
155	2:44	8	M					0.1	M	Tris		19	%	PEG 3350
156	2:1	8	0.22	M	sodium citrate			0.1	M	Tris		65	%	MPD
157	2:17	8	0.1	M	sodium chloride			0.1	M	Tris		35	% w/v	PEG 400
158	2:9	8	0.1	M	sodium chloride		0.325	M			sodium acetate			
159	1:40	8	0.2	M	calcium chloride		0.100	M			cadmium chloride			
160	1:17*	8.2	0.1	M	magnesium chloride			0.1	M	Tris hydrochloride		21	% w/v	PEG 400
161	1:15	8.2	0.05	M	calcium chloride			0.1	M	Tris hydrochloride		33	% w/v	PEG 400
162	2:20	8.5	0.1	M	sodium chloride		0.050	M			barium chloride			
163	1:43	8.5	0.1	M	potassium chloride		0.005	M			magnesium chloride			
164	2:3	8.5	M					0.1	M	Tris		30	% w/v	PEG 2000 MME
165	2:6	8.5	0.2	M	magnesium chloride			0.02	M	Tris		39	% w/v	PEG 400
166	2:05	8.5	0.2	M	ammonium sulfate			0.1	M	Tris		1	M	lithium sulfate
167	2:12	8.5	0.25	M	magnesium chloride			0.1	M	Tris		25	% w/v	PEG 4000
168	2:40	8.5	M					0.1	M	Tris		35	%	PEG 3350
169	2:11	8.5	0.05	M	sodium sulfate		0.050	M			lithium sulfate			
170	2:27	8.5	0.1	M	magnesium chloride		0.100	M			sodium chloride			
171	1:05	8.5	0.05	M	sodium sulfate		0.05	M			lithium chloride			
172	2:37	8.5	M					0.05	M	Tris		32	%	PEG 400
173	1:3	8.5	M					0.015	M	Tricine		28	%	PEG 400
174	1:35	8.5	0.1	M	ammonium sulfate			0.1	M	HEPES		24	% w/v	PEG 4000
175	2:43	8.5	M					0.1	M	Tris		23	%	PEG 3350
												44	%	PEG 200

176	2.10	8.9										31	% w/v	PEG 2000
177	1-38	9	0.1	M	sodium chloride			0.1	M	bicine		45	%	PEG 550 MME
178	2-14	9	0.3	M	ammonium formate			0.05	M	Tris		33	%	PEG 550 MME
179	1-44	9	0.05	M	magnesium chloride			0.1	M	glycine		22	% v/v	PEG 400
180	2-26	9						0.05	M	glycine		55	% v/v	PEG 400
181	1-39	9	0.15	M	calcium chloride			0.1	M	Glycine		35	%	PEG 400
182	2-38	9						0.1	M	Bicine		30	%	PEG 400
183	2-38	9	0.1	M	sodium chloride			0.05	M	bicine		33	% v/v	PEG 300
184	2-34	9.3	0.1	M	lithium sulfate			0.1	M	glycine		30	% v/v	PEG 400
185	2-15	9.4	0.1	M	sodium chloride			0.12	M	tris		20	% v/v	PEG 400
186	1-23	9.5	0.05	M	magnesium acetate			0.1	M	Glycine		32	%	PEG 400
187	2-12	9.5	0.1	M	sodium chloride			0.05	M	glycine		33	% v/v	PEG 300
188	1-47	10	0.05	M	magnesium chloride	0.02	M	0.02	M	Glycine		33	%	PEG 1000
189	2-5	10	0.05	M	sodium chloride			0.02	M	glycine		33	% w/v	PEG 1000
										tris				
190	2-14	5.0	0.12	M	lithium sulfate				0.1	M	sodium citrate	20	% v/v	PEG 300
191	2-35*	0.15		M	potassium citrate	0.050	M		0.1	M	sodium phosphate	22	% w/v	PEG 6000
192	2-28	0.1		M	lithium sulfate	0.050	M		0.05	M	citric acid	19	% w/v	PEG 1000

3 | Methoden

3.1 Nukleinsäureanalytik

Zu den nukleinsäureanalytischen Methoden zählen alle Methoden, mit denen auf die Qualität und Quantität der DNA zu schließen ist. Des Weiteren werden hierzu auch Methoden gezählt mit denen die DNA vervielfältigt und gelagert werden kann. Dies geschieht meist im *E. coli* System.

3.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Mit DH5 α *E. coli* Zellen in 5 ml LB-Flüssigkultur gewachsenen, wurden 100 ml LB Medium inokuliert und bei 20 °C über Nacht geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,6 wurden die Zellen mit 2000 g in 10 min bei 4 °C geerntet und dann auf Eis gehalten.

Das erhaltene Pellet wurde zweimal mit einer 0,1 M Calciumchlorid Lösung gewaschen und anschließend mit 10 ml der 0,1 M Calciumchlorid Lösung der 20 % Glycerol zugesetzt ist, resuspendiert. Die Zellen sollten nun für mindestens 4 Stunden auf Eis inkubiert und anschließend in 100 μ l Fraktionen bei -80 °C gelagert werden.

Anschließend wurden die Zellen mit einer bekannten Plasmid-DNA Menge auf ihre Effizienz getestet, die mindestens bei 10⁶ CFU/ μ g DNA liegen sollte.

3.1.2 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von DH5 α *E. coli* Zellen fand mit der Calciumchlorid-Methode statt.

Hierfür wurde eine 100 μ l Fraktion auf Eis aufgetaut und weniger als 20 μ l Plasmid-DNA hinzugegeben. Dies wurde nun für weitere 30 min auf Eis inkubiert und anschließend erst für 1 min ein Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt, dann für weitere 2 min auf Eis gekühlt. Danach wurden 0,9 ml LB-Flüssigmedium hinzugefügt und für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Hiervon wurde 0,1 ml auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum als Selektionsdruck ausgestrichen.

3.1.3 Kultivierung von *E. coli* und Anlegen von Dauerkulturen

Die *E. coli* Zellen wurden alle, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C kultiviert. Zuerst wurden die transformierten Zellen oder Zellen aus der Dauerkultur auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen, über Nacht kultiviert und am nächsten Tag wurden die Klone vereinzelt im größeren Maßstab kultiviert. Hierzu nahm man einen Klon und gab ihn in eine 4 ml LB-Flüssigkultur, die dann ebenfalls bis zu 12 Stunden inkubiert wurde. Zu dem LB-Medium wurde, sobald sich ein eingebrachtes Plasmid in den Zellen befand, ein Antibiotikum als Selektionsdruck zugegeben. Ampicillin wurde in einer Konzentration von 100 μ g/ml eingesetzt und Kanamycin in 40 μ g/ml. Für die Langzeitlagerung wurde zu 0,5 ml *E. coli* Übernachtkultur in LB-Flüssigmedium 0,5 ml Glycerol gegeben. Dies wurde vermischt und bei -80 °C gelagert.

3.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA fand sowohl mit Minipräparationen, als auch mit Maxipräparationen statt. Beide Präparationen wurden mithilfe von kommerziell erhältlichen Systemen durchgeführt.

Für die Minipräparationen wurde das System Wizard[®] Plus SV Minipreps (Promega) genutzt und für die Maxipräparationen, wenn größere DNA Mengen in reinerer Qualität benötigt wurden, NucleoBond PC500 von Macherey-Nagel.

3.1.5 Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Bei Klonierungsarbeiten mussten z. B. nach einem Restriktionsverdau die benötigten DNA Fragmente wieder aus dem Ansatz isoliert werden. Hierzu wurden zwei Methoden verwendet: zum einen die Reinigung mit dem HiYield[®] PCR Clean-up/Gel Extraction Kit (SLG[®]), zum anderen über die Isolierung aus Agarosegelen mit der anschließenden Verwendung des gleichen Systems.

Zur Isolierung aus Agarosegelen wurden erst die mit Restriktionsenzymen verdauten DNA Fragmente auf einem Gel, bestehend aus 1 % Agarose in TAE Puffer mit Ethidiumbromid, mittels Gelelektrophorese zusammen mit einem Größenmarker aufgetrennt. Anschließend wurde das benötigte DNA Fragment mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA aus dem Gel wurde nach dem Protokoll des HiYield[®] PCR Clean-up/Gel Extraction Kit (SLG[®]) verfahren.

Die Konzentrationsbestimmung konnte sowohl photometrisch, als auch mit der Abschätzungsmethode durchgeführt werden.

Für die photometrische Bestimmung wurde die DNA in entsprechender Menge (normalerweise 1 μ l) in 100 μ l dest. Wasser verdünnt und im BioPhotometer (Eppendorf) vermessen. Das Photometer berechnete die Konzentration von doppelsträngiger DNA nach der Formel:

$$c = A_{260} \cdot 50 \mu\text{g/ml} \quad (3.1)$$

Beim Abschätzungsverfahren wurde eine definierte Menge DNA zuerst auf einem 1 % Agarosegel mit einer bekannten Menge an Größenmarker aufgetrennt und anschließend die DNA Bandenintensität mit der Intensität einer Markerbande verglichen. Da bekannt war, welche DNA Mengen sich in den einzelnen Banden des Markers befinden, konnte die unbekannte Konzentration recht schnell abgeschätzt werden.

3.1.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden mit einem CEQ[™] 8000 Genetic Analysis System von Beckman Coulter[®] nach dem Sanger Verfahren mittels Kapillarelektrophorese und fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonukleosid-Triphosphaten (ddNTPs) durch-

geführt. Für die Sequenzierungs-PCR wurde das ebenfalls von Beckman Coulter[®] erhältliche GenomeLab[™] DTCS - Quick Start Kit verwendet.

Es wurden 50 fmol bis 150 fmol dsDNA für die PCR benötigt und das molare Verhältnis von Primer zu DNA sollte mindestens 40:1 betragen. Zu 11 μ l Primer und DNA kamen 2 μ l Quick Start Mix und anschließend wurde der Ansatz mit dem PCR Programm, das in Tabelle 3.1 gezeigt ist, vervielfältigt.

Tabelle 3.1: PCR Programm für die Sequenzierungs-PCR

initiale Denaturierung	86 °C	5 min	
Denaturierung	96 °C	20 Sekunden	} 30×
Annealing	50 °C	20 Sekunden	
Elongation	60 °C	4 min	
Lagerung	8 °C	∞	

Zu dem PCR Ansatz wurde anschließend eine Stopplösung, bestehend aus 2 μ l 3M Na-Acetat (pH 5,2), 2 μ l 0,1 M Na₂-EDTA (pH 8,0), sowie 1 μ l Glykogen hinzugegeben und danach mittels Ethanol fällung aufgearbeitet. Das erhaltene Pellet wurde in 20 μ l *Sample Loading Solution* resuspendiert und anschließend mit dem Sequenzierer vermessen.

3.1.7 DNA-Modifikationen

Klonierungsarbeiten wurden für Modifikationen von Plasmiden benötigt, z. B wenn die zu exprimierende Gensequenz in diese eingesetzt oder geändert wurde. Hierfür wurden das Plasmid und die Sequenz, die eingesetzt werden sollten, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (Fermentas) kompatibel verdaut. Nach einer eventuellen Dephosphorylierung mit *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (CIAP) (Fermentas) und der Reinigung wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, wurde der Vektor durch die T4 DNA Ligase (Fermentas) mit der neuen Gensequenz ligiert und anschließend zum Vervielfältigen in *E. coli* Zellen transformiert (Abschnitt 3.1.2). Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen, wurde zum einen ein Kontrollver-

dau durchgeführt. Für weitere Bestätigung konnte eine Sequenzierung angewendet werden.

3.1.8 Mutagenese-Polymerasekettenreaktion

Dieses Verfahren wurde für die Mutagenese-PCR verwendet, bei der im pIVEX2.3w-GFP2 Vektor am GFP M1N und M4V mutiert wurden.

Für die PCR wurden 50 ng Plasmid-DNA mit 30 μ M *forward* und *reverse* Primer (siehe Primer „pIVEX2.3w-GFP Mutation fw“ und „pIVEX2.3w-GFP Mutation rw“ in Tabelle 2.4) zusammen gegeben, die die ausgetauschten Basen enthielten. Hierzu kamen noch die dNTPs, die Pfu Turbo[®] DNA Polymerase AD (Stratagene[®]) und der Pfu Turbo[®] DNA Polymerase AD Puffer. Als PCR Programm wurde das in Tabelle 3.2 gezeigte Programm verwendet. Nach der PCR wurde im gesamten Ansatz

Tabelle 3.2: PCR Programm für die Mutagenese-PCR

initiale Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	} 15×
Annealing	55 °C	1 min	
Elongation	68 °C	16 min	
finale Elongation	68 °C	10 min	
Lagerung	8 °C	∞	

die noch vorhandene *Template*-DNA mit dem Enzym *DpnI* verdaut, das methylierte DNA erkennt. Nach dem Inaktivieren des Enzyms bei 80 °C über 20 min konnte das mutierte Plasmid zur Transformation verwendet werden. Der Erfolg der Mutation wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

3.2 Codonoptimierung von DNA Sequenzen

Jeder Organismus hat seine eigene bevorzugte Codonverwendung und davon abhängige tRNA-Konzentrationen. Wenn nun eine Gensequenz aus einem Organismus

amplifiziert wird und in einem anderen exprimiert werden soll, kann es vorkommen, dass die Codonverwendungen nicht miteinander kompatibel sind. Dies war der Fall bei den Sequenzen *pf3d7-0316600* (*pfnt*), *pf3d7-0926400* und *pf3d7-0210300* aus *P. falciparum*, die im zellfreien System, sowie in *E. coli* und Hefe exprimiert werden sollten. In allen drei Systemen war es nicht möglich.

Zuerst wurde die Codonverwendung aus der Exonsequenz des *P. falciparum* mit dem der *E. coli* verglichen. Bei starken Abweichungen musste die Sequenz auf DNA Ebene angepasst werden, auf Protein Ebene kam es aber zu keinen Veränderungen. Wenn die Sequenz angepasst werden musste, wurde sie im nächsten Schritt mithilfe des im Internet auf der Seite <http://www.geneius.de> befindlichen Programms „GENEius light“ optimiert und es wurden eventuelle ungewollte Motive ausgeschlossen.

Hiernach musste aber noch einmal manuell überprüft werden, ob nicht zu viele Wiederholungen von einzelnen Basen hintereinander in der optimierten Sequenz auftraten. Diese mussten dann durch schon in der Sequenz vorhandene Codons ausgetauscht werden. Vorhandene Codons deshalb, damit sich die gesamte Codonhäufigkeit nicht mehr veränderte. Zusätzlich konnte bei diesem Schritt noch weitere Motive entweder erstellt oder auch beseitigt werden.

Die fertig optimierte Sequenz wurde am Ende bei GeneArt[®] Gene Synthesis (Life Technologies) bestellt.

3.3 Proteinanalytik

3.3.1 Quantitative Bestimmung

Die Proteinkonzentration wurde über zwei verschiedene Verfahren ermittelt. Nach der Warburgformel und mit dem Bradford Test. Die Warburgformel nutzt die gewichtete Absorption der Wellenlängen 260 nm und 280 nm:

$$c[\text{mg/ml}] = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260} \quad (3.2)$$

Bei A_{280} werden hauptsächlich die aromatischen Aminosäuren angeregt und dient so dem Proteinnachweis, wohingegen A_{260} die Nukleotide detektiert, die z. B. bei einem Zellaufschluss sich noch in Lösung befinden. Dieses Verfahren wurde angewendet,

wenn Detergenzien den Bradford Test stark störten.[2]

Der Bradford Test [73] wurde mit der Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) Reagenz durchgeführt. Hierbei benötigte man außerdem eine Konzentrationsreihe mit *Bovine Serum Albumin* (BSA), anhand der daraus resultierenden Kalibriergerade man später die Konzentration der Probe bestimmte. Für die Messung wurden 0,8 bis 8 μl Probe auf 800 μl mit dest. Wasser aufgefüllt. Dazu kamen dann 200 μl Bio-Rad Protein Assay und das Ganze wurde nach 5 bis 10 min Inkubation zusammen mit einer Leerprobe im Photometer bei 595 nm vermessen.

3.3.2 SDS PAGE

Die SDS PAGE diente zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Durch das anionische Detergens SDS wurden die Proteine denaturiert und durch Anlagerung des SDS negativ geladen und wanderten so im elektrischen Feld zum Pluspol. Durch die Denaturierung wurden die Proteine anhand ihrer Aminosäurenkettenlänge im Gel der Größe nach aufgetrennt. Je kürzer ein Protein war, desto schneller durchwandert es das Gel. Die Gele bestanden nach U. K. Laemmli [74] aus einem Sammelgel und einem Trenngel. [75]

Damit das SDS die Proteine denaturierte und sich mit ihnen verband, wurden die Membranproteine vor dem Auftragen mit dem 4 \times SDS Ladepuffer bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Proben wurden dann auf das vorher - mit der Zusammensetzung, wie in Tabelle 3.3 beschrieben - vorbereitete Gel geladen. Das Gel befand sich zwischen zwei Glasplatten.

Eine Spannung von 160 V wurde solange angelegt, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen haben. Danach wurde die Spannung auf 200 V gesetzt. Die Proben liefen solange bei dieser Spannung, bis sich das zu untersuchende Protein in der Mitte des Trenngels befand. Dann wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer und den Glasplatten entnommen und entweder direkt die In-Gel Fluoreszenz bestimmt (Abschnitt 3.4.6), die Proteine mittels Western-Blotting auf eine PVDF Membran übertragen (Abschnitt 3.3.3) oder alle Proteine mit Coomassieblau eingefärbt. Die Proteinfärbung mit Coomassieblau (Rotiphorese[®] Blau R, Roth[®]) erfolgte für mindestens eine Stunde schüttelnd bei Raumtemperatur. Hierzu wurde das gesamte SDS Gel in die Färbelösung gegeben und hinterher so lange in der Entfärbelösung behandelt, bis nur noch wenig bis keine Hintergrundfärbung sichtbar war.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der SDS Gele mit 12,5 % und 15 % Acrylamid im Trenngel.

	Trenngel		Sammelgel
	12,5 %	15 %	
ddH ₂ O	5,25 ml	4,50 ml	2,40 ml
Trenngelpuffer	3,00 ml	3,00 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	1,00 ml
Acrylamid (40 %)	3,75 ml	4,50 ml	0,60 ml
TEMED	10 μ l	10 μ l	6 μ l
APS (10 %)	80 μ l	80 μ l	25 μ l

3.3.3 Western-Blotting

Western-Blotting gehört zu den Immundetektionsverfahren. Hierbei wurden die vorher im SDS PAGE der Größe nach aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen und danach mittels Antikörpern spezifisch detektiert.

Nach der Gelelektrophorese wurde das SDS Gel direkt entnommen und auf drei WhatmanTM 3MM Chr Papiere, die vorher mit dem Transferpuffer benetzt wurden und eine PVDF (Polyvinylidenfluorid) Blotting Membran (Amersham HybondTM-P, GE Healthcare), die mit Methanol aktiviert wurde, gelegt. Auf das SDS Gel kamen noch drei weitere WhatmanTM 3MM Chr Papiere. Danach wurde für 60 min eine 17 V Spannung angelegt. Es wurde hierbei das *Semi-dry* Verfahren verwendet.

Nach dem Blotting wurde die Membran für 1 Stunde in TBS-T mit 3 % Milchpulver geblockt. Anschließend wurde sie über Nacht mit dem primären Antikörper in TBS-T mit Milchpulver bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die überschüssigen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS-T für 15 min entfernt und dann der sekundäre Antikörper, der an Meerrettichperoxidase konjugiert war, für eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Anschließend wurde auch dieser durch dreimaliges Waschen mit TBS-T für 15 min wieder entfernt.

Zum Entwickeln der Meerrettichperoxidase wurde das Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) verwendet. Die Reagenzien wurden vermischt und auf die Membran gegeben. Die Chemoluminizenz wurde dann im Lumi-Imager F1TM (Roche) detektiert.

3.4 Zellfreie Proteinsynthese

Das Protokoll des *E. coli* basierten CECF Systems entstammte größtenteils dem Protokoll von Schwarz *et al.* (2007) [3]. Hierzu zählten im Besonderen die S30 Extrakt- und die T7-RNA-Polymerase Herstellung.

3.4.1 S30 Extrakt Herstellung

Für die zellfreie Proteinsynthese wurde ein *E. coli* basierter S30 Extrakt benötigt, der die essentiellen Komponenten für die Translation, wie die Ribosomen und Faktoren, die für die Initialisierung, die Elongation und die Termination benötigt wurden, lieferte.

Die BL21(DE3) *E. coli* Zellen wurden anfangs aus den BL21(DE3)pRep4 Zellen gewonnen, indem diese in mehreren Schritten in LB Flüssigmedium ohne Selektionsdruck kultiviert wurden. Ohne einen Selektionsdruck von Kanamycin verloren die *E. coli* Zellen ihr pRep4 Plasmid. Von den BL21(DE3) *E. coli* Zellen wurde dann eine Dauerkultur angelegt, die für alle weiteren Fermentationen verwendet wurde.

Zunächst wurden 50 ml LB Flüssigmedium mit BL21(DE3) *E. coli* Zellen inokuliert und über Nacht kultiviert. Gleichzeitig wurden 5 l vom 2× YTPG Medium und zusätzlich die S30 A bis C Puffer hergestellt. Der Fermenter wurde mit dem Medium autoklaviert.

Am zweiten Tag fand der *Upstream Process* statt. Die *E. coli* Zellen sollten hier bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 2,5 bis 3,0 wachsen. Gleichzeitig wurde der pH Wert und der pO₂ Wert kontrolliert. Der pO₂ Wert wurde ggf. mit der Rührerumdrehungszahl oder Begasungsrate justiert. Zur Kalibrierung der pO₂ Sonde wurde als Nullpunkt das Fermentationsmedium nach dem Autoklavieren genutzt, da hier angenommen wurde, dass der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) am geringsten war. Als maximalen pO₂ Wert wurde das Fermentermedium nach einer Begasung von 10 vvm mit einer Rührerumdrehungszahl von 900 rpm über einen Zeitraum von 5 bis 10 min definiert.

Nachdem die *E. coli* Zellen die gewünschte OD₆₀₀ erreicht hatten, wurde der Fermenter in einem Eisbad innerhalb von 45 min auf eine Temperatur von höchstens 12°C abgekühlt. Nach dem Abkühlen sollte die OD₆₀₀ nicht 4,0 übersteigen, damit

sich die *E. coli* Zellen noch in der logarithmischen Phase befanden.

Der *Downstream Process* begann mit dem Abernten der Zellen bei 5 000 *g* über 15 min bei 4 °C, anschließend wurden sie in 150 ml eiskalten S30 A Puffer resuspendiert. Danach wurde das Pellet noch zweimal bei 8 000 *g* für 10 min bei 4 °C mit demselben Puffer gewaschen. Der letzte Zentrifugationsschritt wurde 30 min durchgeführt. Anschließend wurde das Pellet gewogen und bei -80 °C eingefroren. Danach wurde das Pellet in 110 % (v/w) S30 B Puffer resuspendiert und die Zellen mit einer *French Press* bei 20 000 Psi aufgeschlossen. Die *E. coli* Fragmente wurden nun zweimal bei 30 000 *g* für 30 min und 4 °C zentrifugiert und jeweils 2/3 des oberen Überstandes wurde entnommen. Der resultierende Überstand wurde anschließend mit 400 mM Natriumchlorid versetzt und bei 42 °C in einem Wasserbad inkubiert, um die endogene RNA aus den Ribosomen herauszulösen.

Um das Salz wieder zu entfernen wurde nun zweimal gegen 2,5l S30 C Puffer dialysiert. Im letzten Schritt wurde erneut bei 30 000 *g* zentrifugiert, der Überstand entsprechend aliquotiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung des Extraktes fand bei -80 °C statt.

Zur Effizienzbeurteilung des neuen Extraktes wurde ein Magnesiumscreen von GFP durchgeführt und zusätzlich die Fluoreszenzintensität mit einem alten Extrakt verglichen.

3.4.2 T7-RNA-Polymerase Herstellung

Beim zellfreien CECF System war die Expression durch die T7-RNA-Polymerase kontrolliert, indem diese zusammen mit ihrem Promotor nur eine spezifische Transkription der *Template*-DNA erlaubte und somit die Synthese der noch vorhandenen endogenen *E. coli* DNA unterdrückte.

Aus einer frischen Übernachtskultur mit dem *E. coli* Stamm BL21(DE3)×pAR1219, das das Gen für die T7-RNA-Polymerase enthielt, wurden im Verhältnis 1:100 2l LB Flüssigmedium mit Ampicillin inokuliert. Die Zellen wurden danach bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 inkubiert und dann wurde mit 1 mM IPTG die T7-RNA-Polymerase Expression induziert. Nach fünf Stunden Wachstum wurden die Zellen mit 4 500 *g* für 15 min und 4 °C geerntet. Als nächstes wurde das Pellet mit 60 ml T7 Puffer gewaschen und konnte so bei -80 °C bis zu einem Monat gelagert werden. In 30 ml T7 Puffer resuspendiert wurden die Zellen mit 20 000 psi (1379 bar) durch

die *French Press* aufgeschlossen und anschließend bei 20 000 *g* und 4 °C für 30 min zentrifugiert.

Aus dem Überstand wurden dann mit 2 % tropfenweise hinzugefügtem Streptomycinsulfat die Nukleinsäuren gefällt und danach bei 30 000 *g* und 4 °C für 30 min abgetrennt.

Die T7-RNA-Polymerase wurde nun an eine 70 ml Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) Anionenaustauscher Säule gebunden und anschließend mit einem Gradienten von 20 bis 500 mM Natriumchlorid in T7 Puffer eluiert. Fraktionen von 12 ml wurden gesammelt und in einer Mikrotiterplatte bei einer Absorption von 280 nm auf den Proteingehalt untersucht. Die Fraktionen mit hohem Proteingehalt wurden mit dem T7-RNA-Polymerase Antikörper (Novagen) mittels Western-Blotting detektiert und anschließend wurden die positiven Fraktionen kombiniert und mit 10 % Glycerol mittels Amicon[®] Ultra-4 Cetrifugal Filters 10k MWCO (Merck Millipore) auf eine Konzentration zwischen 3 und 6 mg/ml gebracht. Nach einem Dialyseschritt gegen den Dialysepuffer wurde die T7-RNA-Polymerase auf eine Endkonzentration von 50 % Glycerol mit 1,5 bis 3 mg/ml Protein verdünnt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Wie auch beim S30 Extrakt wurde die Qualität des Enzyms mit einem Magnesiumscreen von GFP beurteilt und zusätzlich noch mit älteren Chargen des Enzyms verglichen.

3.4.3 Analytischer Ansatz

Der analytische Ansatz vom CECF Verfahren fand in kleinen, selbsthergestellten Reaktionsgefäßen (Abbildung 3.1), die ein Volumen von 55 μ l *Reaction Mix* fassen, statt. Sie ermöglichten, im kleinen Ansatz parallel verschiedene Bedingungen zu testen, wie z. B. variierende Magnesiumkonzentrationen oder unterschiedliche Detergenzienarten. Die Detergenzienarten und Konzentrationen werden in Tabelle 3.6 gezeigt und erfolgten in Anlehnung an Klammt *et al* (2005)[76].

Hierbei wurde eine Dialysemembran mit einem *cut off* von 14 kDa über die Unterseite gelegt und anschließend mit dem Teflon Ring befestigt. Von oben konnte dann der *Reaction Mix* zwischen das Gefäß und die Dialysemembran gegeben werden. Das fertig bestückte Reaktionsgefäß wurde dann in eine handelsübliche 12-Well Zellkulturplatte gegeben, in der sich schon 850 μ l *Feeding Mix* befand. So wurde ein *Reaction Mix* zu *Feeling Mix* Volumenverhältnis von 1:15 erreicht.

Tabelle 3.4: Pipettierschema für einen analytischen Ansatz von fünf verschiedenen Bedingungen; jeweils in Doppelbestimmung

Komponente	Stock- konz.	End- konz.	Master- mix (μl)	FM (μl)	RM (μl)
<i>Feeding Mix</i>					
S30 Puffer (%)	100	35		3 308	
RCWMDE (mM)	16,67	1,0	609,9		
Aminosäure Mix (mM)	4	0,5	1 270,6	1 299	
Acetylphosphat (mM)	1 000	20,0	203,3		
Phosphoenolpyruvat (mM)	1 000	20,0	203,3		
NTP Mix (\times)	75	1,0	135,5		
DTT (mM)	500	2,0	40,7		
Folsäure (mg/ml)	10	0,1	101,7		
cOmplete* (\times)	50	1	203,3		
HEPES/EDTA Puffer (\times)	24	1	372,7		
Magnesiumacetat (mM)	1 000	7,1	72,2		
Kaliumacetat (mM)	4 000	130,0	330,4		
PEG8000 (%)	40	2	508,3		
Natriumazid (%)	10	0,05	50,8		
ddH ₂ O				0	
			\sum 8,4 ml	\sum 10,2 ml	
<i>Reaction Mix</i>					
Aus Mastermix					288,6
S30-Extrakt (%)	100	35			250,3
Plasmid (mg/ml)	0,2	0,015			53,6
RiboLock** (U/ μl)	40	0,30			5,36
T7-RNA-Polymerase (U/ μl)	350	15,00			30,64
<i>E. coli</i> tRNA (mg/ml)	40	0,70			12,51
Pyruvatkinase (mg/ml)	10	0,08			5,72
ddH ₂ O					0
					\sum 0,65 ml

*Protease Inhibitor, **RNase Inhibitor

Zur Vorbereitung von *Feeding Mix* und *Reaction Mix* wurde zuerst, wie in Tabelle 3.4 beschrieben, ein Mastermix mit allen niedermolekularen Komponenten erstellt. Aus diesem wurde nun ein Volumen für den *Reaction Mix* entnommen und hierzu die noch fehlenden Bestandteile, die für die Proteinsynthese benötigt wurden, gegeben. Zum verbleibenden Mastermix wurden noch S30 Puffer und ein zusätzliches Volumen von dem Aminosäure Mix hinzugefügt, der so den *Feeding Mix* ergibt.

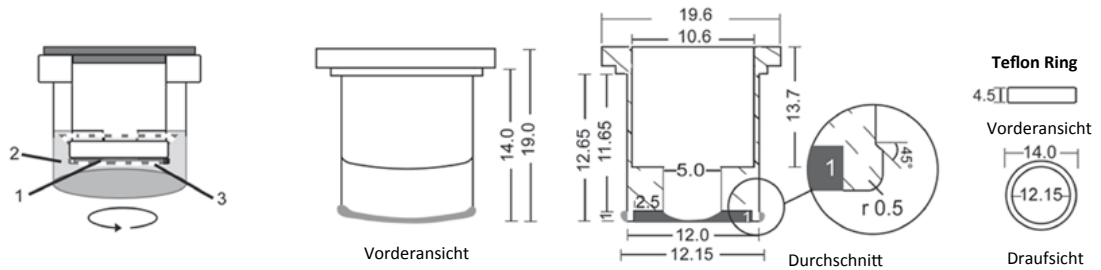


Abbildung 3.1: Technische Zeichnungen der Reaktionsgefäße für den analytischen Ansatz. **1** zeigt den *Reaction Mix*, **2** den *Feeding Mix* und **3** die Dialysemembran. [15]

3.4.4 Präparativer Ansatz

Der präparative Ansatz wurde für Ansatzvolumina zwischen 0,5 und 3 ml verwendet, bei denen die optimale Magnesiumkonzentration und Detergenzienart aus dem analytischen Ansatz bekannt war.

Hierfür wurde durch ein ebenfalls selbst hergestelltes Reaktionsgefäß (Abbildung 3.2) eine kommerziell erhältliche Dialysekassette (Slide-A-Lyzer[®] Dialysis Cassette, Thermo Scientific) fixiert. Die Dialysekassette besaß einen *cut off* von 10 kDa, konnte ein *Reaction Mix* Volumen zwischen 0,5 und 3 ml fassen und befand sich im *Feeding Mix*. Das Verhältnis zwischen *Reaction Mix* und *Feeding Mix* betrug 1:17.

Der *Reaction Mix* und der *Feeding Mix* wurden nach dem Pipettierschema in Tabelle 3.5 vorbereitet und anschließend bei 30 °C über Nacht in einem Wasserbad inkubiert. Als Detergenzien mit den dazugehörigen Konzentrationen wurden die in Tabelle 3.6 gezeigten Substanzen verwendet.

Tabelle 3.5: Pipettierschema für einen präparativen Ansatz für 1 ml *Reaction Mix* mit 12 mM Magnesium. Die Detergenzienmenge musste entsprechend zugegeben werden.

Komponente	Stock-konz.	End-konz.	Master-mix (μl)	FM (μl)	RM (μl)
<i>Feeding Mix</i>					
S30 Puffer (%)	100	35		5 950	
Detergens (%)	entspr.	entspr.	entspr.		
RCWMDE (mM)	16,67	1,0	1 080		
Aminosäure Mix (mM)	4	0,5	2 250	2 338	
Acetylphosphat (mM)	1 000	20,0	360		
Phosphoenolpyruvat (mM)	1 000	20,0	360		
NTP Mix (\times)	75	1,0	240		
DTT (mM)	500	2,0	72		
Folsäure (mg/ml)	10	0,1	180		
cOmplete* (\times)	50	1	360		
HEPES/EDTA Puffer (\times)	24	1	660		
Magnesiumacetat (mM)	1 000	7,1	127,8		
Kaliumacetat (mM)	4 000	130,0	585		
PEG8000 (%)	40	2	900		
Natriumazid (%)	10	0,05	90		
ddH ₂ O					ad 17 ml
			Σ 8,3 ml	Σ 17 ml	
<i>Reaction Mix</i>					
Aus Mastermix					503,6
S30-Extrakt (%)	100	35			350
Plasmid (mg/ml)	0,2	0,015			75
RiboLock** (U/ μl)	40	0,30			7,50
T7-RNA-Polymerase (U/ μl)	350	15,00			42,86
<i>E. coli</i> tRNA (mg/ml)	40	0,70			17,50
Pyruvatkinase (mg/ml)	10	0,08			8,00
ddH ₂ O					ad 1 ml
					Σ 1 ml

*Protease Inhibitor, **RNase Inhibitor

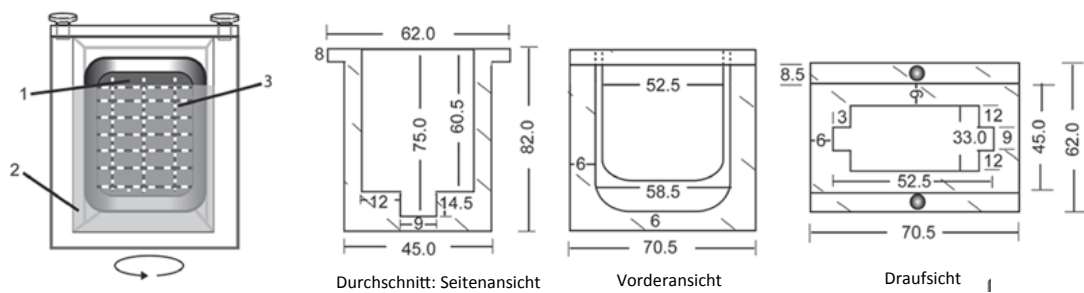


Abbildung 3.2: Technische Zeichnungen des Reaktionsgefäßes für den präparativen Ansatz. **1** zeigt den *Reaction Mix*, **2** den *Feeding Mix* und **3** die Dialysemembran. [15]

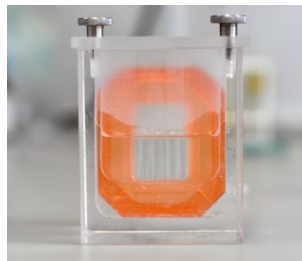


Abbildung 3.3: Foto des Reaktionsgefäßes mit der Dialysekassette für den präparativen Ansatz. ©Sinja Bock

3.4.5 Proteinreinigung der Ansätze

Nach der Herstellung der Proteine mussten diese aus dem Syntheseansatz isoliert werden.

Der *Reaction Mix* von GFP-Fusionsproteinen wurde nach dem Entnehmen aus den jeweiligen Reaktionsgefäßen für eine Stunde auf Eis inkubiert, um dem Protein Zeit zu geben, sich weiter korrekt zu falten. Danach wurden beim analytischen Ansatz die $55 \mu\text{l}$ *Reaction Mix* mit vorgewaschener $15 \mu\text{l}$ Ni-NTA Agarose (Qiagen) Suspension für drei Stunden bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Hiernach erfolgte ein Waschschritt mit zweimal $75 \mu\text{l}$ 20 mM Imidazol-Reinigungspuffer und einer anschließenden Elution mit $80 \mu\text{l}$ 300 mM Imidazol-Reinigungspuffer.

Die 300 mM Imidazol-Fraktion wurde nun für weitere Analysen zur Quantifizierung der Fluoreszenz und Proteinmenge für z. B. SDS PAGE und Western-Blotting, sowie Fluoreszenzmessungen verwendet.

Beim präparativen Ansatz wurde hingegen pro 1 ml *Reaction Mix* $200 \mu\text{l}$ Ni-NTA

Tabelle 3.6: Im zellfreien System verwendeten Detergenzien mit den eingesetzten Konzentrationen.

Detergens	CMC (mM)	Stockkonz.	Endkonz.
Brij35	0,09	5 %	0,2 %
Brij58	0,077	15 %	1,5 %
Brij78	0,046	15 %	0,8 %
Brij98	0,025	5 %	0,2 %
Digitonin	0,5	8 %	0,4 %
Triton X-100	0,24	2,5 %	0,1 %
β -Octylglycosid	19	15 %	0,75 %
DDM	0,19	2,5 %	0,1 %
Tween 20	0,059	2 %	0,075 %
CHAPS	8	10 %	0,75 %

Agarose (Qiagen) Suspension zum Binden über Nacht bei 4 °C zugegeben. Die gebundenen Proteine wurden dann mit 2 ml 20 mM Reinigungspuffer gewaschen und anschließend schrittweise mit 500 μ l 40 mM bis 500 mM Imidazol-Reinigungspuffer eluiert. Bei jedem Elutionsschritt wurde die Säule für 10 min mit dem jeweiligen Puffer inkubiert.

Die Fraktionen wurden anschließend mit einer SDS PAGE auf den Proteingehalt und den Erfolg der Reinigung überprüft. Daraus resultierend wurden die Fraktionen mit dem größten Proteingehalt kombiniert. Hieraus wurde nun das Imidazol mittels PD MidiTrap G25 (GE Healthcare) Säulen entfernt und anschließend wurde das erhaltene Eluat mit Amicon[®] Ultra-4 Centrifugal Filters 10k MWCO (Merck Millipore) bei 4000 *g* und 4 °C auf die gewünschte Konzentration gebracht.

3.4.6 Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz

Um einen verlässlichen Vergleich der Expressionseffizienz zu erhalten, mussten die GFP-Fusionsproteine nach der Reinigung quantifiziert werden. Hierfür wurde die Fluoreszenz sowohl mit einem Fluorimeter vermessen, als auch mittels der SDS PAGE.

Zur Vermessung im Fluorimeter wurde die Probe zwischen 100- und 10 000-fach mit

dest. Wasser verdünnt, davon wurden 200 μl in Doppelbestimmung in 96-Well Fluoreszenz Mikrotiterplatten (OptiPlate-96, White Opaque, PerkinElmer) gegeben und anschließend bei einer Anregungswellenlänge von 475 nm und einer Emissionswellenlänge von 509 nm im LS55 Fluorescence Spectrometer (PerkinElmer) vermessen. Für die In-Gel Fluoreszenz Detektion des GFP wurde das SDS Gel nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben im Lumi-Imager F1TM (Roche) bei 520 nm vermessen und anschließend mit der LumiAnalyst 3.1 Software ausgewertet.

3.5 Kristallisation von PffNT

Für ein erstes Screening wurden 192 Kristallisationspuffer MemGold 1 und 2 (Molekular Dimensions) (Abbildung 2.5) verwendet. Anschließend wurden mit selbsthergestellten Puffern die erfolgreichen Kristalle reproduziert und weitere, den erfolgreichen Bedingungen ähnelnd, probiert. Pro Ansatz wurde ein Puffer genutzt.

Für das *hanging drop* Verfahren wurde zuerst 0,5 ml des entsprechenden Puffers in das jeweilige Well der 24-Well-Platte (ComboPlate 24 Well vorgefettet, Greiner Bio-One) gegeben. Als nächstes wurde zunächst 1 μl der konzentrierten Proteinlösung auf ein rundes, silikonisiertes 18 mm Deckgläschen (Greiner Bio-One) mittig gegeben. Danach wurde von dem im Well befindlichen Puffer ebenfalls 1 μl entnommen und zu dem Protein pipettiert. Hierbei sollten sich die beiden Lösungen nur durch Diffusion vermischen. Nun wurde das Deckgläschen umgedreht auf das Well mit dem Puffer gelegt und so auf den Silikonörling angedrückt, dass die Kammer vollständig abgeschlossen war. Jetzt konnte sich eine gleichmäßige Kammersättigung in dem Gefäß ausbilden.

Mit den anderen Wells wurde gleich verfahren. Die Platte wurde schließlich bei 16 °C inkubiert und die Tropfen wurden regelmäßig mit einem Mikroskop charakterisiert.

Für die Charakterisierung wurde eine zehnstufige Beschreibung verwendet:

- 0 = Der Tropfen ist klar und keinerlei Protein ist präzipitiert oder gelatinös.
- 1 = Der Tropfen enthält Partikel, die nicht vom Protein stammen, wie z. B. Fasern, kleinste Glassplitter oder Bakterienkontaminationen.

3 Methoden

- 2 = Ein Teil des Proteins ist präzipitiert, d. h. der Tropfen ist zum Großteil klar, enthält aber geringe Mengen ausgefallenen Proteins.
- 3 = Der Tropfen enthält nur präzipitiertes Protein. Das Protein ist wahrscheinlich denaturiert.
- 4 = Im Tropfen befindet sich gelatinöses Präzipitat, d. h. das Protein ist weiß, bzw. transparent präzipitiert.
- 5 = Eine Phasentrennung ist sichtbar.
- 6 = Das Protein bildet Sphärolithe oder Mikrokristalle, die transparent und doppelbrechend sind.
- 7 = Es sind doppelbrechende Nadeln zu sehen, die in nur eine Dimension wachsen.
- 8 = Im Tropfen befinden sich dünne, doppelbrechende Plättchen, die noch nicht für die Röntgendiffraktion ausreichen.
- 9 = Der Tropfen enthält deutliche Kristalle.

3.6 Proteoliposomen

Proteoliposomen dienen zur funktionellen Testung von gereinigten Membranproteinen. Besonders bietet sich diese Methode für zellfrei hergestellte, schwierige Proteine an, da hier oft Alternativen zur Funktionstestung fehlen.

3.6.1 Rekonstitution von Proteinen

Proteoliposomen sind auf vereinfachte Weise künstliche Zellen. In eine Doppellipidmembran werden die zellfrei hergestellten Proteine eingebracht und bilden dann das Proteoliposom.

Die Rekonstitution erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Borgnia *et al.* (1999)

[77].

Als Lipide für die Doppellipidschicht wurden die *E. coli* Polar Lipid Extract von Avanti[®] Polar Lipids, Inc. verwendet. Diese wurden im ersten Schritt hydratisiert. Hierfür wurden 25 mg/ml *E. coli* Polar Lipid Extract in Chloroform gelöst und anschließend wieder mit Stickstoff evaporiert. Danach wurde zu den Lipiden 500 μ l 2 mM Mercaptoethanol gegeben, so dass sich eine Lipidkonzentration von 50 mg/ml ergab. Das Ganze wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und konnte anschließend bei -80 °C gelagert werden. Nun wurden 50 μ l 1 M MOPS Puffer (pH 7,5) zu dem hydratisierten Lipid gegeben - es ergab sich eine Lipidkonzentration von 45 mg/ml - und die Suspension wurde hiernach in einem Glasgefäß für 10 min im Ultraschallbad behandelt. Zu dem vorbereiteten Lipid wurde nun Detergens und Protein oder Puffer, für die Negativkontrolle, mit einem Lipid-zu-Protein Verhältnis von 90 gegeben, für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend mit einer 23 Gauge Kanüle in das 25fache Ansatzvolumen an Rekonstitutionspuffer injiziert. Die erhaltenen Proteoliposomen wurden mit 140 000 *g*, bei 4 °C für 45 min zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 1 ml Puffer aufgenommen.

Für *Stopped Flow* Messungen wurde die Lipidkonzentration der Proteoliposomen auf 0,4 mg/ml gebracht.

3.6.2 Saccharose Gradient

Ein Saccharose Gradient diente zur Trennung von Proben anhand ihrer Dichte. Dazu wurden Puffer mit verschiedenen Saccharose Konzentrationen zusammen mit der Probe diskontinuierlich übereinander geschichtet. Durch einem Zentrifugationsschritt fraktionierte sich die Probe entsprechend ihrer Dichte in den jeweiligen Saccharose Konzentrationen. Dieses Verfahren wurde als Kontrolle nach einer Rekonstitution von Proteinen in Liposomen verwendet, um die Rekonstitutionseffizienz zu überprüfen.

Als Puffer wurde ein 20 mM Tris HCl, pH 7,5 mit 100 mM NaCl verwendet, dem 0 % bis 60 % Saccharose zugesetzt ist. Der Puffer mit 60 % Saccharose wurde im gleichen Verhältnis mit dem zu untersuchenden Rekonstitutionsansatz vermischt, so dass sich eine Endkonzentration von 30 % Saccharose ergab. Hierauf wurde vorsichtig ein Korkestück gelegt, auf das nacheinander tropfenweise die weiteren Saccharosefraktionen gegeben wurden. Die 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 5 % und 0 % Fraktionen,

wie in Abbildung 3.4 zu sehen, sollten sich in dem Open-Top Centrifuge Tubes Polyclear™ (SETON Scientific) nicht vermischen. Nun wurde der Saccharose Gra-

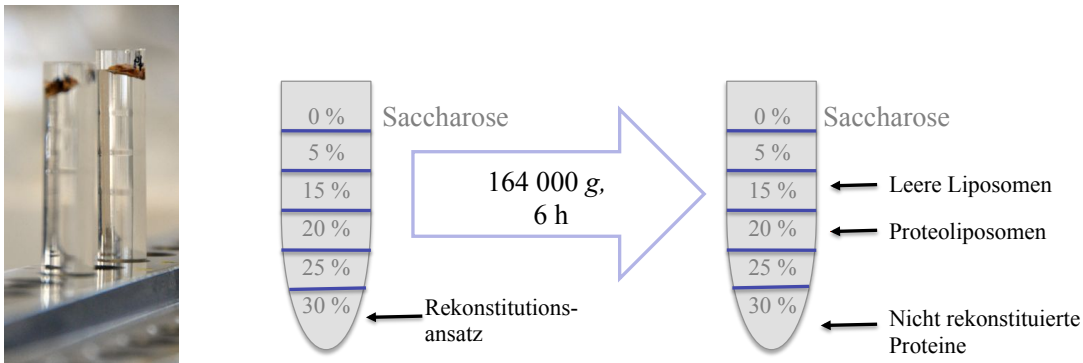


Abbildung 3.4: Exemplanische Darstellung eines diskontinuierlichen Saccharose Gradienten. Links ist der Ansatz vor der Zentrifugation zu sehen (©Sinja Bock), rechts nach der Zentrifugation.

dient im SW 60 Ti (Beckman Coulter®) Ausschwingrotor in der Optima™ XL-80K (Beckman Coulter®) Ultrazentrifuge für 6 Stunden bei 164 000 *g* (40 000 rpm) und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen vorsichtig von oben abgenommen. Danach wurden die Proteine mit dem gleichen Volumen 10% Trichloressigsäure gefällt. Die Trichloressigsäure wurde zu der jeweiligen Fraktion gegeben, dann wurde das Gemisch für 15 min auf Eis gelagert und anschließend bei 14 000 *g* bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 4× Ladepuffer resuspendiert und der pH mit einer 32% Ammoniaklösung anhand des pH Indikators im 4× Ladepuffer neutralisiert. Nun konnten alle Fraktionen durch eine SDS PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Western-Blotting detektiert werden.

3.7 Dynamische Lichtstreuungsmessung mit der *Stopped Flow* Apparatur

Die *Stopped Flow* Apparatur diente zu Messung des Schwell- oder Schrumpfverhaltens von Vesikeln, bedingt durch einen hypertonen oder hypotonen Gradienten, anhand dessen das Verhalten von Kanälen zu untersuchen war.

Hierzu wurden zur Messung aus bis zu drei Kompartimenten, die die Puffer und

die zu untersuchende Probe enthielten, in eine Mischkammer injiziert. Im Millisekunden Bereich wurde hier nun die kinetische Veränderung der Vesikel anhand der Veränderung der Lichtstreuung im 90° Winkel detektiert.

3.7.1 Stopped Flow Parameter

Vor der *Stopped Flow* Messung wurden alle Puffer und Proben auf Eis gelagert bis sie zum Einsatz kamen.

Nach dem Spülen der gesamten Apparatur mit dest. Wasser wurde nun eines der vorhandenen Kompartimente mit dem Puffer gefüllt. Das andere wurde mit der zu untersuchenden Probe befüllt. Das Gemisch aus dem Probenpuffer, in dem sich die Probe befand und dem Puffer bildete den Gegenpuffer, der einen osmotischen oder chemischen Gradient aufbaute. Die Probe und der Puffer wurden mit den Parametern, die in Tabelle 3.7 gezeigt sind in der 55 μ l Mischkammer vermischt. Es wurden immer neun Kurven aufgenommen.

Tabelle 3.7: *Stopped Flow* Einstellungen zur Vermessung von Proteoliposomen und *D. discoideum* Zellen.

	Parameter Proteoliposomen	Parameter <i>D. discoideum</i>
Temperatur	10 °C	20 °C
Lampenleistung	100 W	100 W
Wellenlänge	546 nm	546 nm
Gesamtvolumen	202 μ l	150 μ l
Injektionsflussrate	14 ml/s	12,5 ml/s
Photomultiplier	400 \times	400 \times
Output Filter	300 μ s	300 μ s
Erwartete Totzeit	2,6 ms	2,9 ms
Datenpunkte	8000	8000

3.7.2 Auswertung der *Stopped Flow* Kurven

Aus den neun gemessenen Kurven wurde eine Mittelwertkurve gebildet. Diese wurde als erstes normiert, d. h. die Kurve spannte sich zwischen 0 und 1 auf. Der Ursprung wurde auf 0 gesetzt und wenn die Kinetik ihren Endpunkt, also die Plateauphase erreichte, wurde dieser Zeitpunkt auf 1 gesetzt. Durch das Normieren war es möglich die Kurven untereinander zu vergleichen. Des Weiteren konnte so auch der τ -Wert bestimmt werden. Der τ -Wert ist die Zeit, bei der 0,632 der Amplitude erreicht ist und diese Zeit konnte direkt an der Abszisse abgelesen werden. Mathematisch ist der τ -Wert der Kehrwert der Rate und ermittelt sich rechnerisch aus $1-1/e$.

3.8 SURFE²R Messungen

Der Name SURFE²R ist als Abkürzung aus *Surface Electrogenic Event Reader* entstanden. Das Gerät SURFE²R One wurde ursprünglich von der Firma IonGate Biosciences GmbH vertrieben, ist aber mittlerweile an die Firma Nanion Technologies GmbH übergegangen.

Die Messungen basieren auf dem *Solid Supported Membran* (SSM) Prinzip, das Ladungsverschiebungen über eine Membran detektiert und so eine zellfreie Elektrophysiologie ermöglicht [78, 79]. Es wurde also detektiert, wenn sich Ionen durch das zu untersuchende Membranprotein bewegten und je nach Ladung des Ions einen negativen oder positiven Strom erzeugten.

3.8.1 Herstellung von Proteoliposomen für SURFE²R Messungen

Zur Proteoliposomenherstellung für SURFE²R Messungen wurden zunächst 12 mg/ml *E. coli Polar Lipids* in Diethylether gelöst und anschließend unter Stickstoffbegasung und drehenden Bewegungen wieder evaporiert. Dadurch lagerte sich das Lipid in einer dünnen Schicht an der Glaswand an.

Die Lipidschicht wurde dann in dem benötigten Volumen Puffer, mit dem die Proteoliposomen gefüllt sein sollten, und Glasperlen solange durchmischt, bis alles Lipid

in eine gleichmäßigen Suspension gebracht war. Danach wurde langsam 10% Triton X-100 hinzugegeben, bis 1,7% in der Suspension erreicht waren und diese klar wurde. Die gelöste Lipidlösung wurde dann mit dem zu rekonstituierenden Protein in einem Lipid-zu-Protein Verhältnis von 10 zusammengebracht und für 30 min bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurden pro Ansatz 300 mg mit Methanol aktivierte Biobeads[®] gegeben und dies über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Biobeads[®] noch einmal ausgewechselt und für weitere 2 Stunden unter gleichen Bedingungen die restlichen Detergenzien entfernt. Die Proteoliposomen wurden hiernach bei 150 000 *g* für 45 min und bei 4 °C pelletiert und anschließend in 150 μ l Puffer gelöst. Hieraus wurden 10 μ l Aliquots erstellt, die bei -80 °C gelagert wurden.

Für die Negativkontrolle wurde anstatt des Proteins die gleiche Menge Puffer hinzugefügt.

3.8.2 Proteoliposomen mit Gramicidinporen

Für die Etablierung der SURFE²R Messungen wurden Gramicidinporen in Liposomen verwendet. Hierzu wurde von dem Gramicidin aus *Bacillus aneurinolyticus* (Gramicidin A, B, C und D) mit Methanol eine 10 μ M Stocklösung hergestellt. Mit dieser wurden dann die zuvor produzierten Liposomen mit einer Endkonzentration von 1 μ M Gramicidin für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Liposomen anschließend vermessen.

3.8.3 Sensorpräparation

Im ersten Schritt wurde die Goldschicht im Sensor mit 50 μ l SensorPrepA thioliert. Hierbei bildete sich innerhalb von 10 bis 15 min bei Raumtemperatur in einer geschlossenen Petrischale ein Thiolmonolayer aus. Die Lösung wurde als nächstes durch dreimaliges Waschen mit dest. Wasser wieder aus dem Sensor entfernt, dann mit gasförmigem Stickstoff begast und für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die restlichen Lösungsmittel zu evaporieren.

Im nächsten Schritt wurde 1,5 μ l der Lipidlösung SensorPrepB auf den thiolierten Sensor gegeben, ohne dass die Oberfläche berührt wurde. Gleich danach wurden

50 μl proteinspezifischer, nicht-aktivierender Puffer hinzugegeben. Nun wurde der Sensor für 60 min bei 4 °C inkubiert, damit sich die Lipidmonolayer ausbilden konnte.

Im letzten Schritt wurden die Proteoliposomen auf den Sensor appliziert. 5 bis 10 μl Proteoliposomenlösung wurden hierfür mit dem sich bereits auf dem Sensor befindlichen nicht-aktivierenden Puffer vermischt und anschließend mit 2500 g 45 min zentrifugiert. Über Nacht wurde der Sensor dann bei 4 °C in einer luftdichten Box inkubiert.

3.8.4 Durchführung der SURFE²R Messungen

Bevor die ersten Messungen gestartet wurden, musste zuerst der Dummysensor (Sensor ohne Goldbeschichtung) angebracht werden. Hiernach wurde das ganze System initialisiert („1. Initialize System“), wobei die Referenzelektrode und die Puffertanks mit Puffer gefüllt wurden. Im nächsten Schritt musste der zu vermessende Sensor gegen den Dummysensor („2. Change Protein Sensor“) ausgetauscht werden. Hierbei wurden auch die Kapazität und die Leitfähigkeit des Sensors bestimmt, die im Bereich von 2 bis 30 nF und 0,4 bis 2,5 nS liegen sollten. Nun konnte mit der eigentlichen Messung begonnen werden. Es wurden die Sequenzen, die in den Tabellen 3.8 bis 3.11 beschrieben sind, verwendet. Hier wurden die Fließgeschwindigkeit, die Dauer des Pufferstroms und die Pufferreihenfolge definiert, die typischerweise zwischen dem nicht-aktivierenden (B und C) und dem aktivierenden Puffer (A) alterniert.

Für jeden aktivierenden Puffer wurden zwölf Messungen getätigt, wovon erst die letzten sechs recht konstant waren und in die statistische Auswertung flossen. Die ersten sechs Werte schwankten meistens noch stark, da sich noch eventuelle andere Moleküle aus z. B. dem Lagerpuffer auf dem Sensor befanden, die erst mit der Zeit weggespült wurden.

Es konnten nacheinander mehrere Sensoren vermessen werden, die aber auch immer mit der Sequenz „2. Change Protein Sensor“ ausgetauscht werden mussten.

Am Ende einer Messung wurde der SURFE²R mit der Sequenz „3. Finalize System“ unter anderen mit Ethanol gespült.

Tabelle 3.8: Sequenz einer SURFE²R Messung

Puffer	-	C	B	A	B	C	Flush B	Discard	-
Fließrate ($\mu\text{l/s}$)	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Dauer (s)	2,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5	5,0	30,0

Verstärkung: 10^9 V/A, Frequenz: 2000 s^{-1} **Tabelle 3.9:** Sequenz der SURFE²R Gramicidin-Messungen

Puffer	-	C	B	A	C	B	Flush B	Discard	-
Fließrate ($\mu\text{l/s}$)	270	270	270	270	270	270	270	270	270
Dauer (s)	2,0	3,0	1,0	1,2	1,0	2,0	1,0	10,0	20,0

Verstärkung: 10^9 V/A, Frequenz: 2000 s^{-1} **Tabelle 3.10:** Sequenz der SURFE²R AQP6-Messungen

Puffer	-	C	A	C	Flush C	Discard	-
Fließrate ($\mu\text{l/s}$)	200	200	200	200	200	200	200
Dauer (s)	1,0	2,0	2,0	2,0	1,5	5,0	30,0

Verstärkung: 10^9 V/A, Frequenz: 1000 s^{-1} **Tabelle 3.11:** Sequenz der SURFE²R EcFocA und PfFNT Messungen

Puffer	-	C	B	A	B	C	Flush B	Discard	-
Fließrate ($\mu\text{l/s}$)	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Dauer (s)	2,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5	5,0	30,0

Verstärkung: 10^9 V/A, Frequenz: 2000 s^{-1}

3.8.5 Auswertung der SURFE²R Messungen

Die Auswertung der erhaltenen Messergebnisse erfolgte zuerst über eine Mittelwertberechnung inklusive der dazugehörigen Standardabweichung.

$$\sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad (3.3)$$

Bei Inhibitormessungen wurden die Werte noch zusätzlich normalisiert, in dem der Quotient aus den inhibierten Werten zu den nicht-inhibierten Werten gebildet wurde.

3.9 Berechnung zum Wachstumsverhalten im *Batch*-Verfahren

Um das Wachstumsverhalten der *E. coli* und *D. discoideum* Zellen während der Fermentation und in der Schüttelkultur näher beschreiben zu können, wurden Berechnungen anhand der folgenden Annahmen unternommen.

Beim *Batch*-Verfahren wurde davon ausgegangen, dass es sich hierbei um geschlossene Systeme handelte. Es fand also kein Austausch in Form von zugegebenem Medium oder Entnahme der Kulturbrühe über die Zeit statt. Des Weiteren gelangten keine weiteren Organismen, außer der Startkultur in das System.

Das Monod-Model geht einschränkend von der Annahme aus, dass alle Zellen unsterblich und voll teilungsfähig sind. Zudem sind alle Zellen identisch und die betrachtete Population ist groß genug, dass sich die Zellen asynchron teilen können. Außerdem gibt es keine Substanzen, die das Zellwachstum inhibieren.

Bei einer halblogarithmischen Auftragung einer Wachstumskurve, mit einer logarithmischen Zellmassekonzentration gegen die lineare Zeit, stellte die Steigung der Geraden die spezifische Wachstumsrate μ dar. Hierbei spielte es keine Rolle, ob die Zellmassekonzentration über die Biomassekonzentration, Zellzahlkonzentration oder optische Dichte bestimmt wurde. Wichtig war nur, dass diese Werte proportional zu-

einander waren. Somit konnte diese Gleichung aufgestellt werden:

$$\ln\left(\frac{OD}{OD_0}\right) = \ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = \mu \cdot t \quad (3.4)$$

Die Verdopplungszeit für Zellmassenkonzentrationen ließ sich aus der integrierten Monod-Kinetik

$$x_t = x_0 \cdot e^{\mu_{max} \cdot (t_d)}, \quad (3.5)$$

in die für $x_t = 2x_0$ eingesetzt wird, berechnen:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad \text{bzw.} \quad t_{d,min} = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \quad (3.6)$$

x = Biomassenkonzentration

x_0 = Biomassenkonzentration zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase

μ = spezifische Wachstumsrate

t_d = Verdopplungszeit

Neben der Zellmassenkonzentration x hatte sich auch die Verwendung der Zellzahlkonzentration N durchgesetzt. Hier wurde durch Auszählen der Zellen ein Wert pro Volumen ermittelt. Anstatt der zuvor beschriebenen spezifische Wachstumsrate μ für die Zellmassenkonzentration, wurde diese bei der Zellzahlkonzentration mit der spezifische Teilungsrate ν beschrieben.

Die Zellzahlkonzentration verdoppelte sich pro Generation und besaß nach n Generationen somit 2^n Zellen. Die Zeit, die dafür benötigt wurde, war die Generationszeit t_g . Demnach galt:

$$N_t = N_0 \cdot 2^{\left(\frac{t}{t_g}\right)} \quad (3.7)$$

Equivalent zu Gleichung 3.6 konnte nun auch die Generationszeit aus der spezifischen Teilungsrate errechnet werden.

$$t_g = \frac{\ln(2)}{\nu} \quad (3.8)$$

N = Zellzahlkonzentration

ν = spezifische Teilungsrate

t_g = Generationszeit

[80]

3.10 Proteinherstellung und Funktionstestung in *Dictyostelium discoideum*

Die soziale Amöbe *Dictyostelium discoideum* wurde als ergänzendes Expressionssystem für das humane Aquaporin 11 verwendet, da sich dieses nach Öberg (2009) [34] nicht in Hefen herstellen ließ und keine funktionelle Expression in *Xenopus* Oozyten möglich war [27, 28]. Das einzige System, in dem bisher das hAQP11 funktionell hergestellt werden konnte, ist das der Sf9 Insektenzellen [29, 35].

3.10.1 Kultivierung von *D. discoideum*

D. discoideum Ax2 Zellen wurden axenisch im Amöbenstadium in flüssigem HL5 Medium mit 0,5% Glukose bei 22 °C kultiviert. Bei Bedarf wurden 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin zu dem Medium gegeben. Unter normalen Umständen wurden die Amöben adhärent in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser mit 10 ml Medium inkubiert, wobei hier bei einer konfluenten Petrischale eine Zellzahl um $2 \cdot 10^7$ bis $3 \cdot 10^7$ Zellen erreicht wurde. Sobald sie diesen Zustand erreicht hatten, mussten die Zellen durch einfaches Abspülen ausgedünnt werden. Sie besaßen eine Generationszeit von 10 bis 12 Stunden.

Für höhere Zellzahlen konnte eine konfluente mit Zellen gewachsene Petrischale in eine Schüttelkultur überführen werden und es wurden hier bei 100 ml HL5 Medium mit Glukose, 22 °C und 150 rpm innerhalb von 24 Stunden circa 10^8 Zellen erhalten. Die Zellzahlen wurden mit einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer bestimmt.

3.10.2 Anlegen von *D. discoideum* Dauerkulturen und Entwicklung zu Sporen

Es wurden sowohl Dauerkulturen von *D. discoideum* im Amöbenstadium als auch von Sporen angelegt.

3.10 Proteinherstellung und Funktionstestung in *Dictyostelium discoideum*

Für eine Dauerkultur von Amöben wurden $2 \cdot 10^7$ Zellen aus einer Schüttelkultur mit 1 000 g bei 4 °C über 5 min abzentrifugiert und das Pellet anschließend für 5 min auf Eis gehalten. Hiernach wurde 1 ml HL5 Medium mit Glukose und 10 % DMSO zugefügt und erneut für 5 min auf Eis gehalten. Nun wurden die Zellen für 2 Stunden bei -20 °C und anschließend dauerhaft bei -80 °C gelagert.

Für die Sporenbildung benötigte man zu Beginn $1 \cdot 10^8$ Amöben aus einer Schüttelkultur, die ebenfalls bei 1 000 g bei 4 °C über 5 min pelletiert, danach zweimal mit 20 ml eiskaltem Sörensen-Phosphatpuffer gewaschen und anschließend in 5 ml Sörensen-Phosphatpuffer resuspendiert wurden.

Die 5 ml wurden nun auf eine Sörensen-Phosphatpuffer Agarplatte gegeben und den Zellen wurde mindestens 30 min Zeit gelassen sich abzulagern. Hiernach wurde der flüssige Überstand beseitigt und die Zellen differenzierten sich über zwei Tage bei 22 °C in einer Feuchtkammer zu Sporen.

Die Sporen wurden dann von der Agarplatte gesammelt und in 500 μ l 60 % Glycerol dauerhaft bei -80 °C gelagert.

3.10.3 Transformation von *D. discoideum*

Die Transformation von *D. discoideum* Amöben fand durch eine Elektroporation statt. Hierfür wurden Amöben aus einer Schüttelkultur mit einer maximale Zellzahl von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml zuerst 15 min in $7 \cdot 10^6$ Zellen pro Transformationsansatz auf Eis inkubiert und anschließend mit 2 000 g bei 4 °C über 5 min pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit kaltem H50 Puffer gewaschen und die $7 \cdot 10^6$ Zellen pro Transformationsansatz wurden in 700 μ l H50 Puffer resuspendiert. Dann wurden 10 μ g Plasmid-DNA zugegeben und die Zellen in 4 mm Elektroporationsküvetten (Molecular BioProducts™ Electroporation Cuvettes, Thermo Scientific) im Gene Pulser® II Electroporation System (Biorad) mit 50 μ F, 1,2 kV mit zwei Impulsen im 5 Sekunden Abstand elektroporiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für einen Tag in HL5 Medium mit Glukose und Penicillin/Streptomycin gelagert. Danach wurde 10 μ g/ml G418 zur Selektion zu den Zellen gegeben.

3.10.4 Probenvorbereitung der Amöben für Western-Blotting

Für eine Immundetektion von einzelnen Proteinen wurde das Western-Blotting durchgeführt. Hierzu wurden $1 \cdot 10^8$ Zellen zunächst mit $1\,000\text{ g}$ bei 4°C über 5 min abzentrifugiert und das Pellet anschließend bei -80°C eingefroren.

Nach dem Auftauen wurde das Pellet in $500\ \mu\text{l}$ eiskalten KK2 Puffer mit 20 mM EDTA resuspendiert. Dies wurde nun fünfzehnmal durch eine 23 Gauge Kanüle gezogen. Von dem Zellysate wurde als Nächstes der Gesamtproteingehalt bestimmt und mit dem SDS-Ladepuffer auf eine Zellzahl von $8 \cdot 10^6$ Zellen/ $20\ \mu\text{l}$ gebracht.

Die Probe wurde anschließend bei 37°C für 30 min inkubiert und pro SDS Gel Tasche $20\ \mu\text{l}$ aufgetragen.

3.10.5 Probenvorbereitung der Amöben für *Stopped Flow* Messungen

Für *Stopped Flow* Messungen von *D. discoideum* wurden mindestens $1 \cdot 10^8$ Amöben aus einer Schüttelkultur benötigt, die als Erstes mit $1\,000\text{ g}$ bei 4°C über 5 min abzentrifugiert wurden. Das Pellet wurde anschließend einmal mit Sörensen-Phosphatpuffer gewaschen und dann so resuspendiert, dass eine Zellzahl von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml erreicht wurde.

Alternativ zum Sörensen-Phosphatpuffer konnten die Zellen auch in frischem HL5 Medium nach dem ersten Zentrifugationsschritt resuspendiert werden. Auch hier sollte eine Zellzahl von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml erreicht werden. Bis zum Vermessen wurden die Amöben auf Eis gelagert.

3.10.6 Fluoreszenzmikroskopie

Um den Transformationserfolg zu überprüfen, konnte dies auch in den lebenden *D. discoideum* Amöben mittels der GFP Fluoreszenz erfolgen. Hierfür wurden $200\ \mu\text{l}$ der Zellen in eine 96 Well, PS, μClear , Chimney Well Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One) gegeben und im ImageXpress Micro XLS Widefield High Content Screening System (Molecular Devices) mit 100facher Vergrößerung vermessen. Bei einer Anregung von 472 nm und einer Emission von 520 nm wurde die GFP-Fluoreszenz

3.10 Proteinherstellung und Funktionstestung in *Dictyostelium discoideum*

detektiert. Ebenso konnten hiermit Durchlichtbilder aufgenommen werden.

4 | Ergebnisse

4.1 Zellfreie Proteinsynthese

Zunächst mussten viele Methoden im Rahmen der zellfreien Proteinsynthese etabliert werden. Hierzu zählte im Besonderen die S30 Extrakt Herstellung aus *E. coli* Zellen, von dessen Qualität die gesamte zellfreie Proteinsynthese abhängt. Des Weiteren wurden Methoden zur Dokumentation der Qualität und Quantität der zellfrei hergestellten Proteine benötigt. Hierzu zählten insbesondere die Verwendung der richtigen Antikörper für das Western-Blotting und die Proteinreinigung. Erst diese Methoden ermöglichten den schnellen Prozess der zellfreien Herstellung von neuen Proteinen.

4.1.1 S30 Extrakt Herstellung

Der erste Schritt zur S30 Extrakt Herstellung bestand aus dem *Upstream Processing*, bei dem die *E. coli* Biomasse hergestellt wurde. Dies fand im *Batch*-Verfahren in einem einwandigen 5l Kulturgefäß mit Heizmanschette und Kühlfinger statt (Abschnitt 3.4.1).

Da die Kulturbrühe innerhalb von 45 min von den 37°C, die zur Kultivierung benötigt wurde, auf 12°C herunter gekühlt werden sollte [3], wurde zunächst der benötigte Temperaturverlauf von 14,5°C - 37°C - 14,5°C mit Wasser simuliert. Dabei stellte sich heraus, dass das Abkühlen mit dem vorhandenen Kühlfinger, der mit ca. 5°C Leitungswasser gespeist wurde, von 37°C auf 14,5°C 2 Stunden 25 min (Abbildung 4.1) benötigte. Stattdessen wurde hiernach der gesamte Fermenter zum Abkühlen ohne die Heizmanschette in Eiswasser gestellt. Nur so war es möglich die

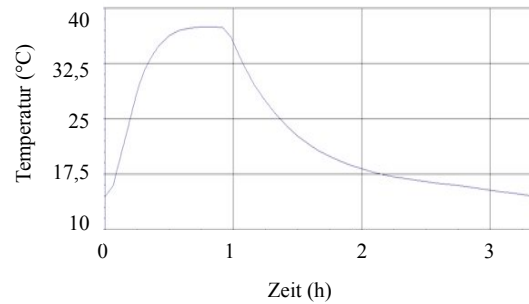


Abbildung 4.1: Verhalten des BIOSTAT[®] A plus (Satorius Stedim) Fermenters beim Aufheiz- und Abkühlvorgang. Der Aufheizvorgang fand mit einer Heizdecke statt, das Abkühlen mit einem Kühlfinger, der mit 4°C gespeist wurde.

Abkühlzeit von 45 min einzuhalten.

Nachdem der Kühlvorgang durchführbar war, wurde eine Fermentation mit den BL21(DE3) *E. coli* Zellen gefahren, um das Wachstumsverhalten des Stammes in unserem System zu charakterisieren.

Wie in Abbildung 4.2 zu sehen ist, wurde nach 6,5 Stunden Fermentation die sta-

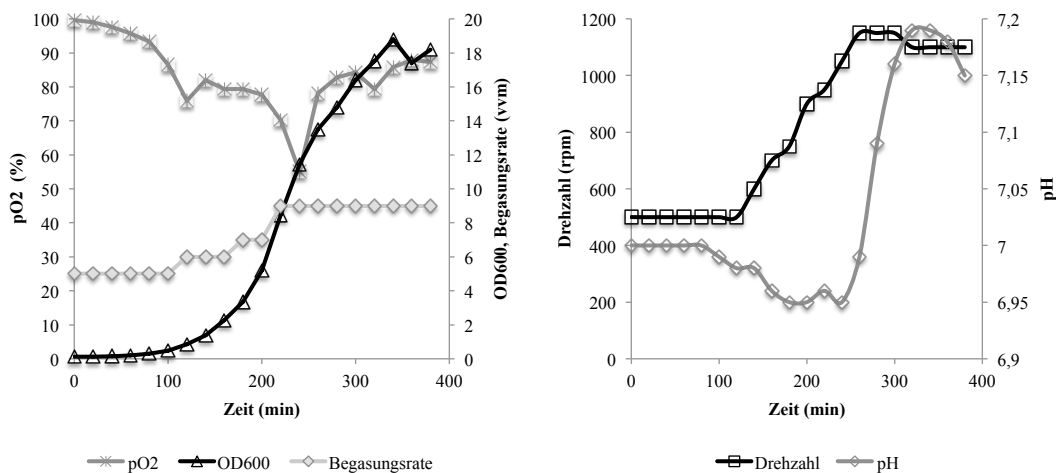


Abbildung 4.2: Fermentation der BL21(DE3) *E. coli* Zellen bis zur stationären Phase. Gezeigt werden die OD₆₀₀-, pO₂-, Rührerumdrehungszahl- und pH-Veränderungen über der Zeit

tionäre Phase mit einer OD₆₀₀ von 18,2 erreicht. Die maximale Wachstumsrate μ_{max} lag bei $1,4\text{ h}^{-1}$ und somit hatten die *E. coli* Zellen eine minimale Verdopplungszeit $t_{d,minimal}$ von 0,49 h. Während der gesamten Fermentation wurde versucht den Sauer-

stoffpartialdruck pO_2 mittels der Rührerdrehzahl und der Begasungsrate möglichst über 60% zu halten. Der entstandene Schaum wurde vermindert, indem weitere $300 \mu\text{l}$ *Antifoam* zu den bereits $500 \mu\text{l}$ im Medium enthaltenen gegeben wurde. Zur Stabilisation des pH Wertes wurden sowohl Natronlauge als auch Salzsäure in das System gegeben.

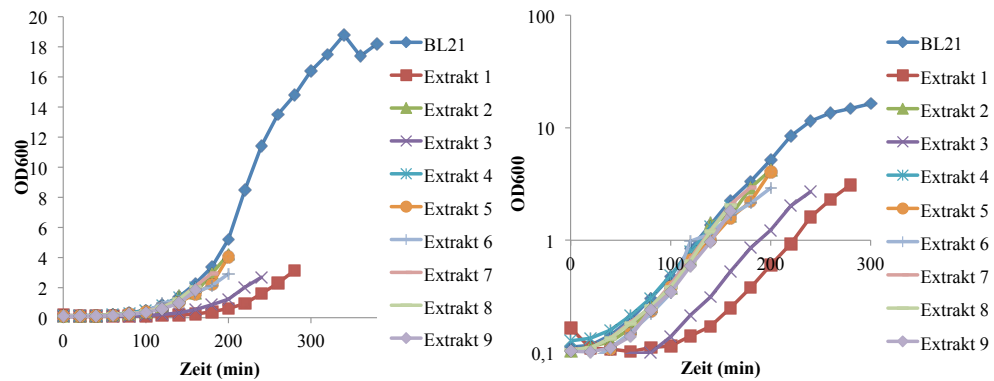


Abbildung 4.3: Chargen der Fermentation von BL21 *E. coli* Zellen für den S30 Extrakt. BL21 steht für die vollständigen Fermentation bis zur stationären Phase und die S30 Extrakte sind von 1 bis 9 durchnummeriert. Die rechte Abbildung stellt die OD_{600} Werte logarithmisch dar.

Insgesamt wurden neun Chargen S30 Extrakt aus den BL21(DE3) *E. coli* Zellen hergestellt. Die jeweiligen Wachstumskurven der Fermentationen wurden im Vergleich zu der vollständigen Fermentation bis zur stationären Phase in Abbildung 4.3 dargestellt. Zu sehen war hier, dass die verschiedenen Fermentationen unterschiedlich lange *Lag*-Phasen besitzen, die zwischen 40 und 140 min variieren. Danach verliefen die exponentiellen Phasen vergleichbar, obwohl hier geringe Unterschiede, wie an der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{max} ($1,21 \text{ h}^{-1}$ bis $1,58 \text{ h}^{-1}$) und der minimalen Verdopplungszeit $t_{d,min}$ ($0,44 \text{ h}$ bis $0,57 \text{ h}$) in Tabelle 4.1 zu sehen ist, gegeben waren. Ebenso variierten bei den verschiedenen Fermentationen auch die OD_{600} von 2,3 bis 5,2, die nach dem Abkühlen des Fermenters erreicht wurde.

Insgesamt wurden hier Ausbeuten von 22 g bis 42 g Nassgewicht der Zellen nach der Fermentation erhalten und Endvolumina zwischen 10 ml und 26 ml nach Aufarbeitung des Extraktes.

Die in Abbildung 4.1 dargestellte Effizienz bezog sich auf einen laborinternen Referenzextrakt. Auffällig war hier, dass die Effizienz mit der Zeit deutlich stieg und ab dem 5. S30 Extrakt sogar die Effizienz der Referenz übertraf.

Tabelle 4.1: Vergleich der Effizienz und des erhaltenen Volumens der Extrakte, sowie die maximalen spezifischen Wachstumsraten μ_{max} und der minimalen Verdopplungszeit $t_{d,min}$ der Fermentationen.

	Extrakte								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Effizienz (%)	36	13	27	8	131	127	39	131	141
Volumen (ml)	10	11	11	-	16	-	26	22	21
μ_{max} (h^{-1})	1,35	1,39	1,23	1,26	1,55	1,21	1,32	1,44	1,58
$t_{d,min}$ (h)	0,51	0,5	0,56	0,55	0,45	0,57	0,53	0,48	0,44

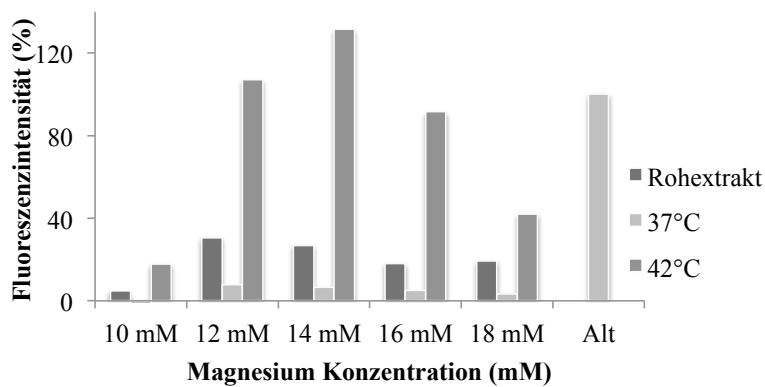


Abbildung 4.4: Vergleich verschiedener Protokolle zur S30 Extrakterstellung. Verglichen werden zwei Protokolle von Kim *et al.* [81] (Rohextrakt, 37°C) mit dem Standardprotokoll von Schwarz *et al.* [3] (42°C).

Neben dem Protokoll von Schwarz *et al.* [3] wurde dieses mit zwei weiteren Protokollen von Kim *et al.* [81] verglichen. Das eine Protokoll endete direkt nach dem zweiten Ultrazentrifugationsschritt, hier wurde der Extrakt keinem Hitzeschock von 42 °C unterworfen (Rohextrakt). Alternativ zu diesem Protokollen, wurde ein verkürzter Hitzeschock von nur 30 min bei 37 °C, statt 45 min bei 42 °C durchgeführt und hiernach der Extrakt direkt schockgefroren (37 °C).

Die Effizienz dieser beiden Extrakte wurde mit einer Testexpression des GFPs in einem Magnesiumscreen (Abbildung 4.4) mit dem Standardprotokoll (42 °C) und dem Referenzextrakt (Alt) verglichen. Für diesen Vergleich wurde dieselbe Fermentationscharge an *E. coli* Zellen in drei gleiche Teile aufgeteilt. Zu sehen war hier, dass das Standardprotokoll von Schwarz *et al.* [3] (42 °C) eine Effizienz von 131 % bei 14 mM Magnesium zeigte, die Alternativprotokolle von Kim *et al.* [81] hier aber nur eine Effizienz von 30 % (Rohextrakt) und 8 % (37 °C) ergaben.

4.1.2 T7-RNA-Polymerase Herstellung

Die T7-RNA-Polymerase wurde ebenfalls nach dem Protokoll von Schwarz *et al.* [3] hergestellt. Die *E. coli* Zellen aus 2l Flüssigmedium wurden mit der *French Press*

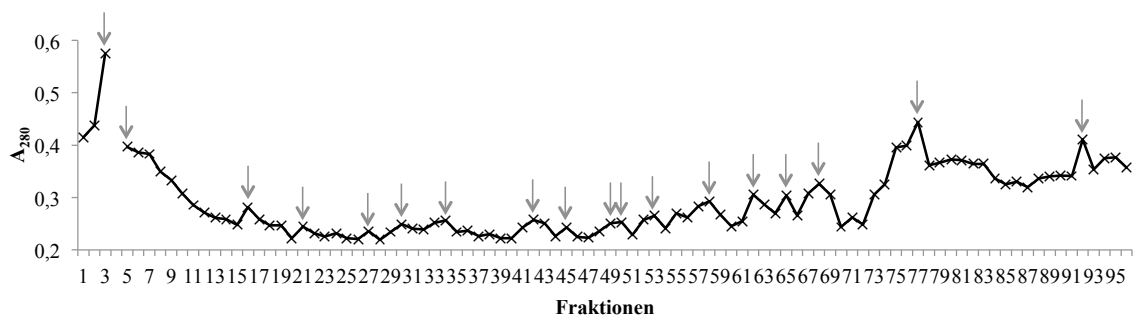


Abbildung 4.5: Absorption der erhaltenen Fraktionen bei 280 nm nach der Ionenaustauschchromatographie. Die Fraktionen, die mit einem Pfeil gekennzeichnet sind, wurden für das Western-Blotting verwendet.

aufgeschlossen, die Nukleinsäuren ausgefällt und Zelltrümmer abgetrennt. Der erhaltene Überstand wurde anschließend an einen Anionenaustauscher gebunden (Abschnitt 3.4.2). Hierbei wurden nach der Ionenaustauschchromatographie insgesamt 96 Fraktionen mit jeweils 12 ml erhalten. Diese wurden in einem UV/Vis Spektrometer bei einer Absorption von 280 nm vermessen. Die Absorptionswerte sind in

Abbildung 4.5 dargestellt und variierten von 0,21 bis 0,57. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Fraktionen wurden für das Western-Blotting verwendet, das in Abbildung 4.6a gezeigt ist. Aus den positiven Western-Blotting Signalen wurden zwei Chargen gewonnen; die erste Charge waren die vereinten Fraktionen 56 bis 65, die insgesamt eine Proteinmenge von 16,8 mg enthielten. Die zweite Charge beinhaltete die Fraktionen 49 bis 55 und 66 bis 69. Hier waren die Proteinkonzentrationen geringer als bei den Fraktionen der ersten Charge, aber es war immer noch ein positives Westernblotsignal vorhanden. Diese Fraktionen enthielten 15,5 mg Protein. Insgesamt besaßen die beiden neu hergestellten Chargen 1 und 2 Effizienzen von 129 % und 105 % gegenüber der zuvor in der Arbeitsgruppe hergestellten T7-RNA-Polymerase (Abbildung 4.6b).

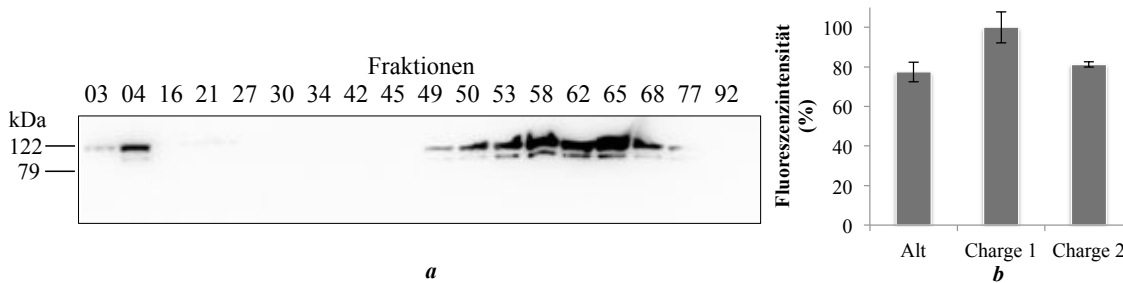


Abbildung 4.6: Western-Blotting von ausgewählten Fraktionen nach der Ionenaustauschchromatographie und Effizienz der T7-RNA-Polymerase nach der Aufarbeitung. Der Westernblot in (a) zeigt den T7-RNA-Polymerasegehalt nach der Reinigung. Verwendet wurde der T7-RNA-Polymerase Antikörper. In (b) wird die Effizienz der zwei neuen Chargen T7-RNA-Polymerase mit der zuvor hergestellten T7-RNA-Polymerase verglichen (n=2).

4.1.3 Analytischer und präparativer Ansatz

Zu Beginn wurde die zellfreie Expression mit dem pET21 Vektor durchgeführt. In diesem Konstrukt war noch keine *gfp* Sequenz enthalten und somit ließen sich noch keine GFP-Fusionsproteine herstellen. Zudem erwies er sich als schlecht sequenzierbar. Der Detergenzscreen von hAQP6 (Abbildung 4.10) wurde noch in diesem Vektor durchgeführt. Der ebenfalls in der Arbeitsgruppe vorhandene pIVEX2.3w-GFP Vektor lieferte die gleichen Ausbeuten, wie der pET21 Vektor und ließ sich

zuverlässig sequenzieren. Er wurde ab diesem Zeitpunkt verwendet.

Bei der weiteren Etablierung des zellfreien Systems fiel bei dem EcFocA auf, dass die

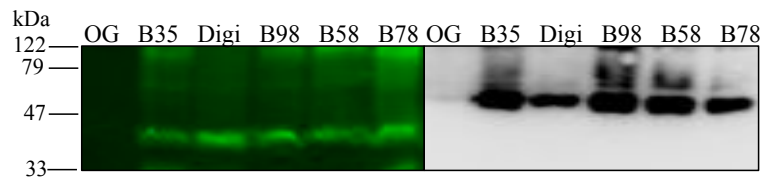


Abbildung 4.7: Erster Detergenzienscreen von EcFocA-GFP im analytischen Ansatz. Links ist die In-Gel Fluoreszenz zu sehen, rechts der Westernblot mit dem monoklonalen Anti-GFP Antikörper. Die Banden laufen in unterschiedlicher Höhe, da der monoklonale Maus Anti-GFP Antikörper nicht beide Faltungsformen erkennt.

fluoreszierende Bande im SDS-Gel ca. 10 kDa kleiner lief, als im dazugehörigen Westernblot, nachgewiesen mit einem monoklonalen Anti-GFP Antikörper (Maus) (Abbildung 4.7). Daraufhin wurde das Western-Blotting mit einem polyklonalen GFP (FL) Antikörper (Kaninchen) durchgeführt, bei dem sich dann eine zweite Bande auf Höhe der fluoreszierenden Bande zeigte (Abbildung 4.8). Die GFP-Fusionsproteine zeigen also zwei Faltungsformen, von denen die ca. 10 kDa kleinere Bande im SDS-Gel fluoresziert.

Zu Beginn des analytischen Ansatzes wurde der *Reaction Mix* direkt mittels SDS

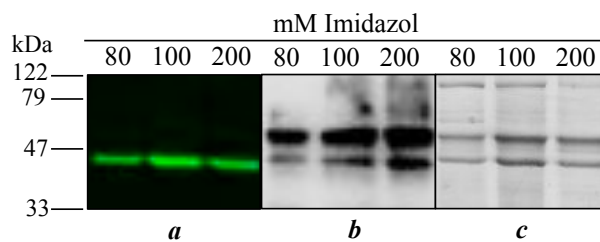


Abbildung 4.8: Präparativ hergestelltes EcFocA-GFP in Brij58. Zu sehen sind drei Elutionsschritte der Proteinreinigung mit 80 bis 200 mM Imidazol. (a) zeigt die In-Gel Fluoreszenz, (b) den Westernblot mit dem GFP (FL) Antikörper und (c) das mit Coomassie gefärbte Gel. Deutlich zu sehen sind die zwei Banden, von denen die untere fluoresziert.

PAGE aufgetrennt und sowohl durch die In-Gel Fluoreszenz, als auch durch die Westernblotsignale die entsprechenden Proteine detektiert. Doch besonders bei den

Westernblots zeigten sich unscharfe Banden (Abbildung 4.9a), zum einen hervorgerufen durch die ebenfalls im *Reaction Mix* vorhandenen Proteine, zum anderen aber durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Ansätze, verursacht durch die variierenden Detergenzienarten und -konzentrationen.

Nach dieser Beobachtung wurde mit der Nickelreinigung über den poly-His-Tag be-

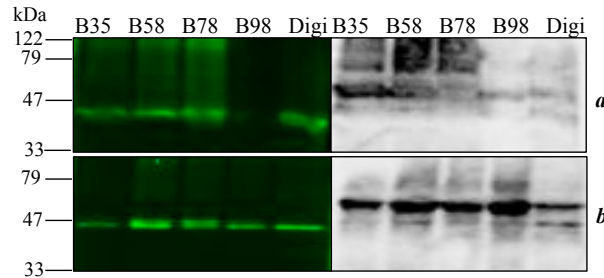


Abbildung 4.9: Vergleich von nicht gereinigten Ansätzen mit den gereinigten Ansätzen. Durchgeführt wurde ein Detergenzienscreen von EcFocA-GFP, (**a**) zeigt die Proben ohne die anschließende Reinigung und (**b**) die gereinigten Ansätze. Für das Western-Blotting wurde der GFP (FL) Antikörper verwendet.

gonnen (Abschnitt 3.4.5). Hier wurden nun eindeutige Banden erhalten (Abbildung 4.9b). Die Fluoreszenzausbeuten der nicht-gereinigten analytischen Ansätze zeigten keine Unterschiede zu den gereinigten Ansätzen.

Des Weiteren waren beim Western-Blotting weder durch den Maus Anti RGS-His, noch durch den Maus Anti-HA und den polyklonalen Kaninchen GFP (FL) Antikörper unspezifische Banden bei einem *Reaction Mix* ohne hergestelltes Protein detektierbar.

Insgesamt wurden zwölf verschiedene Proteine zellfrei hergestellt, wovon nur eines nicht exprimierbar war, der humane Ammonium Transporter Rh Typ C (hRhCG). Er besitzt eine N-Glykosylierung, die nicht mit dem *E. coli* basierten zellfreien System durchgeführt werden kann. Neun Membranproteine ließen sich zellfrei mit dem Zusatz von Detergenzien herstellen, wie in Abbildung 4.10 zu sehen ist (Abschnitt 3.4.3).

Es wurden sowohl die Signale der In-Gel Fluoreszenz und die des Westernblots als auch im Balkendiagramm die Fluoreszenzintensität der Banden aus dem SDS-Gel dargestellt (Abschnitt 3.4.6). Gezeigt sind hier unter anderem vier Proteine aus *P. falciparum*, wobei bei dreien die DNA codonoptimiert wurde (Abschnitt 3.2).

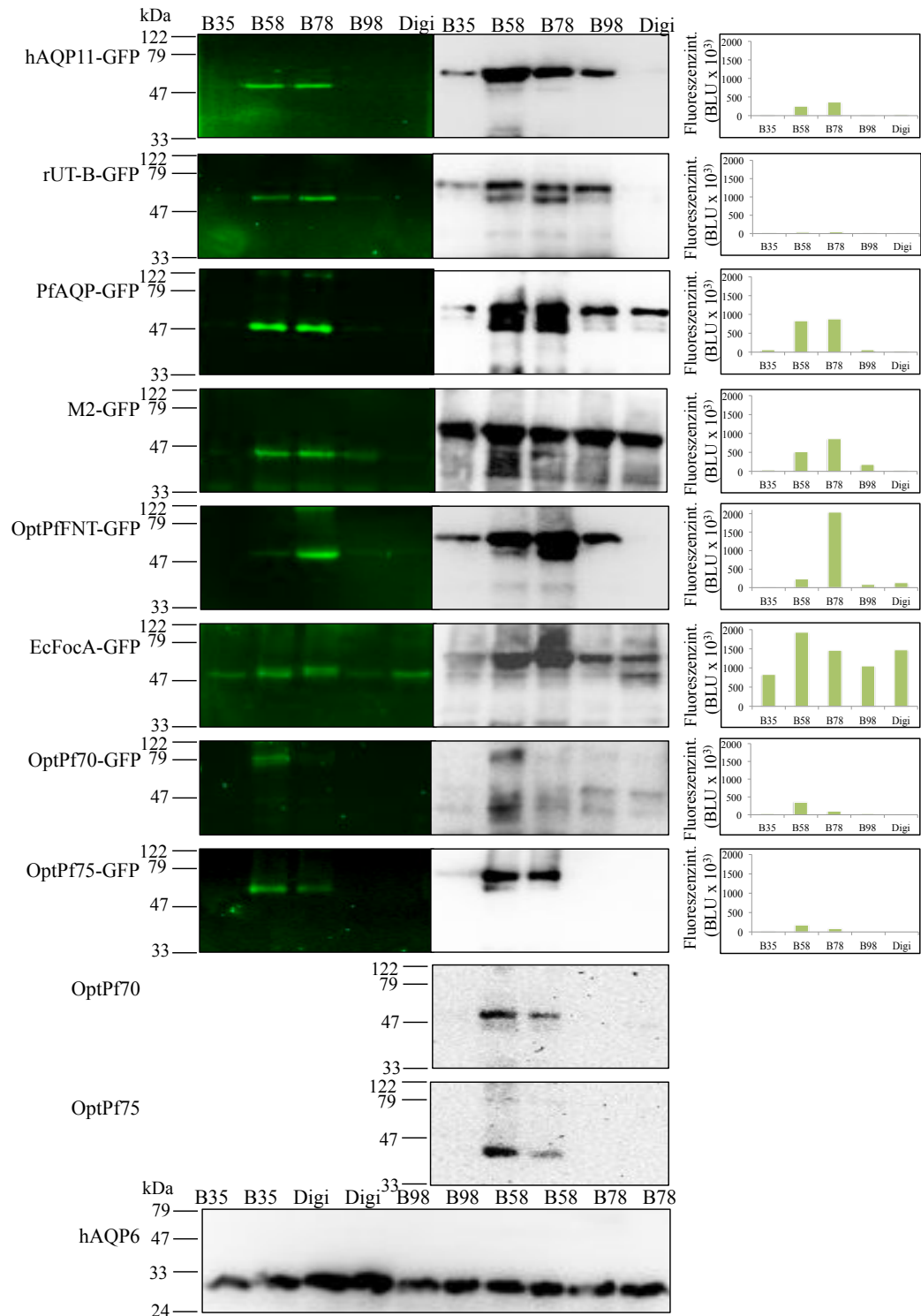


Abbildung 4.10: Detergenzcreens von acht GFP-Fusionsproteinen, sowie drei ohne GFP-Fusion. Als Standarddetergenzien wurde die Brij Familie und Digitonin verwendet. Links ist die In-Gel Fluoreszenz des GFPs der korrekt gefalteten Proteine zu sehen, rechts ein gegen GFP (GFP (FL) Antikörper) gerichteter Westernblot. OptPf70, OptPf75 und hAQP6 wurden mit dem Penta-His Antikörper detektiert.

Die optimierten Proteine wurden mit der Bezeichnung 'Opt' versehen: OptPffNT, OptPf70 und OptPf75. Pf70 und Pf75 war eine interne Bezeichnung für zwei putativen Monocarboxylat Transporter PF3D7-0926400 und PF3D7-0210300 aus *P. falciparum*. Allein das PfAQP ließ sich ohne Codonoptimierung in relativ hohen Fluoreszenz-Ausbeuten herstellen.

Neben den vier Proteinen aus *P. falciparum* wurden der virale Influenza A M2 Protonenkanal, ein bakterieller Formiat-Nitrit Transporter aus *E. coli* und drei Proteine aus Säugetieren exprimiert: der Urea Transporter aus der Ratte (rUT-B), hAQP11 und hAQP6.

Bei der vergleichenden Betrachtung der verschiedenen Detergenzcreens fielen vier Proteine auf, die im Vergleich zu den anderen Proteinen eine deutlich geringen Fluoreszenzintensität besaßen: hAQP11-GFP, rUT-B-GFP, OptPf70-GFP und OptPf75-GFP. Hingegen zeigten EcFocA-GFP und OptPffNT-GFP besonders hohe Fluoreszenzintensitäten. Allerdings konnte mit den Fluoreszenzintensitäten kein Rückschluss auf die Gesamtproteinausbeute gezogen werden, da hierbei nur die untere, vermutlich richtig gefaltete Bande betrachtet wurde. Die obere Bande zeigte sogar häufig größere Intensitäten im Westernblot als die untere Bande.

Hier fällt besonders das hAQP11 auf, bei dem viel Gesamtprotein hergestellt wird, aber das Verhältnis von unterer zu oberer Bande liegt deutlich auf der Seite der oberen Bande. Hier waren also weitere Optimierungsschritte notwendig, wie in Abschnitt 4.1.5 näher beschrieben.

Insgesamt wurde das GFP als Faltungskontrolle an die zu untersuchenden Proteine fusioniert. Die Theorie besagt hierbei, dass falsch gefaltetes Fusionsprotein nicht fluoresziert [82]. Zusätzlich war zu beobachten, dass die verschiedenen Faltungsformen in zwei Banden bei der SDS-PAGE laufen.

In Abbildung 4.11 sind die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten aller getesteten Proteine normiert in einem Diagramm dargestellt und hierbei wurde die maximale Fluoreszenzintensität auf 100 % gesetzt. Die Fluoreszenzmaxima aller getesteten Proteine sind bei der Brij Familie zu finden. 62,5 % (5) haben ihr Optimum bei Brij78, 37,5 % (3) bei Brij58. Beim Digitonin gibt es nur vom EcFocA-GFP eine 76 % Fluoreszenzintensität, bei den anderen Proteinen zeigt sich hier keinerlei richtig gefaltetes Protein und auch nur wenig falsch gefaltetes.

Des Weiteren wurden zwei lösliche Proteine zellfrei hergestellt. Zum einen das GFP, als Testprotein für das System. Durch dessen Fluoreszenz wurden die Proteinausbeuten verschiedener S30 Extrakte und T7-RNA-Polymerase Chargen miteinander

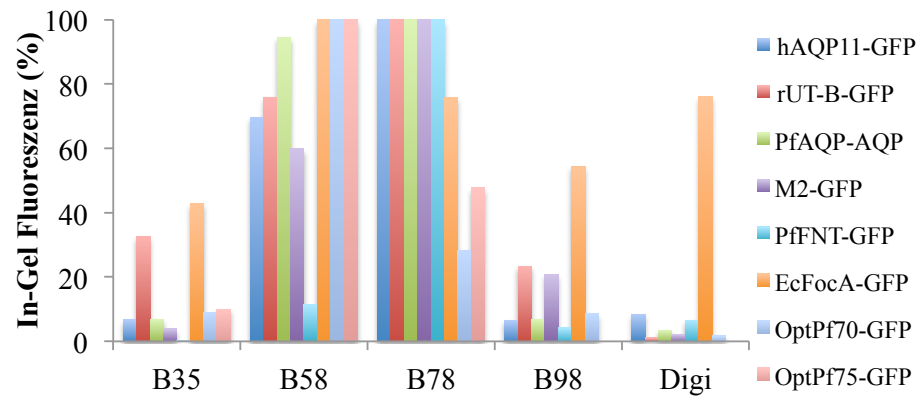


Abbildung 4.11: In-Gel Fluoreszenzintensitäten der getesteten Detergenzien von allen zellfrei hergestellten Proteinen. Zur Vergleichbarkeit wurde die maximale Intensität jedes der 8 Proteine auf 100 % gesetzt. Verglichen wurde die Brij-Familie und Digitonin.

verglichen.

Zum anderen wurde die Amoebapore A in Zusammenarbeit mit M. Michalek aus der Arbeitsgruppe Leippe hergestellt. Dieses Protein ist ein Toxin aus dem Parasiten *Entamoeba histolytica*, welches sich durch seine Toxizität nicht in anderen Systemen herstellen ließ.

Generell wurden beim präparativen Ansatz 1,5 bis 2 mg Protein pro Milliliter *Reaction Mix* erhalten.

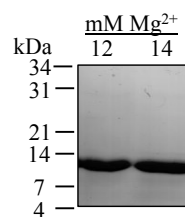


Abbildung 4.12: Silberfärbung vom zellfrei hergestellten Protein Amoebapore A mit unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen. Die Silberfärbung wurde von M. Michalek durchgeführt.

4.1.4 Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz

Zur Quantifizierung der GFP Fluoreszenz von reinem GFP und von den GFP-Fusionsproteinen waren zwei Methoden möglich (Abschnitt 3.4.6). Zum einen konnte die In-Gel Fluoreszenz nach der SDS PAGE mit der Auswertesoftware des Lumi-Imagers bestimmt werden. Hierbei konnte neben der Intensität auch die Proteingröße betrachtet werden.

Zum anderen konnte der entnommene Reaktionsansatz direkt mit der entsprechen-

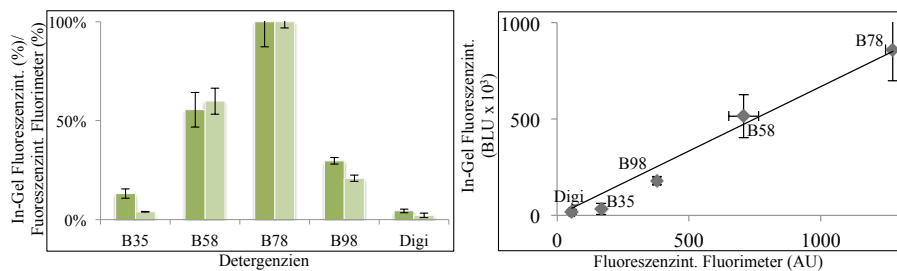


Abbildung 4.13: Korrelation zwischen der Fluoreszenzquantifizierung durch In-Gel Detektion im Vergleich mit der Vermessung des *Reaction Mix* im Fluorimeter von M2-GFP. Links ist der Vergleich zwischen der In-Gel Fluoreszenz mit der fluorimetrischen Direktmessung des *Reaction Mix* normalisiert im Balkendiagramm dargestellt, rechts die direkte Korrelation zwischen den beiden Verfahren.

den Verdünnung in Mikrotiterplatten im Fluorimeter vermessen werden. So war es möglich die Fluoreszenz sofort zu begutachten und der Prozess der SDS PAGE wurde erspart. Hier ließ sich auch auf die fluoreszierende Proteinmenge schließen, da je $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ GFP eine Intensität von 383 ± 84 am Fluorimeter erhalten wurde.

4.1.5 Zellfreie Herstellung des Aquaporin 11

Das humane Aquaporin 11 ließ sich im ersten Detergenzienscreen (Abschnitt 3.4.3) nur in sehr geringen Ausbeuten herstellen, die untere Bande zeigte im Westernblot nur sehr schwache Intensitäten. Neben der standardmässig verwendeten Brij Familie mit dem Digitonin, wurde daraufhin das hAQP11 auch mit weiteren, laut Klammt *et al.* [76] nicht ganz so erfolgreiche Detergenzien, getestet (Abbildung 4.14). CHAPS, DDM, OG, Triton X-100 und Tween 20 führten aber nicht zu Fluoreszenzsigna-

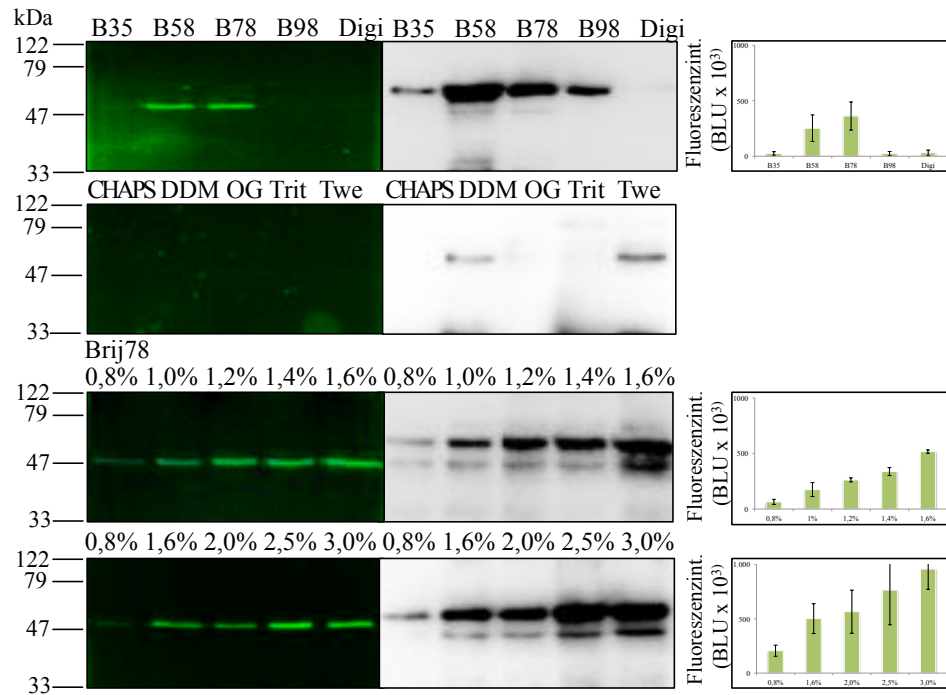


Abbildung 4.14: Detergenzscreen vom hAQP11-GFP mit verschiedenen Detergenzien und variierender Brij78 Konzentration. Links ist die In-Gel Fluoreszenz des korrekt gefalteten Proteins zu sehen, rechts ein gegen GFP (GFP (FL) Antikörper) gerichteter Westernblot. Des Weiteren sind die Fluoreszenzintensitäten der SDS Gele zu sehen. Als Detergenzien wurden die Brij Familie, Digitonin, CHAPS, OG, Triton X-100 und Tween 20 verwendet.

len, nur beim Westernblot war mit DDM und Tween 20 ein schwaches Signal auf Höhe der oberen Bande zu sehen. Daraufhin wurde die eingesetzte Konzentration von Brij78 variiert, die die stärkste Fluoreszenzintensität erbrachte. Standardmäßig wurden 0,8 % Brij78 verwendet, doch eine Erhöhung der Konzentration bewirkte einen linearen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Mit der 15 % Stocklösung konnte eine Endkonzentration von 1,6 % aufgrund des maximalen Volumens des Systems erreicht werden. Daraufhin wurde die Konzentration der Stocklösung auf 30 % Brij78 entsprechend der maximale Löslichkeit gebracht. Somit war es möglich im Ansatz eine Konzentration von 3 % zu erhalten. Auch hier stieg bis 3 % Brij78 die Fluoreszenzintensität kontinuierlich. Da das maximale Volumen hiermit erreicht war, konnten keine höheren Konzentrationen getestet werden.

Bei der Reinigung des präparativen Ansatzes (Abschnitt 3.4.4) wurde bei dem ansonsten standardmäßig verwendeten Puffer mit 20 mM Tris HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl mit 0,05 % DDM weder das hAQP11-GFP vollständig gebunden, noch ließ es sich komplett von den Nickel-NTA *Beads* eluieren, wie in Abbildung 4.15a zu sehen ist. Daraufhin wurde die DDM Konzentration auf 0,5 % und 1 % erhöht, aber das erbrachte das gleiche Bild. Ebenso bei CHAPS in Abbildung 4.15b.

Mit β -Octylglycosid (OG) wurde das Fusionsprotein nicht eluiert, viel befand sich im Durchfluss und etwas Protein war noch an den Nickel-NTA *Beads* gebunden. Bei Digitonin wurde zwar nicht alles gebunden, aber alles gebundene Protein wurde eluiert und es befand sich nichts an den Nickel-NTA *Beads* (Abbildung 4.15b). Das Problem mit Digitonin war aber, dass es schlecht wasserlöslich ist und somit bei den Konzentrationen ausfällt.

Daraufhin wurde die Proteinreinigung von hAQP11-GFP mit drei Vertretern aus der Fos-Choline Familie versucht, wie in Abbildung 4.15c gezeigt ist und schon vorher in der Publikation von Yakata *et al.* [29] für die Solubilisierung von Sf9 Insektenzellmembranen verwendet wurde. Hiermit ergaben sich die besten Ergebnisse: Fos-Choline-10, Fos-Choline-12 und Fos-Choline-16 zeigten alle kein Protein im Durchfluss und das Protein wurde bei 200 mM Imidazol quantitativ eluiert. Da die langkettigeren Fos-Choline-12 und Fos-Choline-16 deutlich stärker mit dem Bradford Test reagieren, wurde für die weitere Reinigung Fos-Choline-10 verwendet. Neben der Konzentrationsbestimmung mit dem Bradford Test wurde hier zusätzlich die Warburgformel verwendet.

Letztendlich ließen sich etwa 2,5 mg hAQP11 aus 1 ml zellfreien Ansatz herstellen

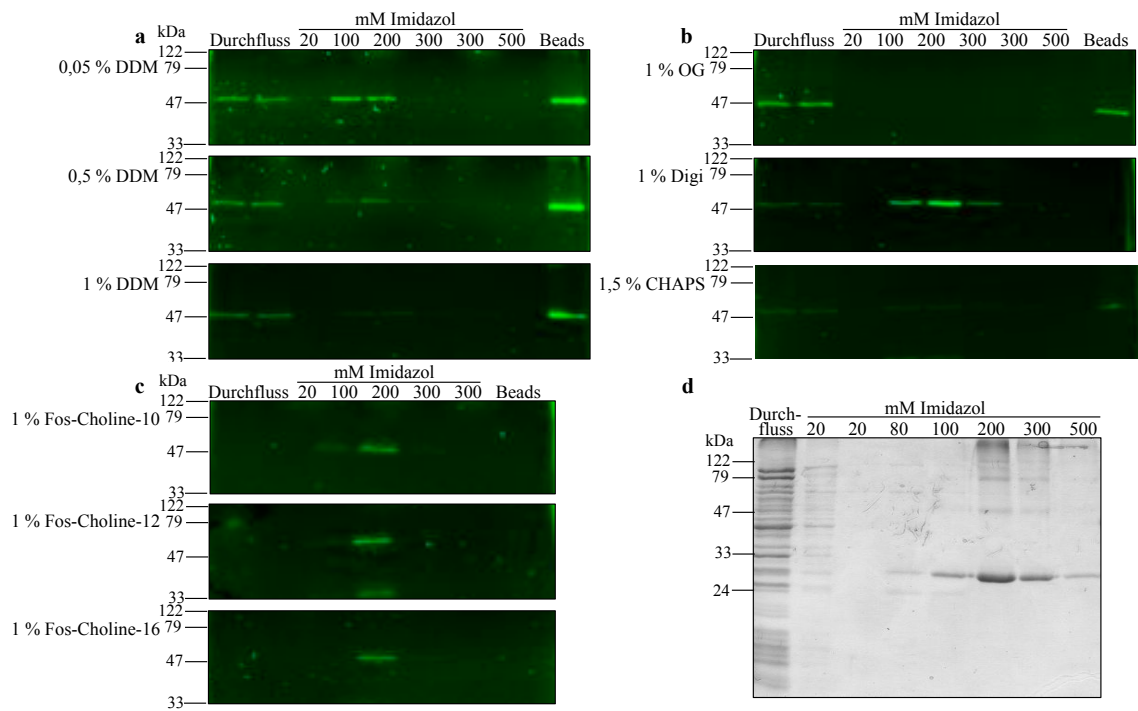


Abbildung 4.15: Nickelreinigung des hAQP11-GFP aus dem präparativen Ansatz. Probiert wurde dies mit unterschiedlichen Detergenzzusatz zu 20 mM Tris HCl, pH 8, 300 mM NaCl und 20 - 500 mM Imidazol. (**a**) zeigt die Reinigung mit DDM Konzentrationen zwischen 0,05 % und 1 % im Puffer, des Weiteren wurden in (**b**) OG, Digitonin und CHAPS und in (**c**) wurden drei Vertreter der Fos-Choline Familie als Detergen verwendet. (**d**) zeigt hAQP11 in einem Coomassie gefärbten SDS Gel mit Fos-Choline-10 als Detergen im Puffer.

und reinigen (Abbildung 4.15d).

4.2 Mutagenese des internen GFP-Startcodons

Bei der zellfreien Proteinsynthese wurde bei Herstellung von GFP-Fusionsproteinen zusätzlich immer auch das GFP alleine erhalten. Nach näherem Betrachten der Sequenz stellte sich heraus, dass das pIVEX2.3wGFP Plasmid an Position 1571 und 1580 - zu Beginn der *gfp* Sequenz - zwei Startmethionine besaß. Es wurde vermutet, dass auch diese bei der zellfreien Expression zur Initiierung der Translation genutzt wurden.

Für die Mutagenese-PCR (Abschnitt 3.1.8) wurden ein *forward* und ein *reverse* Primer entwickelt, die im Linkerbereich von der GFP-Sequenz begannen. Die Primer waren 46 Basen lang und ragten in die *gfp* Anfangssequenz hinein, wie in Abbildung 4.16 zu sehen ist. Durch die Primer fand ein Austausch der zwei ATG Tripletts zu

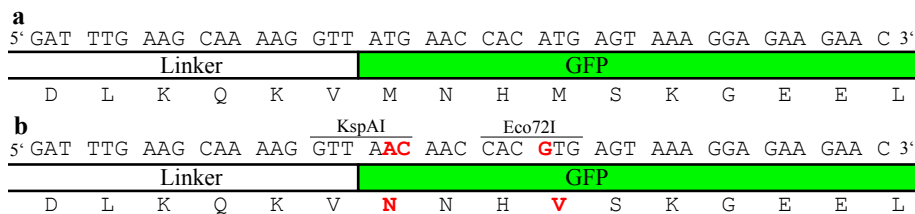


Abbildung 4.16: Das pIVEX2.3wGFP Plasmid mit (**a**) zwei Startmethionine am Anfang der *gfp* Sequenz. Nach der Mutation (**b**) sind die Methionine durch Asparagin bzw. Valin ausgetauscht und Schnittstellen für die Enzyme *KspAI* und *Eco72I* eingeführt.

AAC und GTG statt, sodass sich anstelle der beiden Methionine ein Asparagin und ein Valin befand. Des Weiteren wurden durch die Mutation eine *KspAI* und eine *Eco72I* Enzymschnittstelle erzeugt, mit denen der Erfolg der PCR durch Verdau einfach zu bestätigen war. Zusätzlich wurde die mutierte Sequenz noch sequenziert.

Bei einer anschließenden zellfreien Expression mit einem Detergenzenzscreen, zeigte sich, dass die In-Gel Fluoreszenz der GFP Bande zwar durch die Mutation deutlich reduziert (Abbildung 4.17), doch nicht verschwunden war.

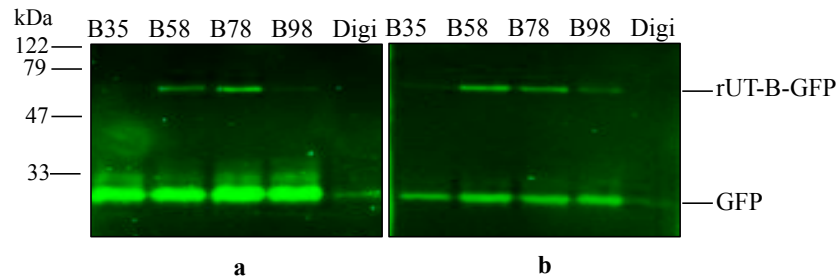


Abbildung 4.17: In-Gel Fluoreszenz eines Detergenzienscreens von rUT-B-GFP. (**a**) zeigt den Detergenzienscreen mit den zwei Startmethionien in der *gfp* Sequenz und (**b**) zeigt den Detergenzienscreen nach der Mutation. B35=Brij35, B58=Brij58, B78=Brij78, B98=Brij98, Digi=Digitonin

4.3 Codonoptimierung von DNA Sequenzen

Das bisher unbekannte bzw. putative Protein PF3D7-0316600 aus dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum*, intern als PffNT bezeichnet, sollte zellfrei für weitere Funktionstestungen hergestellt werden. Doch dies war zunächst nicht möglich. Es war sowohl im SDS Gel keine Fluoreszenz auf der Höhe des Fusionsproteins bei 67 kDa sichtbar, als auch kein Signal im Westernblot. In Abbildung 4.18 ist bei allen

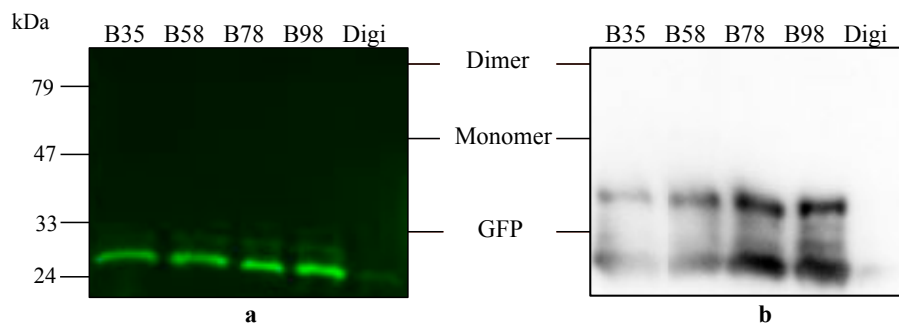


Abbildung 4.18: In-Gel Fluoreszenz und Westernblot vom Detergenzienscreen von zellfrei hergestelltem PffNT-GFP vor der Optimierung. (**a**) zeigt die In-Gel Fluoreszenz und (**b**) einen Westernblot mit dem GFP (FL) Antikörper. Zu sehen ist nur das GFP.

fünf Detergenzien nur das GFP alleine sichtbar, beim Digitonin allerdings nur sehr schwach.

Im Rahmen der Bachelorarbeit von C. Renn [83] konnten mittels des HA Antikör-

pers Signale auf Höhe des PffNT-GFP detektiert werden, aber es gab auch hier kein Fluoreszenzsignal. Das PffNT wurde also sehr schwach, aber wahrscheinlich nicht richtig gefaltet, im zellfreien System hergestellt. Ebenso konnte J. Rambow in der Hefe *S. cerevisiae* keine Expression nachweisen.

Vorversuche, ebenfalls durchgeführt von J. Rambow zur Expression der beiden putativen Monocarboxylat Transporter PF3D7-0926400 und PF3D7-0210300 ebenfalls aus *Plasmodium falciparum*, die intern mit Pf70 und Pf75 bezeichnet wurden, führten in *S. cerevisiae* auch zu keinem Ergebnis.

4.3.1 Codon Usage der *P. falciparum* Sequenzen

Da keine funktionelle Expression im zellfreien System und in der Hefe möglich war und bekannt war, dass das *P. falciparum* Genom einen sehr hohen A+T Gehalt von 80,6% [84] besitzt, war der nächste Schritt die drei Gensequenzen zuerst auf ihren A+T Gehalt und dann auf die Codonverteilung zu überprüfen. Das *pffnt* besitzt einen A+T Gehalt von 70%, *pf70* von 76% und *pf75* von 73%. Im *E. coli* Genom liegt dieser Wert bei 50% [85] und in der Hefe bei 62% [86]. Der A+T Gehalt überschritt somit den Gehalt in den Zielorganismen, die zur Expression verwendet werden sollten.

Beim Vergleich der Codonhäufigkeit der drei Gensequenzen mit der *E. coli* Codonverteilung fielen besonders drei Triplets auf (Abbildung 4.19): GGA (Glycin), AUA (Isoleucin) und UUA (Leucin). Diese kommen im Translationsvorgang in *E. coli* nur zu 9%, 7% und 11% vor, in der Sequenz von *pffnt* aber zu 41%, 54% und 64%. Die Häufigkeit war in der *pffnt*-Sequenz also bis zu achtfach erhöht.

Des Weiteren lagen die Häufigkeiten von den Triplets GGA, AUA und UUA beim *pf70* bei 41%, 54%, 67% und beim *pf75* bei 65%, 56%, 73%.

4.3.2 Codon Usage der optimierten *P. falciparum* Sequenzen

Nach der Optimierung (Abschnitt 3.2) sank der A+T Gehalt der *pffnt* Sequenz auf 55% und bei den beiden putativen Monocarboxylat Transportern *pf70* und *pf75* auf 61% und 58%. Besonders veränderte sich auch die Häufigkeit der drei auffälligen Triplets GGA, AUA und UUA. Wie beim *pffnt* in Abbildung 4.20 zu sehen ist, liegt

Codon usage:														
gca	Ala(A)	14	#	cag	Gln(Q)	0	#	uug	Leu(L)	8	#	uaa	Ter(.)	0
gcc	Ala(A)	1	#	---	Gln(Q)	3	#	---	Leu(L)	32	#	uag	Ter(.)	0
gcg	Ala(A)	1	#	gaa	Glu(E)	9	#	aaa	Lys(K)	17	#	uga	Ter(.)	1
gcu	Ala(A)	13	#	gag	Glu(E)	3	#	aag	Lys(K)	2	#	---	Ter(.)	1
---	Ala(A)	29	#	---	Glu(E)	12	#	---	Lys(K)	19	#	aca	Thr(T)	4
aga	Arg(R)	4	#	gga	Gly(G)	9	#	aug	Met(M)	8	#	acc	Thr(T)	4
agg	Arg(R)	0	#	ggc	Gly(G)	1	#	---	Met(M)	8	#	acg	Thr(T)	1
cga	Arg(R)	2	#	ggg	Gly(G)	3	#	uuc	Phe(F)	4	#	acu	Thr(T)	4
cgc	Arg(R)	0	#	ggu	Gly(G)	9	#	uuu	Phe(F)	20	#	---	Thr(T)	13
cgg	Arg(R)	0	#	---	Gly(G)	22	#	---	Phe(F)	24	#	ugg	Trp(W)	0
cgu	Arg(R)	0	#	cac	His(H)	2	#	cca	Pro(P)	4	#	---	Trp(W)	0
---	Arg(R)	6	#	cau	His(H)	7	#	ccc	Pro(P)	1	#	uac	Tyr(Y)	1
aac	Asn(N)	2	#	---	His(H)	9	#	ccg	Pro(P)	0	#	uau	Tyr(Y)	22
aau	Asn(N)	17	#	aua	Ile(I)	12	#	ccu	Pro(P)	1	#	---	Tyr(Y)	23
---	Asn(N)	19	#	auc	Ile(I)	1	#	---	Pro(P)	6	#	gua	Val(V)	13
gac	Asp(D)	0	#	auu	Ile(I)	9	#	agc	Ser(S)	1	#	guc	Val(V)	0
gau	Asp(D)	7	#	---	Ile(I)	22	#	agu	Ser(S)	4	#	gug	Val(V)	3
---	Asp(D)	7	#	cua	Leu(L)	2	#	uca	Ser(S)	3	#	guu	Val(V)	13
ugc	Cys(C)	0	#	cuc	Leu(L)	0	#	ucc	Ser(S)	2	#	---	Val(V)	29
ugu	Cys(C)	8	#	cug	Leu(L)	0	#	ucg	Ser(S)	2	#	nnn	???(X)	0
---	Cys(C)	8	#	cuu	Leu(L)	1	#	ucu	Ser(S)	6	#	TOTAL		310
caa	Gln(Q)	3	#	uua	Leu(L)	21	#	---	Ser(S)	18	#			

Abbildung 4.19: Einzelne Codonhäufigkeiten von *pfnt* vor der Optimierung. Besonders die grau hinterlegten Triplets kommen gegenüber dem *E. coli* Genom viel zu häufig vor. Es kommt zu einer Limitierung. Abbildung wurde erstellt mit der Software DNASTAR[®] Lasergene EditSeq V7.2.1.

Codon usage:														
gca	Ala(A)	7	#	cag	Gln(Q)	2	#	uug	Leu(L)	5	#	uaa	Ter(.)	0
gcc	Ala(A)	8	#	---	Gln(Q)	3	#	---	Leu(L)	33	#	uag	Ter(.)	0
gcg	Ala(A)	9	#	gaa	Glu(E)	8	#	aaa	Lys(K)	13	#	uga	Ter(.)	0
gcu	Ala(A)	5	#	gag	Glu(E)	5	#	aag	Lys(K)	6	#	---	Ter(.)	0
---	Ala(A)	29	#	---	Glu(E)	13	#	---	Lys(K)	19	#	aca	Thr(T)	5
aga	Arg(R)	0	#	gga	Gly(G)	4	#	aug	Met(M)	8	#	acc	Thr(T)	4
agg	Arg(R)	0	#	ggc	Gly(G)	5	#	---	Met(M)	8	#	acg	Thr(T)	2
cga	Arg(R)	0	#	ggg	Gly(G)	6	#	uuc	Phe(F)	10	#	acu	Thr(T)	3
cgc	Arg(R)	3	#	ggu	Gly(G)	7	#	uuu	Phe(F)	14	#	---	Thr(T)	14
cgg	Arg(R)	1	#	---	Gly(G)	22	#	---	Phe(F)	24	#	ugg	Trp(W)	0
cgu	Arg(R)	2	#	cac	His(H)	3	#	cca	Pro(P)	0	#	---	Trp(W)	0
---	Arg(R)	6	#	cau	His(H)	6	#	ccc	Pro(P)	1	#	uac	Tyr(Y)	10
aac	Asn(N)	11	#	---	His(H)	9	#	ccg	Pro(P)	3	#	uau	Tyr(Y)	13
aau	Asn(N)	8	#	aua	Ile(I)	4	#	ccu	Pro(P)	2	#	---	Tyr(Y)	23
---	Asn(N)	19	#	auc	Ile(I)	9	#	---	Pro(P)	6	#	gua	Val(V)	3
gac	Asp(D)	3	#	auu	Ile(I)	9	#	agc	Ser(S)	4	#	guc	Val(V)	5
gau	Asp(D)	4	#	---	Ile(I)	22	#	agu	Ser(S)	4	#	gug	Val(V)	12
---	Asp(D)	7	#	cua	Leu(L)	1	#	uca	Ser(S)	2	#	guu	Val(V)	9
ugc	Cys(C)	4	#	cuc	Leu(L)	3	#	ucc	Ser(S)	2	#	---	Val(V)	29
ugu	Cys(C)	4	#	cug	Leu(L)	17	#	ucg	Ser(S)	4	#	nnn	???(X)	0
---	Cys(C)	8	#	cuu	Leu(L)	3	#	ucu	Ser(S)	3	#	TOTAL		313
caa	Gln(Q)	1	#	uua	Leu(L)	4	#	---	Ser(S)	19	#			

Abbildung 4.20: Einzelne Codonhäufigkeiten von *pfnt* nach der Optimierung. Die grau hinterlegten Triplets besitzen nun gegenüber dem *E. coli* Genom eine vergleichbare Häufigkeit, ebenso die anderen. Die Limitierung ist aufgehoben. Abbildung wurde erstellt mit der Software DNASTAR[®] Lasergene EditSeq V7.2.1.

die Häufigkeit von GGA bei 18 %, von AUA bei 18 % und die von UUA bei 12 %. Die Häufigkeit war jetzt nur ca. doppelt so hoch wie bei *E. coli*.

Ebenso passten sich auch diese drei Triplets bei den Sequenzen von *pf70* und *pf75* an. Hier lagen sie jetzt beim *pf70* bei 13 %, 7 % und 13 % und beim *pf75* bei 14 %, 5 % und 13 %.

Diese drei optimierten Sequenzen wurden anschließend bei GeneArt[®] Gene Synthesis (Life Technologies) synthetisiert und in einem Standardvektor geliefert. Die optimierte *pfnt* Sequenz (Abbildung 4.21) besaß am 5' Ende eine *SpeI* Enzymschnittstelle und am 3' Ende eine *XhoI* Schnittstelle, was den Klonierungsprozess in den pIVEX2.3w und pIVEX2.3wGFP erleichterte. Zusätzlich befand sich in der Sequenz an Position 523 noch eine *EcoRV* Schnittstelle.

Die optimierten *pf70* (Abbildung 4.23) und *pf75* (Abbildung 4.22) Sequenzen besa-

```

1  ACTAG TATGC CTCCC AACAA CTCGA AATAT GTTCT TGACC CTGTT TCTAT
51  CAAAA GCGTG TGCGG AGGGG AAGAA AGCTA TATCC GTTGT GTTGA GTATG
101 GCAAG AAGAA AGCCC ATTAC AGTAA TCTGA ATCTT TTAGC CAAAG CTATT
151 CTGGC AGGGA TGTTT GTAGG CCTGT GTGCA CATGC GTCAG GAATC GCGGG
201 TGGGT TGTTT TACTA CCACA AACTG CGTGA GATTG TTGGA GCGTC TATGA
251 GTGTC TTTGT GTACG GCTTT ACATT TCCGA TAGCA TTCAT GTGCA TCATC
301 TGTAC CGGTT CGGAT TTGTT TACCG GTAAT ACACT AGCGG TCACA ATGGC
351 ACTGT ACGAA AAGAA AGTTA AACTT TTAGA CTATC TCCGG GTTAT GACCA
401 TCTCG TTATT TGGGA ACTAT GTCGG TGCAG TCTCA TTTGC TTTCT TTGTG
451 TCCTA CTTGT CGGGT GCTTT CACTA ACGTG CATGC TGTGG AAAAG AATCA
501 TTTCT TTCAG TTTCT GAATG ATATC GCAGA GAAGA AAGTT CACCA TACAT
551 TTGTG GAATG CGTTA GCTTA GCCGT GGGTT GTAAC ATATT TGTAT GCTTG
601 GCGGT GTATT TCGTG CTGAC TCTCA AAGAT GGGGC TGGGT ATGTA TTTTC
651 TGTGT TCTTT GCAGT TTATG CCTTT GCGAT TGCCG GCTAT GAGCA TATCA
701 TAGCC AACAT CTATA CCCTG AATAT AGCCC TGATG GTGAA TACGA AGATT
751 ACGGT GTATC AGGCC TATAT TAAAA ACCTG CTGCC GACAC TGTG GGC AA
801 CTACA TTGCG GGTGC GATTG TCCTG GACT GCGC TGTAT TTCAT TTACA
851 AAGAA CACTA CTACA ACTTC GAACG CAGTA AACGC GACAA CAATG ATGCG
901 CAAAT GAAAT CCCTG AGCAT TGAAC TGCGC AACCT CGAG

```

Abbildung 4.21: Optimierte DNA Sequenz von *pfnt*

ßen am 5' Ende sowohl eine *SpeI* als auch eine *EcoRI* Schnittstelle und am 3' Ende eine *XhoI*, ein Stopcodon und eine *BamHI* Schnittstelle. Diese Schnittstellen wurden ebenfalls eingeführt, um die Klonierung in die zellfreien Vektoren pIVEX2.3w und pIVEX2.3wGFP zu ermöglichen und zusätzlich kompatibel für die in der Arbeitsgruppe vorhandenen Hefektoren zu sein.

```

1  ACTAG TGAAT TCATG AAGAA AGAGA ACACT TCGCT GCTGA GCTCT CGCTA
51  CCGGA TAATC CTTGG AGGGT TTCTA ATACA CTGCA CATTG GGCAG CATTT
101 ACTGC TTTAG TAACA TAAGT GTATA TGTC A TCTCT TACAT GAAAA TTATC
151 GGCTG TTCAG ACGTG AAATA TAAAG ACTCG TCTTG GATCT ATGTC CTGAC
201 ACTGC TGTTT CAATG TTTCT TTGGG TTCTT TGGTG GTATC CTGAA TCAGA
251 ACCTT GGCCC ACAA TCAGT GTCCT GCTGG GAGGT TGGTT GATGT GCCTG
301 GGCAT CCTGC TCTCC TATTT CACTG TCTTT AACTT CTATC TCTTC TTGAT
351 GACAT ATGGG ATCTT ATGCG GAATC GGGTG TGGCA TTGCT TATCC CATCC
401 CTTTA AGCGT TGCCG TTAAG AAACA TTATG ATTAT AAAGG CGTTA TCTCT
451 GGAAT CATCT TTATT GGCCG AGGGC TGTC A GTCTT TATTA TTTGC CCGCT
501 GCAGA ACTAT TACAT TAACA AATAC AACTA TATGC CGGAT TATAT GCCGG
551 AAATC GAGAA CTCGG ACGAG AAATA CTTCT CTAAT CTCGA CATCT TGAAT
601 AAAGT TCCAT ATTTA TTTAT CTATG AAGGT ATCTG CTTTG CGATC ATTCA
651 GTTTC TGGGT TCGTA CCTTA TTGCC GACTC TGGTG ACACG TCCAA AGATT
701 TCATG GCGTA TAACG ATCGT AACAA TAAAG TACTC TACTT CGAAG AGAAG
751 AACTT TATTA ACAA CCGAA CGGCC TGTCG AACTC ACTGC GTACG CTCAG
801 TAATA CCTCG AACTT CAGCT TCCGC GAAGT AAACA ATACG TTTAT TAATC
851 GCGAA TTTAT CTTAA TCTGG TTGAT GATCT TCTTT AATTG GCAGG CAATC
901 TCGTA CACGC AGGTA TTCTG GAAAA TCTTT GGTAT GAATT ACCTC TCCAT
951 TGATG ATCGC TCGCT GAGTC TGCTA GGCTC CGTGA GTTCA CTGTT TAATA
1001 TCTTT GGTCG TATCT TCTGG GGTCT GATTT CCGAT TTCAC CTCCT TAAAA
1051 ACTAC TCTGA TCTTA ATGTC CCTGC TTATG AGCTT CCTGA CCATT ACCTT
1101 GACCA TGTC A GGCTT CTACG GCATT ATTAC CTATA GTATT TGGGT GTGTT
1151 TAATC TTCTT CTGCC ACGCG GGCAC GTTCG CGATC TTCCC GAGCA TTACA
1201 GCGCA TACGT TTGGT ACCAA GAACT TTGGC CCTGT GTTTG GCCTG TTATT
1251 TACCG CCCGT GCGTT TAGCT CAATT ATTAA TGCAA TTATT AGCGC TGTGT
1301 TGCTT AATAA TATTG GTAAT ATTGC TATGT GTGCA ATTGT GAGCC TGAGC
1351 AGCTT TGTGA GCATT ATGCT GGCCC TGGCA TTTCT CGAGT AAGGA TCC

```

Abbildung 4.22: Optimierte DNA Sequenz von *pf75*

```

1  ACTAG TGAAT TCATG AATAT AATAC CATCG ACCGC TGTCC CGTAC ATAGT
51  CCTGT TTGGC GCGTT TCTTT ATAAT CTCAA CATAG GCATA ATTA A CTCT
101 ACGGG AACCT AAACA TTTAC CTCAC CTCCT ATCTC CGTTA CAAGG GCAAC
151 AATGT GACAT ACCGC GACGT TGCTT TCATT TACGA GCTCA CCATT ATCAC
201 TCTAG GAATC TTTAT GTTGG TCGGC AACAT TGTCC AAAAG CGCTT GGGAG
251 AACGC ATCAC CATCT TAGCA TGTTT ATTA A TGACA TTCTT GGCAT TCTAC
301 CTGTC GTCGG TCTAC GCGCA TTCTT ACATC CTTCT TTGCA TCTTT ATGGG
351 ATTCT TCTAT GCCGT TGGCT ATGGG ATCTG CTTTA CAATC CCACT TAGCT
401 GCGCA TACAA ACACT TAAA AACAA CCGTG GGTTT ATTTC TGGGA TCATC
451 ATTTC AGCCA TTAGC TTATC TCCCT TTCTC TATTG TCCGC TGCAA ACAAT
501 GCTCA TTAAT AAAAA TAATG TCAGC CCGGT ACAGA AGAAA ATTA A TAATT
551 CTACC GAATA TTAAT TTGAT GACAA GGACG TGCTG AATCG CGTAC CGAAC
601 GTATT ATTCT TACAG TCAAT TATCT TCCTT ATCTT TGCTA CGATG GCGCG
651 CTTTC TGGCA ACTAT GGAAG TTAAG ATGGA CAACG ACCCG GAGAT TAAAA
701 AACAG AAGAA GAATT TGTTG TCCGA AGAGA AAAAC AGTAA CACCA ATAAC
751 GTAGA CAAAA ACATC GTTGA CCTGG AGAAG AATGA AGAAG GCTAT GTGGC
801 CACGG AAAAA CATAA ATATA ATACT AACAC GGACA GCAAT AACAT CGATA
851 TCAAA AATGA TAATA GCCGT AGTGC CAAAT CGATG AAAAA GAAAA AGAAA
901 CGCAA ATTTG GTTTC GGTTC TATGA ATGAT GATAA AAATA ATAAC GATGA
951 TAATG ATTCG AAACA GAAAG GCAAT TCCTT GTTTG GCATG TTGAC CCTGG
1001 ATCGT ATCTT TACGG ATAAT TATAT TGGTA AATAC TATAA CAAAA AATGC
1051 ACCGA AGATA AATTC TTCTT TCTGC TGTGG ATCAG TGTG TGTTA TTAA
1101 CTGCT ATATT AACTT TGTTA TTATG TACTG GAAAA TTATC GGTAT TAACT
1151 ATACT CACGT GGAAG AAAAA CTGAT CACTC TGAAC GGCTC CTTTA TCAAC
1201 AGCTT ATCAA ACATT GCGGG TCGAA TCATT TGGGG CATT A TCTAC GATAA
1251 AATCA AAATC AACTA TACGA TCTTT CTGCT GGGTA TTTGT ATTAT CTCT
1301 GTTGC TTTAT TCTGC CTATT ATTAG TCACG TGTAC ATTTA TTATG CCTG
1351 GTGTG TGCGC TGTTT TACTT TTGCA TTGGT GGTTG CCTGG TGACC ATTCC
1401 TGTTA TTACG CTGAA AAAAT ATGGT GAAAC GCATT TCTCA CTGAA CATGA
1451 GCATC CTGTA TACGA GTCGG ATTGC GAACA CCTTT CTGTG TTCGA TTATT
1501 GTGTC CTCCT TCTAT AAAAT GCTGC AGCTG CGTTA TCTGA GCTAT GCGTT
1551 CGGTA TTATC AGTAG CGTGA GCACC CTGCT GATGT GCATT CTGAC CAAAC
1601 TCGAG TAAGG ATCC

```

Abbildung 4.23: Optimierte DNA Sequenz von *pf70*

4.3.3 Zellfreie Expression nach der Codonoptimierung

Zunächst wurden die optimierten Sequenzen *pfnt*, *pf70* und *pf75* aus den gelieferten Vektoren in die benötigten Vektoren, zu denen die beiden zellfreien Vektoren pIVEX2.3w und pIVEX2.3wGFP gehören, kloniert. Nach einer Maxipräparation der pIVEX2.3wGFP Konstrukte wurde eine zellfreie Expression im analytischen Ansatz durchgeführt.

Im Detergenzienscreen des PffNT-GFP war nach der Optimierung ein deutliches Signal auf Höhe des Fusionsproteins zu sehen. Hier waren sowohl In-Gel Fluoreszenz auf dem SDS Gel, als auch auf dem Westernblot mit dem GFP (FL) Antikörper detektierbar (Abbildung 4.24). Das Fusionsprotein besitzt eine berechnete Größe von

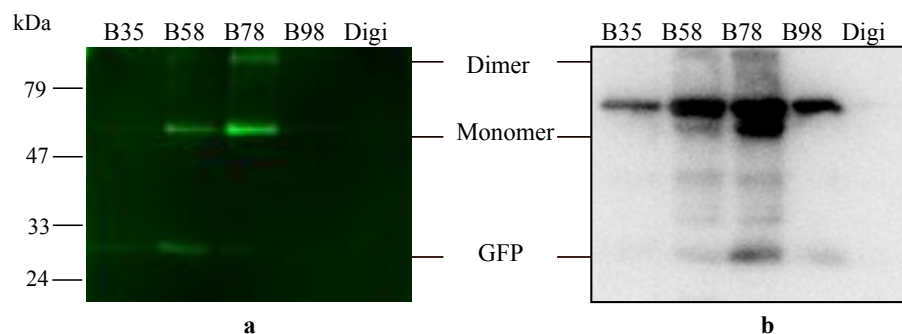


Abbildung 4.24: In-Gel Fluoreszenz und Westernblot vom Detergenzienscreen von zellfrei hergestelltem PffNT-GFP nach der Optimierung. (**a**) zeigt die In-Gel Fluoreszenz und (**b**) einen Westernblot mit dem GFP (FL) Antikörper. Zu sehen ist hier das GFP, das PffNT-GFP Monomer und das PffNT-GFP Dimer.

67kDa und das stärkste Fluoreszenzsignal war bei Brij78. Hier war zusätzlich eine Dimerbildung auf Höhe der 122 kDa Markerbande sichtbar. Zusätzlich waren noch Fluoreszenzsignale bei Brij58 und Brij35 zu sehen. Keine Fluoreszenz war bei Brij98 und Digitonin detektierbar.

Im Westernblot war bei Brij58 und Brij78 eine doppelte Bande auf Höhe der 67 kDa sichtbar, bei denen die untere Bande auf dem SDS Gel fluoreszierte. Einfache Banden waren bei Brij35 und Brij98 zu sehen, hier fehlte die untere Bande. Gar kein Signal gab es bei Digitonin.

Der Detergenzienscreen des Pf70-GFP Fusionsproteins in Abbildung 4.25 zeigte Signale, sowohl im SDS Gel als auch im Westernblot. Das Fusionsprotein besaß eine

4 Ergebnisse

berechnete Größe von 87 kDa und das Pf70 ohne das GFP eine Größe von 60 kDa. In Abbildung 4.25a,b ist das Fusionsprotein dargestellt. Hier war sowohl das reine GFP bei allen Detergenzien zu sehen, als auch das Fusionsprotein in Monomer- und in Dimerformierung bei Brij58. Bei den restlichen Detergenzien war das Pf70-GFP nicht detektierbar.

Das Pf70 ohne die GFP-Fusion in Abbildung 4.25c zeigte mit dem Penta-His Antikörper eine deutliche Monomerbande bei Brij58 und Brij78 .

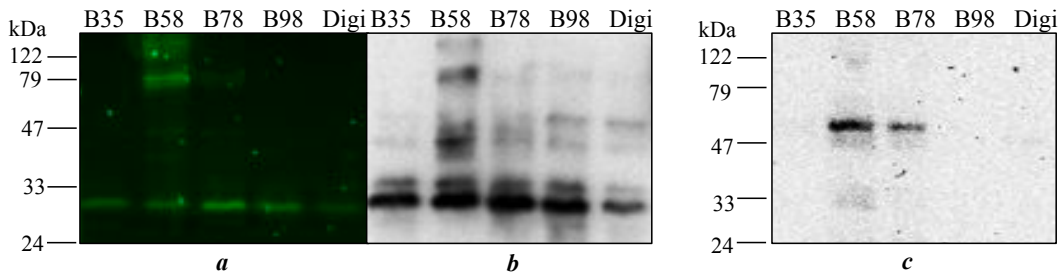


Abbildung 4.25: In-Gel Fluoreszenz und Westernblot vom Detergenzienscreen von zellfrei hergestelltem Pf70-GFP und Pf70 nach der Optimierung. Zunächst ist das Fusionsprotein Pf70-GFP durch (a) die In-Gel Fluoreszenz und (b) einen Westernblot mit dem GFP (FL) Antikörper gezeigt. (c) zeigt zusätzlich noch Pf70 ohne das fusionierte GFP mit dem Penta-His Antikörper.

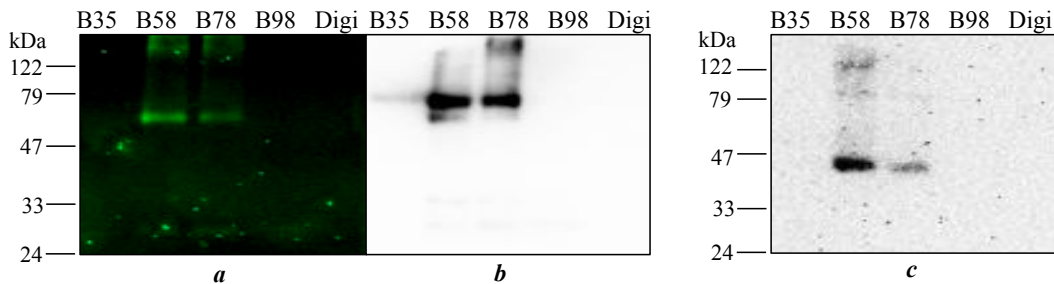


Abbildung 4.26: In-Gel Fluoreszenz und Westernblot vom Detergenzienscreen von zellfrei hergestelltem Pf75-GFP und Pf75 nach der Optimierung. Zunächst ist das Fusionsprotein Pf75-GFP durch (a) die In-Gel Fluoreszenz und (b) einen Westernblot mit dem GFP (FL) Antikörper gezeigt. (c) zeigte zusätzlich noch Pf75 ohne das fusionierte GFP mit dem Penta-His Antikörper.

In Abbildung 4.26 ist ein Detergenzienscreen von Pf75-GFP und Pf75 zu sehen. In Abbildung 4.26a,b waren bei Brij58 und Brij78 deutliche Monomer- und Dimersi-

gnale sichtbar, sowohl als In-Gel Fluoreszenz, als auch im Westernblot. Auch hier war wieder im Westernblot eine Doppelbande zu sehen. Im SDS Gel fluoreszierte hierbei nur die untere. Bei Brij98 und Digitonin waren keine Signale detektierbar. Das Fusionsprotein Pf75-GFP besaß eine berechnete Größe von 78 kDa und das Pf75 ohne das GFP eine Größe von 51 kDa.

In Abbildung 4.26c, die das Pf75 ohne das GFP zeigt, war ebenfalls bei Brij58 und Brij78 eine deutliche Bande sichtbar, nicht aber bei den restlichen Detergenzien Brij35, Brij98 und Digitonin.

4.4 Kristallisation von PffNT

Für die Kristallisationsansätze wurde das PffNT zellfrei hergestellt und mit Nickel-NTA *Beads* gereinigt. Anschließend wurde es auf eine Proteinkonzentration zwischen 8 und 9 mg/ml in einem Endvolumen von 190 μ l gebracht. Das verwendete Protein ist in Abbildung 4.27 dargestellt.

Insgesamt wurden 192 Puffer getestet und nach der Skala, wie zuvor in Abschnitt

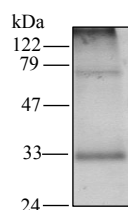


Abbildung 4.27: Das für die Kristallisationsansätze verwendete PffNT. Das SDS-Gel ist Coomassie gefärbt.

Tabelle 4.2: Prozentuale Anteile je Bewertung nach Begutachtung aller Kristallisationsansätze. Die Bewertung 1 wird nicht dargestellt, da diese nur etwas über die nicht vom Protein stammenden Verunreinigungen aussagt.

Bewertung	0	2	3	4	5	6	7	8	9
Anteil (%)	2 %	8 %	49 %	23 %	1 %	8 %	3 %	3 %	2 %

3.5 beschrieben, charakterisiert. Die Bewertung fand mehrmals im Zeitraum von Tag

4 Ergebnisse

1 bis Tag 21 statt. Dabei kam heraus, dass das Protein mit dem Kristallisationspuffer in 49 % aller Puffer präzipitiert und in 23 % aller Fälle gelatinös präzipitiert. Nur 16 % zeigten doppelbrechende kristalline Strukturen in Form von Sphärolithen bzw. Mikrokristallen (8 %), Nadeln (3 %), Plättchen (3 %) oder Kristallen (2 %), wie in Tabelle 4.2 zu erkennen ist.

Insgesamt zeigten sich bei vier Pufferbedingungen eindeutige doppelbrechende Kristalle, die bereits nach sieben Tagen klar erkennbar waren:

2,39: pH 6,0;	0,05 M Zink Acetat;	0,1 M Cacodylat;	6,6 % (w/v) PEG 8000; 6 % (v/v) Ethylenglycol
1-34: pH 6,0;	0,1 M Calcium Acetat;	0,1 M MES;	22 % (w/v) PEG 8000
2,30: pH 6,1;	0,05 M Zink Acetat;	0,05 M MES;	11 % (w/v) PEG 8000
1-27: pH 6,0;	0,01 M Zink Acetat;	0,1 M MES;	1,5 M Ammoniumsulfat

Die aus den vier Puffern entstandenen Kristalle (Abbildung 4.28) waren bis zu 0,5 mm groß und zeigten unterschiedliche Strukturen. Der Kristall aus Puffer 2,39

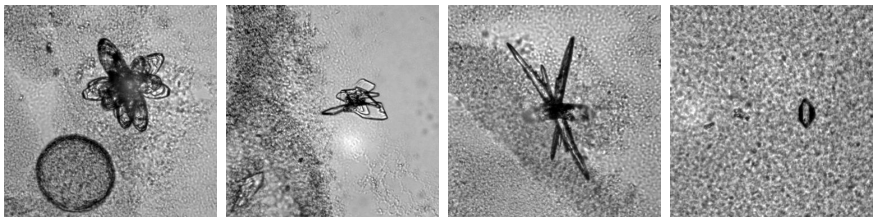


Abbildung 4.28: Die ersten erfolgreiche dreidimensionale Kristalle aus den Puffern 2,39, 1-34, 2,30 und 1-27. Die Kantenlänge der Bilder beträgt 0,5 mm.

hatte eine blumenförmige Struktur, der Kristall aus Puffer 1-34 war ein Plättchenstapel, aus dem dritten Puffer 2,30 bildete sich ein sternförmiger Kristall und der vierte Puffer 1-27 zeigte einen kleinen länglichen Kristall. Alle Kristalle besaßen eine eindeutig dreidimensionale Struktur.

Im nächsten Schritt folgte die Reproduktion der erfolgreichen Puffer mit demselben Protein. Hier wurde in vierfacher Ausführung jeder der vier Puffer mit dem Protein zusammen gegeben und auch hier ergaben sich nach 7 Tagen eindeutige Kristalle (Abbildung 4.29). Einzig der Puffer 1-27 erzeugte keinen dreidimensionalen Kristall.

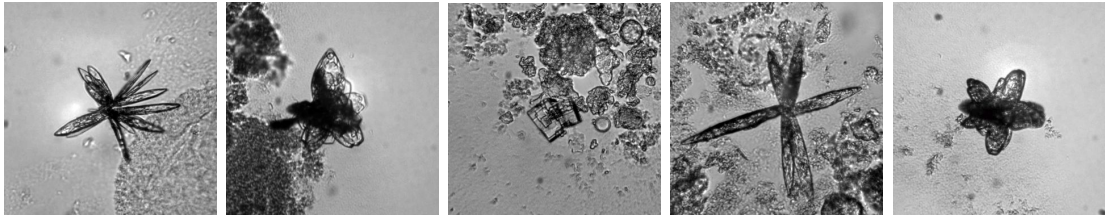


Abbildung 4.29: Reproduktion der erfolgreichen Kristallisationsbedingungen. Gezeigt sind Kristalle mit den Puffern 2,39, 1-34 und 2,30. 1-27 ließ sich nicht reproduzieren. Diese Kristalle wurden mittels Röntgenstrukturanalyse vermessen. SB1 = Puffer 2,30, SB2 = Puffer 2,39, SB3 = Puffer 1-34, SB4 = Puffer 2,30 und SB5 = Puffer 2,39. Die Kantenlänge der Bilder beträgt 0,5 mm.

Die fünf Kristalle aus Abbildung 4.29 wurden von A. Scheidig in Nylonschlingen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg vermessen. Hier ergab sich, dass alle Kristalle Salzkristalle waren.

4.5 Proteoliposomen

Die Proteoliposomen für die SURFE²R Messungen wurden nach dem Protokoll vom Forschungsaufenthalt in Grenoble, Frankreich am IBS (Institut de Biologie Structurale - Jean-Pierre Ebel) in der *Groupe Transporteurs Membranaires* von Prof. Dr. Eva Pebay-Peyroula durchgeführt (Abschnitt 3.8.1). In diesem wurde das Detergens Triton X-100 mithilfe von *Biobeads* entfernt. Hierdurch gab es keine Probleme mit der Reproduzierbarkeit der Messungen.

Die Proteoliposomen für die *Stopped flow* Messungen (Abschnitt 3.6.1) zeigten keine verlässlichen Werte, da es hier wichtig war dichte Liposomen zu erhalten, die keine „Löcher“ in der Membran enthalten. Daraufhin wurden verschiedene Protokolle versucht. Am prägnantesten unterschieden sich diese Protokolle in ihrer Methode, das Detergens unter die spezifische *Critical Micelle Concentration* (CMC) zu verdünnen. Dies wurde anfangs mithilfe von *Biobeads* durchgeführt. Hierbei wurde das Gemisch aus Lipiden, Proteinen und Detergens über Nacht mit den *Biobeads* inkubiert. Diese adsorbierten das Detergens mithilfe ihrer porösen Struktur.

Ein anderes Verfahren nutzte den Verdünnungseffekt der Detergenzien aus. Sobald

die Konzentration unter deren CMC gebracht wurde, konnten diese keine Mizellen mehr bilden und die Detergenzmoleküle lagen frei in der Lösung vor. Dies fand durch Injektion des Gemischs in einen Puffer mit dem 25fachen oder 40fachen Volumen der Probe statt.

Die dritte Methode nutzte einen langsameren Pufferaustausch als die Verdünnungsmethode über eine Pufferaustauschsäule. Hierbei wurde das Protein in der Säule in den neuen Puffer ohne Detergens überführt.

Bei diesen drei Methoden konnten allerdings nur erfolgreiche Messungen mit der Verdünnungsmethode erhalten werden, die sich aber schlecht reproduzieren ließen. Die Methode mit der Pufferaustauschsäule ergab bei *Stopped flow* Messungen mit leeren Liposomen höhere τ -Werte und Amplituden (0,068 s; 0,1 V), als bei der Verdünnung (0,028 s; 0,04 V).

Neben der Verdünnung des Detergens wurden auch die in Abbildung 4.30 dargestellten Parameter variiert. Beim Hydratisieren der Lipide sollte darauf geachtet werden,

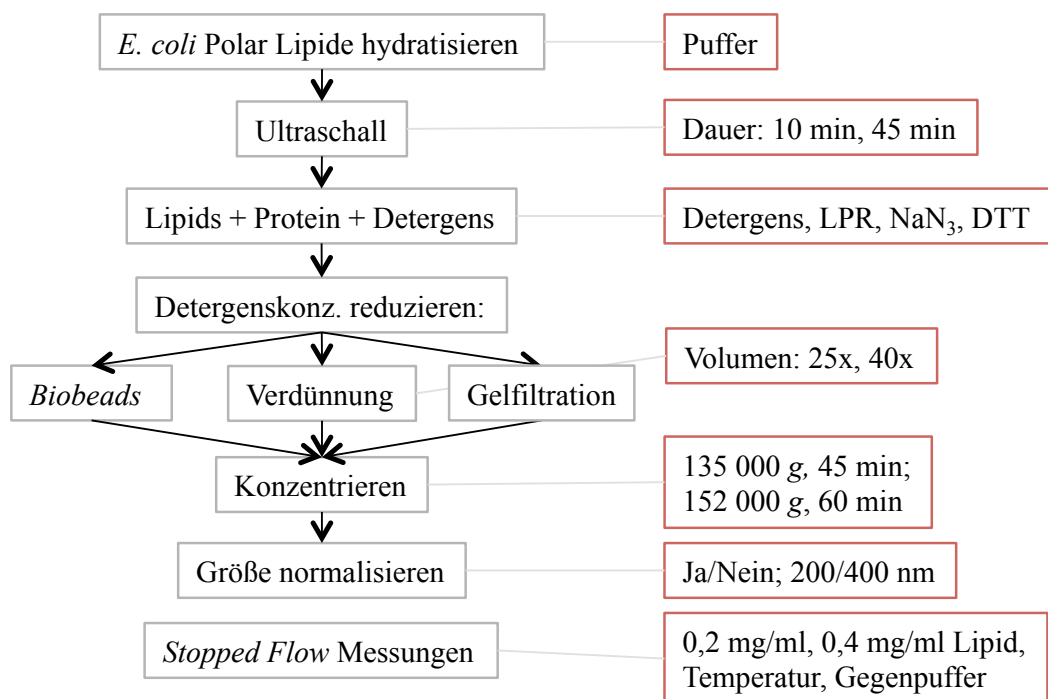


Abbildung 4.30: Ablauf einer Rekonstitution mit ihren Variablen (in rot dargestellt).

dass der MOPS Puffer erst nach dem Hydratisieren hinzugefügt wird. Bei längeren Ultraschallbehandlungen von 45 min der Lipide wurde keine Veränderung in der Liposomenqualität gegenüber einer 10 min Beschallung festgestellt.

Ein weiterer kritischer Parameter war die Detergenzwahl. Nicht alle Detergenzien eigneten sich für die Rekonstitution, wie bei den Saccharosegradienten von AQP11 zu sehen war (Abbildung 4.33). Bei der Verwendung von β -Octylglycosid fand keine Rekonstitution des Proteins in die Liposomen statt. Triton X-100 und Fos-Choline-10 zeigten eine Rekonstitution. Die restlichen variierten Parameter beeinflussten das *Stopped flow* Ergebnis nur minimal. Es war also nicht notwendig Natriumazid und DTT in den Rekonstitutionspuffer zu geben und die Größe der Proteoliposomen mit einem Extruder zu normalisieren.

Für die Messung konnten entweder 0,2 mg/ml oder 0,4 mg/ml Lipid eingesetzt werden. Hier war nur in der Amplitude ein Unterschied zu bemerken, die bei 0,4 mg/ml Lipid doppelt so groß war, als bei 0,2 mg/ml Lipid. Jedoch war die Signalauflösung bei 0,2 mg/ml Lipid noch ausreichend gegeben, so dass die *Stopped flow* Messungen mit 0,2 mg/ml durchgeführt werden konnten.

4.5.1 Saccharosegradient

Der Saccharosegradient wurde verwendet, um die Rekonstitutionseffizienz zu beurteilen (Abschnitt 3.6.2). Hierbei zeigten sich oft direkt nach der Zentrifugation bereits in zwei Fraktionen milchige Ringe. Der eine befand sich bei 20 % Saccharose, der andere oberhalb hiervon. Auf dem Westernblot und im Fluorimeter waren in diesem Fall bei 20 % Saccharose das stärkste Signal der GFP-Fusionsproteine nachweisbar (Abbildung 4.31). Es handelte sich hierbei also um separierte Fraktionen von Proteoliposomen und leeren Liposomen, die eine unterschiedliche Dichte besaßen. Der Proteinnachweis der einzelnen Fraktionen konnte zu Beginn nicht sofort erfolgen. Die direkte Auftragung der 400 μ l Fraktionen brachte keine Signale auf dem Westernblot. Allerdings auch nicht, wenn der Proteoliposomansatz ohne Auftrennung im Dichtegradienten als Positivkontrolle direkt aufgetragen wurde. Deshalb wurde im nächsten Versuch den Fraktionen 2,5 % DDM zugesetzt, um die Liposomen zu destabilisieren, da der Antikörper evtl. nicht an das Epitop am rekonstituierten Protein binden konnte. Dadurch war zumindest das Protein aus dem direkten Proteoliposomansatz detektierbar, nicht aber das in den einzelnen Fraktionen. Daraufhin wurde jede Fraktion erneut in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Danach war sowohl GFP Fluoreszenz ausmachbar, als auch Signale im Westernblot sichtbar, wie in Abbildung 4.32a und b gezeigt. Allerdings ließen sich hier im Vergleich zu der Fällung der Proteine mit 5 % TCA weniger Banden detektieren. Bei der Fällung mit TCA

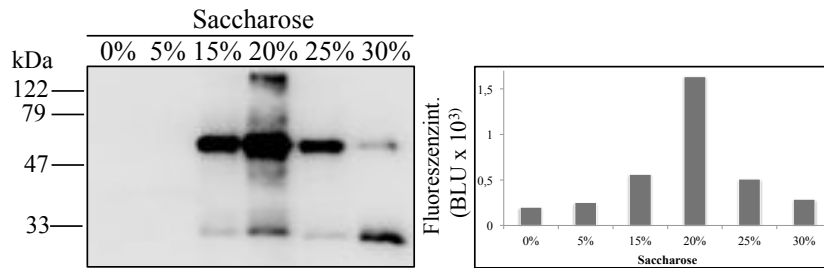


Abbildung 4.31: Saccharosegradient von EcFocA-GFP Proteoliposomen. Links wurden die Proteine in den Fraktionen mit 5% Trichloressigsäure gefällt. Rechts wurden die Fraktionen mit dem Fluorimeter bei einer Anregungswellenlänge von 475 nm und einer Emissionswellenlänge von 509 nm vermessen. Die Westernblots wurden mit dem GFP (FL) Antikörper detektiert.

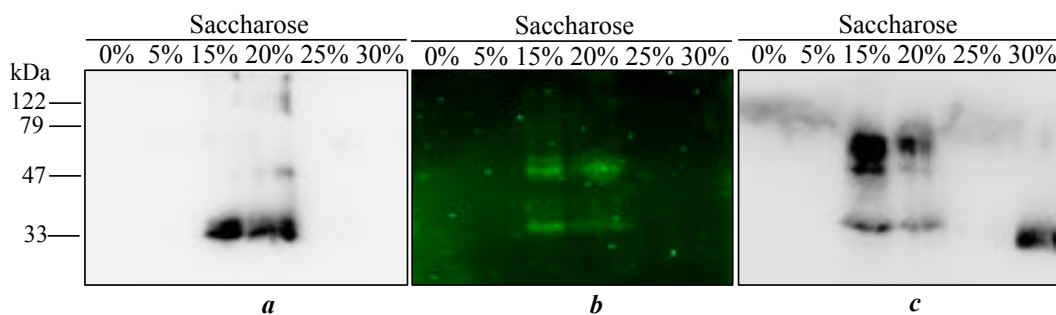


Abbildung 4.32: Verschiedene Aufarbeitungsmöglichkeiten der Saccharosegradientenfractionen bei EcFocA-GFP. Der Westernblot (**a**) zeigt die Fraktionen nach einer erneuten Zentrifugation, die (**b**) In-Gel-Fluoreszenz bleibt weiterhin sichtbar. Beim Fällen der Proteine der Fraktionen mit 5% Trichloressigsäure (**c**) sind die Banden besser erkennbar. Die Westernblots wurden mit dem GFP (FL) Antikörper detektiert.

war aber keine In-Gel Fluoreszenz mehr sichtbar.

Große Unterschiede waren bei der Verwendung von den drei Rekonstitutions-Detergenzien Triton X-100, Fos-Choline-10 und β -Octylglycosid im Saccharosegradienten sichtbar. Abbildung 4.33 zeigt AQP11 rekonstituiert, das zellfrei hergestellt wurde.

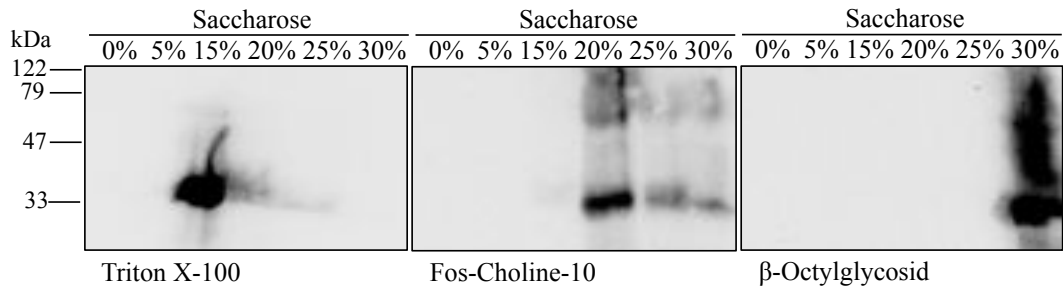


Abbildung 4.33: Saccharosegradient von hAQP11 rekonstituiert mit verschiedenen Detergenzien. Verwendet wurden Triton X-100, Fos-Choline-10 und β -Octylglycosid. Die Westernblots wurden mit dem Anti-HA Antikörper detektiert.

Wenn AQP11 mit Triton X-100 rekonstituiert wurde, zeigte sich die Proteoliposomenbande bei 15 % Saccharose. Bei Fos-Choline-10 war sie bei 20 % Saccharose und mit β -Octylglycosid befand sich alles Protein nicht rekonstituiert in der Bodenfraktion bei 30 % Saccharose.

4.6 Dynamische Lichtstreuungsmessung mit der *Stopped flow* Apparatur

Für die *Stopped flow* Messungen (Abschnitt 3.7) wurde zellfrei hergestelltes Aquaporin 11 verwendet. Das Lipid-zu-Protein Verhältnis (LPR) der Proteoliposomen betrug 45 und es wurden 0,2 mg/ml Lipid vermessen. In Abbildung 4.34 wurde ein hypertoner Saccharosegradient gebildet, indem 200 mM Saccharose in den Gegenpuffer gegeben wurde. Dadurch kam es zu einem Wassereinstrom in die Liposomen und Proteoliposomen.

Die Messungen ergaben für die Negativkontrolle, die Liposomen ohne Protein ($\tau = 0,195$ s), einen etwa siebenfach langsameren Wassereinstrom, als bei den Proteoliposomen mit AQP11 ($\tau = 0,028$ s). Messungen mit Harnstoff und Glycerol brachten

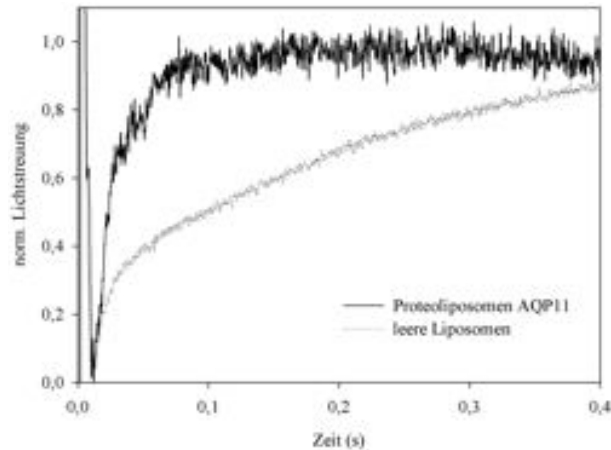


Abbildung 4.34: *Stopped flow* Wasserleitfähigkeitsmessungen von AQP11 in Proteoliposomen. Die Messungen fanden mit einem 100 mosm Saccharosegradienten in 50 mM MOPS, pH 7,5 und 150 mM NMG Puffer statt. Es sind jeweils 9 Kurven gemittelt.

keine Schwellung.

Insgesamt wurde die Messung an zwei verschiedenen Tagen mit der jeweils gleichen Proteoliposomenpräparation durchgeführt.

4.7 SURFE²R Messungen

Durch SURFE²R Messungen können Ionenleitfähigkeiten über eine künstliche Membran dokumentiert werden. Hierzu wurden Proteoliposomen hergestellt, die auf einen mehrfach beschichteten Sensor gebracht wurden. Anschließend wurden die Sensoren mit verschiedenen Puffern gespült, die das zu untersuchende Ion enthalten und hiermit einen chemischen Gradienten aufbauten. Die Ladungsverschiebung wurde über den Sensor ermittelt.

Diese Technik wurde bisher nicht in der Arbeitsgruppe verwendet.

4.7.1 Etablierung des SURFE²R Systems mit Gramicidin

Bei Messungen mit dem SURFE²R System wurde der Sensor zuerst beschichtet (Abschnitt 3.8.3). Hierfür konnte SensorPrep A und SensorPrep B sowohl kommerziell

von der Firma Iongate bezogen, als auch selbst hergestellt werden. Zwischen beiden Varianten war kein Unterschied auszumachen, weshalb die Sensoren mit den selbsthergestellten Lösungen beschichtet wurden.

Ein weiterer Schritt war die Zentrifugation der Sensoren. Zu Beginn wurde dieser Schritt nicht durchgeführt, doch mit der 45 min Zentrifugation bei 2 500 g kam es zu deutlich zuverlässigeren und vergleichbareren Ergebnissen.

Bei einer SURFE²R Messung wurde, wie in Abbildung 4.35 zu sehen ist, der Sensor

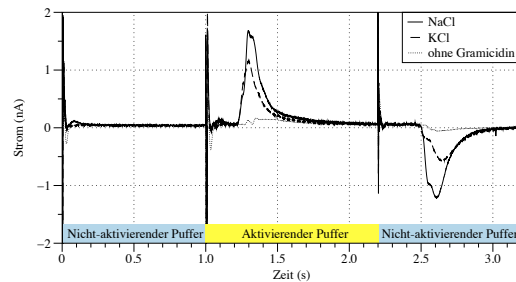


Abbildung 4.35: Typische Kurven einer SURFE²R Messung mit Gramimidin. Eine Messung beginnt mit dem nicht-aktivierenden Puffer, der dann in den aktivierenden Puffer umgespült wird. Am Ende wird der Sensor wieder im nicht-aktivierenden Puffer inkubiert.

zuerst mit einem nicht-aktivierenden Puffer gespült. Der nicht-aktivierende Puffer entsprach meistens der Pufferzusammensetzung, die sich im Inneren der Proteoliposomen oder Liposomen befand. Hierbei kam es zu keinem Signal, weil sich die Ionenkonzentration im Liposomeninneren nicht änderte. Danach wurde der Puffer, der die Liposomen und Proteoliposomen umspült schnell zum aktivierenden Puffer gewechselt. Dabei kam es zunächst zu einem starken, sehr kurzem Signal, das sich durch ein senkrechtes Artefakt bemerkbar machte. Der aktivierende Puffer hatte die gleichen osmotischen Eigenschaften wie der nicht-aktivierende Puffer, doch waren hier Ionen vorhanden, die den Ionenkanal passieren könnten und es entstand somit ein chemischer Gradient.

Der aktivierende Puffer hatte den nicht-aktivierenden Puffer nach ca. 0,1 s verdrängt, dann kam es zu dem proteinspezifischen Signal. Je nachdem, ob sich die Ladung in den Proteoliposomen ins Negative oder ins Positive veränderte, wurde ein Signal mit negativen oder positiven Vorzeichen erhalten. Ein negatives Signal wurde detektiert, wenn sich entweder Kationen aus den Proteoliposomen hinausbewegten oder Anionen in die Proteoliposomen hineinströmten. Genau umgekehrt verhielt es sich für ein positives Signal. Entweder wurde hier die Anionenkonzentration in den

Proteoliposomen reduziert oder es kam zu einem Einstrom an Kationen. In Abbildung 4.35 war hier der Einstrom der Kationen Na^+ und K^+ zu beobachten, die sich statt dem NMG im aktivierenden Puffer befanden. Das Signal erreichte nach ca. 0,5s wieder die Basislinie, wenn sich im Inneren und Äußeren der Proteoliposomen ein Konzentrationsgleichgewicht an Ionen ausgebildet hatte. Die Proteoliposomen waren also nun mit den Ionen aus dem aktivierenden Puffer gefüllt. Wenn die Puffer nun wieder zurück zum nicht-aktivierenden Puffer gewechselt wurden, kam es wieder zu dem kurzen starken Signalartefakt. Danach zeigte sich ein meist ebenso starker Peak, aber in entgegengesetzte Richtung als beim aktivierenden Puffer, weil sich die zuvor eingeströmten Ionen wieder aus den Proteoliposomen entfernten. Am Ende der Sequenz waren die Proteoliposomen mit dem nicht-aktivierenden Puffer gefüllt und es waren keine Ionen aus dem aktivierenden Puffer mehr vorhanden.

Die Gramacidinmessungen (Abbildung 4.36) wurden zur Etablierung des Systems verwendet, wie sie schon bei Schulz *et al* [79] im SURFE²R beschrieben sind (Abschnitt 3.8.2).

Hierzu wurden die Proteoliposomen mit 50 mM HEPES(Tris), pH 7,0 und 10 mM NMG Cl gefüllt. Das NMG konnte durch seine Größe nicht durch die Gramacidin-poren gelangen. Nun wurden die Sensoren mit den Proteoliposomen mit einem aktivierenden Puffer gespült, der statt den 10 mM NMG Cl entweder 10 mM NaCl, KCl oder LiCl enthielt. Da Gramacidin-poren durchlässig für Kationen sind, konnten nun Li^+ , Na^+ und K^+ in die Liposomen hineingelangen und die Ladung verschob sich ins Positive. Hierbei ergab sich nun das Bild, dass Li^+ ($5,6 \text{ nA} \pm 0,5 \text{ nA}$) den höchsten Peak zeigte, dann Na^+ ($4,3 \text{ nA} \pm 0,5 \text{ nA}$) und das geringsten Signal bei K^+ ($3,3 \text{ nA} \pm 0,3 \text{ nA}$) zu detektieren war. Die Liposomen ohne Gramacidin-poren als Negativkontrolle zeigten keine Signale bei den verschiedenen Kationen.

Die Reihenfolge der Permeabilitäten stimmte aber nicht mit den Literaturdaten überein [87, 79], weswegen weitere Versuche durchgeführt wurden. Abbildung 4.37 zeigt Gramacidin Liposomen, die mit 50 mM HEPES (Tris), pH 7,0 und 10 mM NaCl befüllt wurden. Beim aktivierenden Puffer wurde hier das NaCl durch 10 mM NMG Cl, KCl oder LiCl ersetzt.

Wenn nun der Puffer mit NMG über die Liposomen gespült wurde, konnte nur das Na^+ durch die Gramacidin-poren hinaus gelangen. Somit veränderte sich die innere Ladung der Proteoliposomen ins Negative ($-8,17 \text{ nA} \pm 0,94 \text{ nA}$). Bei einem aktivierenden Puffer mit KCl konnten sowohl die Na^+ aus den Liposomen als auch die K^+ Ionen in die Liposomen hinein durch die Gramacidin-poren gelangen. Da die

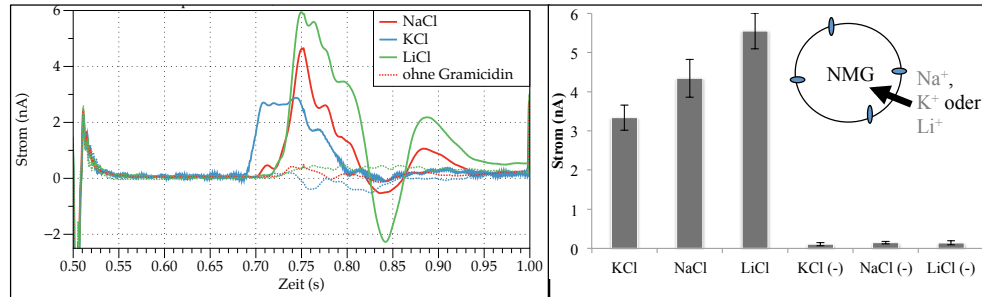


Abbildung 4.36: SURFE²R Messungen mit Gramicidin. Alle Messungen fanden in 50 mM HEPES (Tris) pH 7,0 statt. Der nicht-aktivierende Puffer bestand aus 10 mM NMG. Bei den aktivierenden Puffern wurde das NMG Cl durch NaCl, LiCl oder KCl ersetzt. Links sind Beispielkurven der Messung gezeigt, rechts die gemittelte Peakhöhe angegeben mit Standardabweichung.

Permeabilität der Na⁺ Ionen höher ist als der der K⁺ Ionen, wurde auch hier die Gesamtladung in den Proteoliposomen negativ ($-0,64 \text{ nA} \pm 0,13 \text{ nA}$), wenn auch nur um die Differenz zwischen den Na⁺ und K⁺ Permeabilitäten. Ähnliches galt auch für den aktivierenden Puffer mit LiCl. Hier entstand allerdings eine positive Ladung ($0,70 \text{ nA} \pm 0,06 \text{ nA}$), da die einströmenden Li⁺ Ionen eine höhere Permeabilität als die ausströmenden Na⁺ Ionen besaßen. Es wurde also das gleiche Permeabilitätsergebnis, wie zuvor in Abbildung 4.36 gezeigt, erhalten.

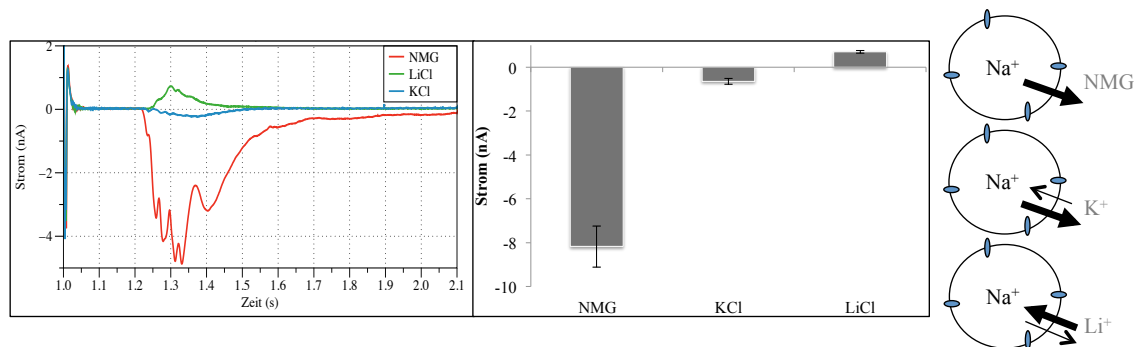


Abbildung 4.37: SURFE²R Messungen mit Gramicidin. Alle Messungen fanden in 50 mM HEPES (Tris) pH 7,0 statt. Die Proteoliposomen waren mit 10 mM NaCl gefüllt. Bei den aktivierenden Puffern war dieses durch NMG, LiCl oder KCl ersetzt. Links sind Beispielkurven der Messung gezeigt, rechts die gemittelte Peakhöhe angegeben mit Standardabweichung.

4.7.2 Influenza M2 Protonenkanal Messungen

Der Influenza M2 Protonenkanal wurde bereits in der Anwendung mit dem SURFE²R beschrieben [88] und diente als weitere Überprüfung des Systems. Hierfür wurde das M2-GFP ebenfalls zellfrei hergestellt.

Wie der Name schon sagt, ist der Kanal durchlässig für Protonen. Der Protonen-

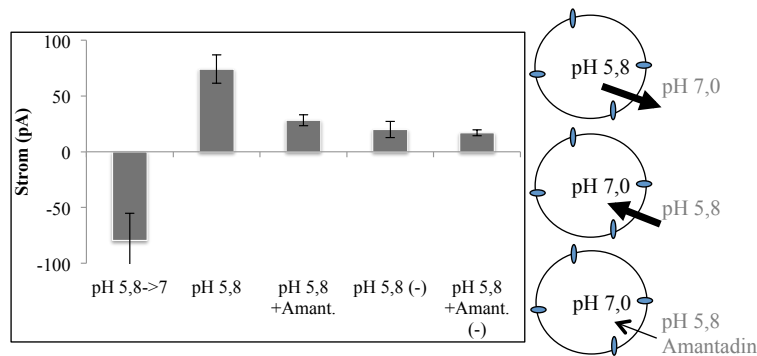


Abbildung 4.38: SURFE²R Messungen mit dem M2-GFP Protonenkanal. Als nicht-aktivierender Puffer wurde 30 mM MOPS (KOH), 140 mM KCl, 4 mM MgCl₂ bei pH 7,0 verwendet. Der aktivierende Puffer 30 mM MES (KOH), 140 mM KCl, 4 mM MgCl₂ bei pH 5,8 baut einen Protonengradienten auf. Bei Inhibitionsmessungen wurde sowohl dem nicht-aktivierenden als auch dem aktivierenden Puffer 100 μ M Amantadin zugesetzt. (-) stellt die Negativkontrollen dar, bei der die Sensoren mit Liposomen ohne Protein beschichtet sind.

gradient wurde in diesem Versuch durch einen pH-Sprung von entweder pH 7,0 nach pH 5,8 oder umgekehrt von pH 5,8 nach pH 7,0 durchgeführt. Was jeweils einen H⁺ Gradient von 1,48 μ M entsprach. Zusätzlich ließ sich dieser Kanal mit Amantadin inhibieren.

Der nicht-aktivierende Puffer setzte sich aus 30 mM MOPS (KOH), 140 mM KCl und 4 mM MgCl₂ bei pH 7,0 zusammen und der aktivierende aus 30 mM MES (KOH), 140 mM KCl und 4 mM MgCl₂ bei pH 5,8. Bei den Inhibitionsmessungen wurden sowohl dem nicht-aktivierenden als auch dem aktivierenden Puffer 100 μ M Amantadin zugesetzt.

Bei einem auswärtsgerichteten Protonenstrom, durch einen pH-Sprung von pH 5,8 zu pH 7,0 hervorgerufen, wanderten die Protonen aus den Proteoliposomen hinaus und verschoben dadurch die Ladung in den Proteoliposomen ins Negative (-80 pA

± 24 pA), wie in Abbildung 4.38 zu sehen ist. Ein umgekehrter pH-Sprung brachte ein gegensätzliches Signal. Hier veränderte sich durch den Protoneneinstrom der Peak um den nahezu gleichen Betrag, nur mit einem positiven Vorzeichen (74 pA ± 13 pA).

Sobald die Proteoliposomen (Abschnitt 3.8.1) durch das Amantadin inhibiert wurden, verringerte sich das Signal um ca. 62 % auf 28 pA ± 5 pA.

Influenza M2 Protonenkanal mit Amphipolen zellfrei hergestellt

Des Weiteren wurde das M2-GFP genutzt, um die Verwendung des Amphipols PMAL C8 (Poly(Maleinanhydrid-alt-1-Decen) substituiert mit 3-(Dimethylamino) Propylamin) in der zellfreien Proteinsynthese zu testen. Amphipole sind amphipatische Polymere, die wie Detergenzien Membranproteine in wässriger Umgebung in Lösung halten, allerdings sind sie im Gegensatz zu diesen unabhängig von der CMC und können somit in geringeren Konzentrationen eingesetzt werden [89].

Die zellfreie Herstellung und die Rekonstitution des M2-GFP mit dem Amphipol wurde von E. Mak durchgeführt. Die Saccharosegradienten wurden in gemeinsamer Arbeit erstellt.

Der M2-GFP Protonenkanal wurde entweder in dem zuvor als vorteilhaft erwie-

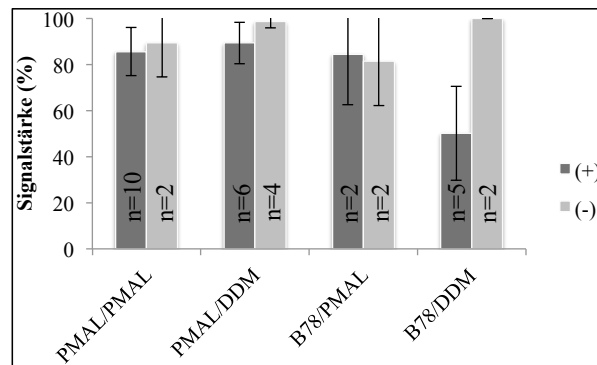


Abbildung 4.39: Inhibitionsmessungen des mit Amphipol hergestellten M2-GFP Protonenkanals. Zu sehen sind jeweils Messungen mit dem Inhibitor Amantadin (+) und Inhibitionsmessungen ohne das Protein M2-GFP (-). Als 100 % wurden das Signal ohne die Zugabe von Amantadin gesetzt. Insgesamt wurden die vier Kombinationsmöglichkeiten PMAL/PMAL, PMAL/DDM, B78/PMAL und B78/DDM vermessen. Angegeben ist die Standardabweichung.

senem Detergens Brij78 (0,8 %) hergestellt oder mit dem Amphipol PMAL C8 (0,01 %). Die Reinigung mit Nickel-NTA *Beads* fand danach entweder mit PMAL C8 (0,01 %) oder dem Detergens DDM (0,05 %) statt. Es entstanden also Proteoliposomen mit den folgenden vier Kombinationsmöglichkeiten:

- Zellfrei: PMAL C8; Reinigung: PMAL C8 (PMAL/PMAL)
- Zellfrei: PMAL C8; Reinigung: DDM (PMAL/DDM)
- Zellfrei: Brij78; Reinigung: PMAL C8 (B78/PMAL)
- Zellfrei: Brij78; Reinigung: DDM (B78/DDM)

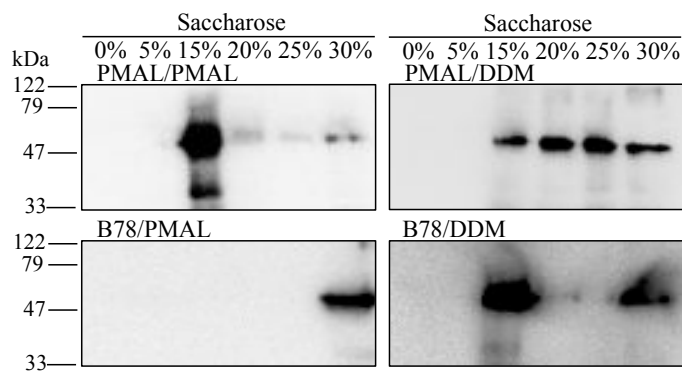


Abbildung 4.40: Saccharosegradienten, der für die SURFE²R Messungen verwendete Proteoliposomen. Die Westernblots sind mit dem GFP (FL) Antikörper detektiert. Die vier Kombinationen PMAL/PMAL, PMAL/DDM, B78/PMAL und B78/DDM sind gezeigt. Die Saccharosegradienten sind in Zusammenarbeit mit E. Mak entstanden

Diese vier verschieden hergestellten Proteoliposomen wurden mit dem SURFE²R vermessen. Hierzu wurden die gleichen Parameter verwendet, die schon zuvor für den M2-GFP Protonenkanal verwendet wurden.

In Abbildung 4.39 wurden alle Sensoren mit M2-GFP Proteoliposomen zuerst mit dem pH-Sprung vermessen, dann unter den Inhibitionsbedingungen. Die Differenz wurde in Prozent angegeben.

Es zeigte sich, dass alleine das B78/DDM um 50 % mit Amantadin inhibierbar war. Sobald in der Herstellung oder der Reinigung des Proteins PMAL C8 beteiligt war, war keine eindeutige Inhibition mehr messbar.

Vergleichend können hier in Abbildung 4.40 die Saccharose Gradienten betrachtet werden. Zu sehen war hier, dass bei PMAL/PMAL nahezu alles Protein in der

15 % Fraktion zu finden war. Es schien alles Protein rekonstituiert zu sein. Bei PMAL/DDM befand sich Protein in der 15 %, 20 %, 25 % und 30 % Fraktion. Die B78/PMAL Proteoliposomen zeigten kein rekonstituiertes Protein. Es gab hier nur ein Signal bei 30 % Saccharose. Beim Saccharosegradienten von B78/DDM war Protein bei 15 % und bei 30 % Saccharose zu beobachten. Es lag in gleichen Teilen rekonstituiert und nicht rekonstituiert vor.

4.7.3 Aquaporin 6

Das humane Aquaporin 6 wurde zunächst zellfrei hergestellt, allerdings ohne die GFP-Faltungskontrolle. Die Rekonstitution und die Messungen wurden bei einem Aufenthalt in Grenoble, Frankreich am IBS (Institut de Biologie Structurale - Jean-Pierre Ebel) in der *Groupe Transporteurs Membranaires* von Prof. Dr. Eva Pebay-Peyroula durchgeführt (Abschnitt 3.8.1).

Das AQP6 lässt sich durch einen pH-Sprung aktivieren, so dass es permeabel für Anionen wird [41]. Die mit dem SURFE²R gemessenen Kurven sind in Abbildung 4.41 gezeigt. Hierfür wurden als nicht-aktivierender Puffer 30 mM HEPES und 150 mM Kalium-Gluconat bei pH 7,2 gewählt. Der aktivierenden Puffer enthielt neben dem pH-Sprung auf pH 5,2 auch 10 mM Cl⁻ Ionen (30 mM MES, 140 mM Kalium-Gluconat, 10 mM KCl, pH 5,2). Zusätzlich wurde ein Puffer ohne permeable Anionen gewählt (30 mM MES, 150 mM Kalium-Gluconat, pH 5,2). Hiermit sollte der alleinige Effekt des pH-Sprungs auf die Proteoliposomen überprüft werden. Alle Puffer wurden auch für Liposomen ohne rekonstituiertes hAQP6 als Negativkontrolle verwendet. Hierbei zeigte sich, dass die Peaks der Proteoliposomen mit pH-Sprung und Cl⁻ Ionen ($0,85 \text{ nA} \pm 0,27 \text{ nA}$) kleiner waren als die mit dem alleinigen pH-Sprung ($1,45 \text{ nA} \pm 0,15 \text{ nA}$). Auch bei den Negativkontrollen war hier eine gewisse Differenz zwischen dem pH-Sprung mit Cl⁻ Ionen und dem pH-Sprung zu detektieren ($0,13 \text{ nA} \pm 0,04 \text{ nA}$ gegenüber $0,22 \text{ nA} \pm 0,05 \text{ nA}$). Doch hier war das Signal deutlich geringer als bei den Proteoliposomen.

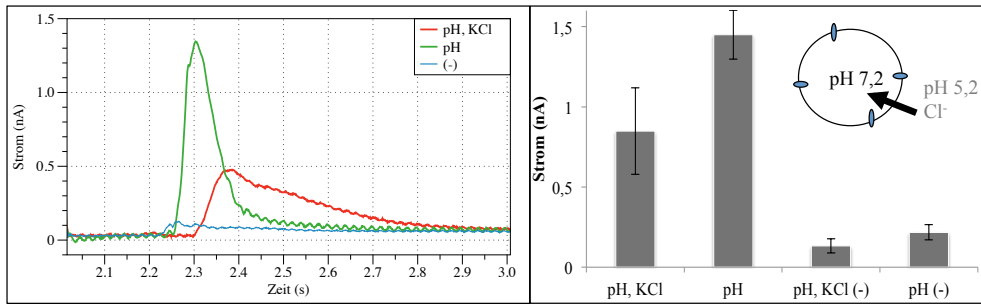


Abbildung 4.41: SURFE²R Messungen mit dem hAQP6. Als nicht-aktivierender Puffer wurde 30 mM HEPES, 150 mM Kalium-Gluconat, (pH 7,2) verwendet. Der aktivierende Puffer induzierte entweder einen pH Sprung auf pH 5,2 mit 30 mM MES, 150 mM Kalium Gluconat oder einen pH-Sprung auf pH 5,2 zusammen mit einem Chlorideinstrom mit 10 mM KCl in einem 30 mM MES und 140 mM Kalium Gluconat Puffer. (-) stellt die Negativkontrollen dar, bei der die Sensoren mit Liposomen ohne Protein beschichtet sind. (n=2)

4.8 Proteinherstellung und Funktionstestung in *Dictyostelium discoideum*

Zur AQP11 Expression wurden neben dem zellfreien System auch *Dictyostelium discoideum* Amöben verwendet, da sich das *E. coli*- und das Hefesystem hierfür nicht eigneten.

4.8.1 Klonierung der *D. discoideum* Konstrukte

Als Vorbereitung für die Transformation mussten zunächst die Konstrukte erstellt werden. Die Konstrukte hAQP11-pIVEX2.3wGFP, hAQP1-HA426 und PfaQP-pDRTXa wurden mit den in Tabelle 4.3 beschriebenen Enzymen verdaut, um die Gen kodierende DNA zu isolieren. Gleichzeitig wurde auch der Empfängervektor pDXA-GFP2 mit den in Tabelle 4.3 beschriebenen Enzymen verdaut. Die linearisierte Vektor-DNA pDXA-GFP2 wurde anschließend so mit der Gen kodierenden DNA *haqp1*, *haqp11* oder *pfaqp* ligiert, dass an dem resultierenden Fusionsprotein das GFP N-Terminal von den Aquaporinen liegt. Für die Ligation von dem *pfaqp*

und dem Vektor wurde zusätzlich noch ein Linker, bestehend aus zwei Oligonukleotiden (Tabelle 2.4) benötigt, um die Schnittstellen *NsiI* und *EcoRI* zu verbinden. Danach wurden die erhaltenen Konstrukte in *E. coli* DH5 α Zellen transformiert. Ein anschließender Kontrollverdau und Sequenzierung der Konstrukte bestätigte den Erfolg der Klonierung.

Tabelle 4.3: Verwendete Enzymschnittstellen der Spenderkonstrukte und dem Empfängervektor.

Konstrukt	Schnittstellen für	Insert für
		pDXA-GFP2
hAQP11-pIVEX2.3wGFP	<i>Bam</i> HI, <i>Xho</i> I	<i>Bam</i> HI, <i>Xho</i> I
hAQP1-HA426	<i>Bam</i> HI, <i>Xho</i> I	<i>Bam</i> HI, <i>Xho</i> I
PfAQP-pDRTXa	<i>Nsi</i> I, <i>Xho</i> I	<i>Eco</i> RI, <i>Xho</i> I

4.8.2 Transformation von *D. discoideum*

Die *D. discoideum* Amöben wurden aus einer Schüttelkultur gewonnen und mit den Parametern, wie in Abschnitt 3.10.3 beschrieben, elektroporiert. Hierbei wurden Zeitkonstanten τ von ca. 1 ms erhalten [90]. 24 Stunden nach der Elektroporation wurde zur Selektion G418 hinzugegeben und die Zellen weiterhin beobachtet. Die erste GFP-Fluoreszenz zeigte sich nach 6 bis 7 Tagen, vorher waren nur vereinzelt Zellen in der Petrischale zu sehen. Insgesamt war die Proliferation der Zellen nach der Transformation deutlich langsamer. In der 100 ml Schüttelkultur vermehrten sich die Amöben von $2 \cdot 10^7$ Zellen auf $1 \cdot 10^8$ Zellen in 48 Stunden, wohingegen die Wildtypzellen diese Zellzahl nach 24 Stunden erreichten (Abschnitt 3.9). Das bedeutete, dass die transformierten Zellen eine Generationszeit t_g von 30 Stunden und eine spezifische Teilungssrate ν von $0,02 \text{ h}^{-1}$ besaßen und die Wildtypzellen sich in 10 Stunden verdoppelten und ein ν von $0,07 \text{ h}^{-1}$ hatten.

4.8.3 Western-Blotting und Fluoreszenzmikroskopie der in *D. discoideum* hergestellten Proteine

Der Transformationserfolg der hAQP1, hAQP11 und GFP Proteine wurde durch Western-Blotting, In-Gel Fluoreszenz und Fluoreszenzmikroskopie überprüft.

Die Proben wurden, wie zuvor in Abschnitt 3.10.4 beschrieben, mit einer 23 Gau-

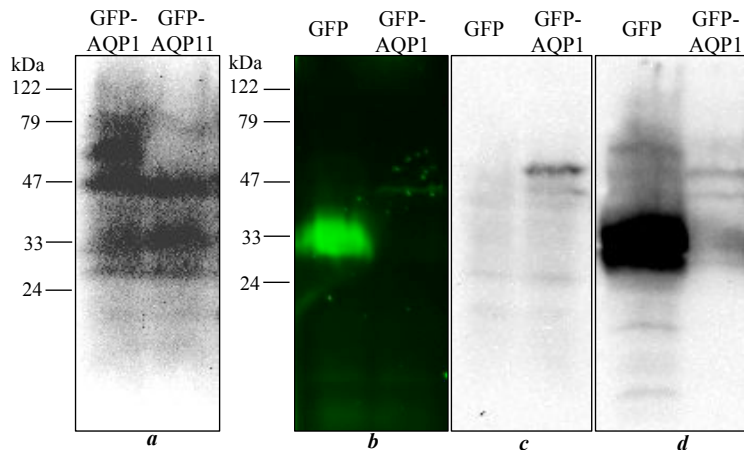


Abbildung 4.42: Westernblot und In-Gel Fluoreszenz von *D. discoideum* Gesamtproteinen GFP-hAQP1, GFP-hAQP11 und GFP. (a) zeigt einen Westernblot von GFP-hAQP1 und GFP-hAQP11 detektiert mit dem GFP (FL) Antikörper. Das SDS Gel in (b) zeigt die In-Gel Fluoreszenz von GFP-hAQP1 und GFP. Die beiden weiteren Westernblots zeigen ebenfalls GFP-hAQP1 und GFP, wobei (c) mit dem APQ1 (C-20) Antikörper nachgewiesen ist und (d) mit dem GFP (FL) Antikörper.

ge Kanüle aufgeschlossen, dann mittels SDS PAGE aufgetrennt und anschließend wurden die überexprimierten Proteine mittels Immundetektion nachgewiesen. Die resultierenden Westernblots und In-Gel Fluoreszenzbilder sind in Abbildung 4.42 dargestellt.

Im Westernblot 4.42a wurden die Fusionsproteine GFP-hAQP1 und GFP-hAQP11 mit etwa gleicher Intensität gezeigt. Beide Fusionsproteine liefen aber ca. 10 kDa niedriger, auf Höhe der 47 kDa Markerbande. Neben dem GFP-hAQP1 Fusionsprotein bei 47 kDa war zusätzlich noch eine zweite, höher laufende Bande bei etwa 57 kDa zu sehen, die wahrscheinlich das glykosylierte GFP-hAQP1 zeigte. Mit dem 8×His Tag und dem GFP besaß das hAQP1 eine berechnete Größe von 57 kDa und

das hAQP11 eine Größe von 58 kDa.

Das GFP-hAQP1 zeigte neben den Signalen mit dem GFP (FL) Antikörper auch In-Gel Fluoreszenz (b) und konnte mit dem (C-20) (c) Antikörper detektiert werden. Das GFP mit dem GFP (FL) Antikörper (d) und durch In-Gel Fluoreszenz (b) auf Höhe der 33 kDa Markerband detektiert werden.

Mit diesen beiden *Batches* wurden auch die Wasserleitfähigkeitsmessungen und die Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

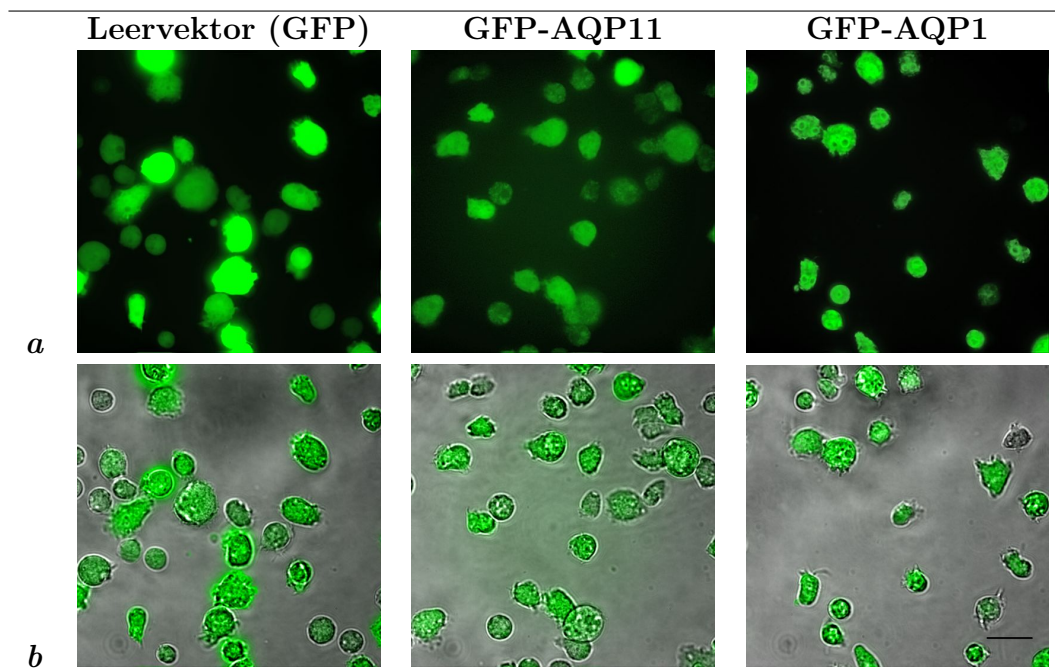


Abbildung 4.43: Fluoreszenzmikroskopie von *D. discoideum* mit hAQP11, hAQP1 und dem pDXA-GFP2 Leervektor. (a) Zeigt die Zellen bei einer Anregung von 472 nm und (b) zeigt das überlagerte Bild von den angeregten Zellen und den Durchlichtbildern. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm

Mit der Fluoreszenzmikroskopie war es zusätzlich möglich die Expression der GFP Fusionsproteine in den lebenden Zellen zu überprüfen. Hierfür wurden die GFP-hAQP11, GFP-hAQP1 und GFP exprimierenden Zellen bei einer Wellenlänge von 472 nm angeregt und die Emission bei 520 nm mit dem 100 \times Objektiv detektiert (Abschnitt 3.10.6). Auf den Fluoreszenzbildern in Abbildung 4.43 sind die Fluoreszenzintensitäten zu sehen. Alle Fusionsproteine wurden in den *D. discoideum* hergestellt.

4.8.4 Stopped Flow Messungen mit *D. discoideum*

Um die Wasserleitfähigkeiten von GFP-hAQP1 und GFP-hAQP11 in *D. discoideum* Amöben zu testen, wurde mit der *Stopped Flow* Apparatur ein hypertoner Saccharosegradient von 300 mosm aufgebaut, wodurch es zu einem Wasserausstrom aus den Zellen kam und somit zum Schrumpfen der Zellen (Abschnitt 3.10.5).

Die Messungen fanden in HL5 Medium ohne Glukose statt. Dem Gegenpuffer waren als Osmolyten 600 mM Saccharose zugesetzt. Die resultierenden Lichtstreuungskurven sind in Abbildung 4.44 gezeigt. Die Kurven ließen sich zum einen so interpre-

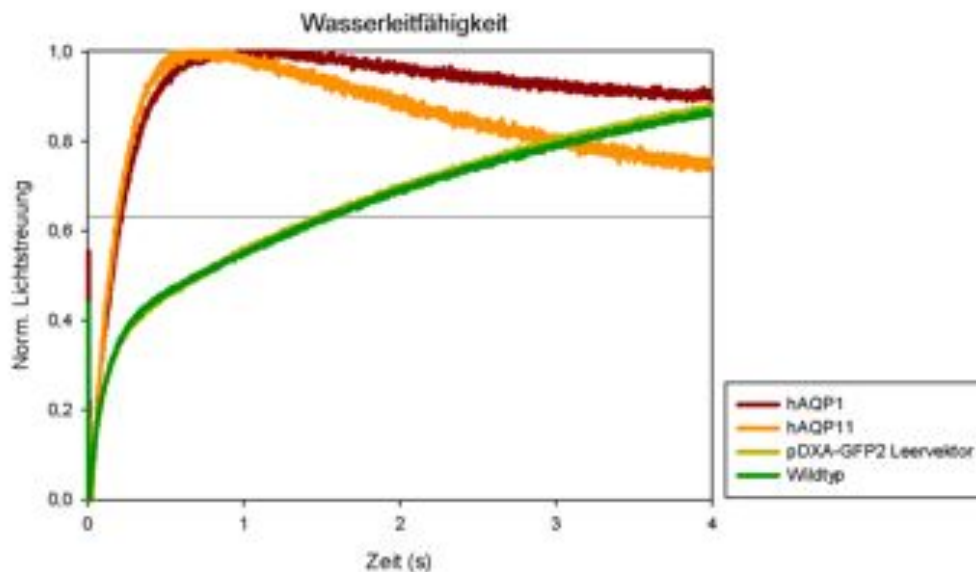


Abbildung 4.44: *Stopped Flow* Messungen von *D. discoideum* mit hAQP11, hAQP1, dem pDXA-GFP2 Leervektor und Wildtypzellen. Der osmotische Gradient beträgt 300 mosm mit Saccharose als Osmolyten. Eingezeichnet sind zusätzlich 63,2%, die τ entsprechen. (n=1)

tieren, dass die Wasserleitfähigkeiten von *D. discoideum* mit der Expression von GFP-hAQP1 ($\tau = 0,2 s$) und GFP-hAQP11 ($\tau = 0,2 s$) zwischen sieben- und achtfach schneller war, als bei den Negativkontrollen. Als eine Kontrolle wurden Wildtyp Amöben ohne Transformation ($\tau = 1,6 s$) verwendet und als weitere Kontrolle, um Effekte des Transformationprozesses oder der GFP-Expression ausschließen zu können, wurde die Amöben mit dem pDXA-GFP2 Leervektor transformiert und ebenfalls unter den gleichen Bedingungen vermessen ($\tau = 1,5 s$).

Wenn die Kurven allerdings als zweiphasig angesehen werden, dann besaßen die

4.8 Proteinherstellung und Funktionstestung in *Dictyostelium discoideum*

beiden Negativkontrollen ein τ von etwa 0,1 s und sind somit nicht auswertbar.

5 | Diskussion

5.1 Zellfreie Proteinsynthese

Die zellfreie Proteinsynthese ermöglicht es, Proteine, die sich oft zuvor nur schwer oder gar nicht herstellen ließen, innerhalb von kurzer Zeit in großen Mengen zu produzieren.

Eine wichtige Komponente in dem System war der *E. coli* basierte S30 Extrakt, der die Transkriptions- sowie Translationsfaktoren wie Aminoacyl-tRNA, Initiationsfaktoren und Faktoren für die Elongation, Termination und weitere Bestandteile wie z. B. den Ribosomen und die Acetatkinase beinhaltet [3].

Zunächst musste die Biomasse produziert werden. Hierfür wurden die *Batch*-Fermentationen mit den BL21 *E. coli* Zellen durchgeführt. Zunächst wurde nach 6,5 Stunden eine OD₆₀₀ von 18,2 erreicht. Zu diesem Zeitpunkt war vermutlich alle Glukose verbraucht, da es ansonsten möglich ist, diesen Stamm bei Hoch-Zelldichte-Kultivierung auf eine OD₆₀₀ von über 51 zu bringen [91]. Leider war es nicht möglich, die Glukosekonzentration über die Zeit zu betrachten, da entsprechende Sensoren fehlten. Da aber keine maximale Biomasse benötigt wurde, sondern Zellen aus der exponentiellen Phase bei einer OD₆₀₀ um 4, konnte bestätigt werden, dass der verwendete *E. coli* Stamm sich wie benötigt verhielt. In der Literatur [80] sind Verdopplungszeiten t_d von 0,35 h und maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten μ_{max} von 2 h^{-1} beschrieben, an die sich die gemessenen Werte annähern.

Die Extrakte hatten zu Beginn (Versuche 1-4) eine deutlich geringere Effizienz als der laborinterne Standard, ab dem 5. Extrakt kam es zu einer deutlichen Steigerung der Effizienz. Vermutlich wurde mit der Zeit das Inokulum besser vorbereitet, weil sich auch die *lag*-Phasenzeiten reduzierten.

Insgesamt ließ sich aus den vorhandenen Werten ableiten, dass ein Extrakt mit

einer hohen Effizienz zu erwarten ist, wenn eine maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ_{max} von über $1,44 \text{ h}^{-1}$ erreicht wird. Dies gilt es in Zukunft aber noch genauer zu beobachten.

Die T7-RNA-Polymerase wurde ebenfalls selbst hergestellt. Zum einen um einen erheblichen Kostenpunkt einzusparen, zum anderen, weil die kommerziell erhältliche T7-RNA-Polymerase nicht in den benötigten hohen Konzentrationen zu erwerben war [3]. Die erhaltene T7-RNA-Polymerase aus 21 *E. coli* Flüssigkultur besitzt ca. $1 \cdot 10^6$ Units im Wert von ca. 40 000 €.

Zu Beginn wurden die Proteine ohne die GFP-Fusion synthetisiert, doch konnte hier bei der Optimierung nur auf die maximale Proteinausbeute optimiert werden. Es fehlte eine Faltungskontrolle. Daraufhin wurden die zu untersuchenden Proteine C-Terminal mit dem GFP fusioniert. Dies wurde bereits zuvor für die Membranprotein Expression in *E. coli* Zellen [67, 68, 69], Sf9 Insektenzellen [70], *S. cerevisiae* [71] und für die *in vitro* Translation [67] durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit, in Zusammenarbeit mit A. Müller-Lucks, B. Wu und E. Beitz wurde diese Faltungskontrolle für die schnelle Optimierung von Membranproteinen im zellfreien System weiterentwickelt [92].

Nach der ersten zellfreien Expression des Fusionsproteins war sowohl In-Gel Fluoreszenz erkennbar als auch eine Westernblot Bande. Allerdings lief die Westernblot Bande 10 kDa höher als die In-Gel Fluoreszenzbande. Der Grund hierfür war der zuvor verwendeten monoklonalen Anti-GFP Antikörper, der nur eine der zwei Banden erkennen konnte. Nach dem Wechsel zu einem polyklonalen GFP (FL) Antikörper waren beide Banden sichtbar. Anscheinend hatten die beiden Banden unterschiedliche Faltungsformen, so dass der monoklonale Antikörper nur das wahrscheinlich falsch gefaltete Protein, der obere Bande entsprechend, erkennen konnte. Da die unteren Bande fluoreszierte, konnte darauf geschlossen werden, dass es sich hierbei um das richtig gefaltete Fusionsprotein handelte. Die Theorie besagt, dass falsch gefaltetes Fusionsprotein nicht fluoresziert [82]. Durch die N-Terminale Position des Proteins zum GFP wird es somit zuerst translatiert. So kann es sein, dass es sich entweder in den Ribosomen verkantet und es kommt somit zum Abbruch, oder die richtige Faltung des GFPs wird durch die Falschfaltung verhindert und die Ausbildung des GFP Fluorophors [93] wird somit blockiert. Andererseits ist es auch möglich, dass die hydrophoben Abschnitte des Polypeptids, die sich im gefalteten Zustand normalerweise im Proteininneren befinden [64], direkt nach Verlassen des

Ribosoms präzipitieren und dem GFP keine Zeit gelassen wird seine Tertiärstruktur bzw. die Zyklisierungsreaktion der Chromophors, die bis zu 1,5 Stunden [93] dauern kann, auszubilden [67].

Um zu bestätigen, dass hier zwei Faltungsformen vorliegen -richtig und falsch gefaltet- wurden zusätzlich von A. Müller-Lucks CD Spektren aufgenommen [94]. Hierfür bot sich das Aquaporin aus dem Malariaerreger *P. falciparum* PfAQP an, das bei der zellfreien Herstellung als GFP-Fusionsprotein im Detergens Brij78 zu etwa 98 % die untere und fluoreszierende Bande zeigte und beim Detergens Brij35 zu etwa 90 % die obere Bande. Hierzu wurde das Protein ohne den Fusionspartner mit den beiden Detergenzien solubilisiert und anschließend vermessen.

Bei den CD (Zirkular Dichroismus) Spektren wurden zwei Kurven erhalten, die sich besonders im Bereich zwischen 210 und 220 nm unterschieden. Bei dem PfAQP, das in Brij78 hergestellt war, waren doppelte Minima erkennbar, was für einen hohen α -helikalen Anteil spricht. Dies stimmt auch mit der Kristallstruktur des Proteins überein, welches einen α -Helix Anteil von 74 % besitzt [92, 95]. Bei dem mit Brij35 solubilisierten Protein war dagegen nur ein einziges Minimum erkennbar, was auf einen höheren β -Faltblattanteil schließen ließ, der nur durch Falschfaltung entstanden sein konnte.

Weitere Schmelztemperaturmessungen, die ebenfalls von A. Müller-Lucks durchgeführt wurden, unterstützten diese Daten. Hier wurden die gleichen Proben, die zuvor für die CD-Spektren verwendet wurden, einem kontinuierlichen Temperaturanstieg unterworfen. Hierbei zeigte das in Brij78 hergestellte Protein einen Schmelzpunkt bei 53 °C, was in etwa dem bereits beschriebenen Schmelzpunkt von dem nicht glycosylierten humanen Aquaporin 10 entsprach (55 °C) [96]. Im Gegensatz dazu zeigte das in Brij35 solubilisierte Protein eine Schmelztemperatur von 80 °C. Dies ist ein für Proteine ungewöhnlich hoher Schmelzpunkt und lässt auf ein bereits zuvor falsch-gefaltetes Protein schließen, das bereits denaturiert ist und hier agglomert.

Zusätzlich wurden mit dem in Brij78 hergestellten PfAQP noch erfolgreiche Funktionstestungen im *Stopped Flow* Apparat von A. Müller-Lucks durchgeführt [92, 94]. Die falsch und richtig gefalteten Fusionsproteine liefen in unterschiedlicher Höhe beim SDS-PAGE, obwohl es sich um eine denaturierende Auftrennung handelte. Die Membranproteine wurden hierfür bei 37 °C über 30 Minuten deutlich schonender mit dem SDS-haltigen Ladepuffer behandelt als lösliche Proteine, die über 5 Minuten 95 °C ausgesetzt sind. Dadurch wurden die Proteine vermutlich nicht vollständig denaturiert. Die falsch gefalteten Proteine sind durch die fehlerhaften intermolekularen Bindungen nicht so dicht gepackt wie die richtig gefalteten Proteine, die sich

hierdurch in einem Energieminimum befinden. So muss bei den falsch gefalteten Proteinen deutlich weniger Energie angewendet werden, wodurch sie einfacher zu denaturieren sind. [62]

Die GFP-Fusionsproteine eignen sich demnach als Faltungskontrolle, wobei das richtig gefaltete Fusions-Protein fluoresziert und auf dem SDS-Gel niedriger läuft als das falschgefaltete, nicht fluoreszierende Fusions-Protein.

Des Weiteren korrelierte die In-Gel Fluoreszenz mit direkten Fluoreszenzmessungen am Fluorimeter des Reaktionsansatzes. Dadurch ist es möglich, die Expressionsansätze während der Proteinsynthese direkt fluorimetrisch zu überwachen und somit frühstmöglich auf die Faltungsform schließen zu können. Eine Anwendung wäre hier das Hochdurchsatz*screening*.

Mithilfe dieser Faltungskontrolle ließ sich die Herstellung von acht verschiedene Proteine überprüfen. Da für die zellfreie Herstellung von Membranproteinen Detergenzien zur Solubilisierung nötig sind, wurde bei einem initialen Detergenzienscreen das beste Detergens für das jeweilige Protein empirisch anhand der Fluoreszenzintensität ermittelt.

Die verwendeten Detergenzien wurden von C. Klammt *et al.* [76] als besonders erfolgreich für Proteine mit α -Helikaler und β -Fass Struktur ermittelt, die bei porenbildenden Proteinen vorkommen. Auch in dieser Publikation sind Brij58 und Brij78 die erfolgreichsten Detergenzien, wie bei den hier getesteten Proteinen.

Die zellfrei hergestellten Proteine stammen aus unterschiedlichen Organismen und sind in diesen verschieden lokalisiert. Das AQP11 ist ein intrazelluläres Membranprotein, das im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist [33] und sechs Transmembranspannen hat. Der Ratten Harnstoff-Transporter rUT-B besitzt zehn Transmembranspannen mit einem Glykosylierungsmotiv [97]. Das PfAQP ist wie das rUT-B ein bereits kristallisiertes Protein [98]. Der Influenza M2 Protonenkanal ist ein gut charakterisierter Protonenkanal aus der Virushülle [54]. Das PfFNT und das EcFocA wurde außerdem hergestellt, beides Vertreter der Formiat-Nitrit-Transporter Familie, von denen das EcFocA bereits gut beschrieben und kristallisiert ist [48, 53]. Das PfFNT wurde für weitere Funktionstestungen benötigt. Des Weiteren wurden die beiden putativen Monocarboxylattransporter Pf70 und Pf75 aus *P. falciparum* hergestellt, die wahrscheinlich zwölf Transmembranspannen besitzen [22].

Bei allen getesteten Proteinen konnte eine Fluoreszenzbande detektiert werden, allerdings variierte die Intensität stark. Die Fusionsproteine ließen sich also in unterschiedlichen Mengen herstellen. Nicht alle wurden gleich effizient hergestellt, was

zum einen an unterschiedlich verwendeten S30 Extrakten liegen kann, zum anderen aber auch vermutlich an der Transkriptionsgeschwindigkeit, bedingt durch Ausbildung von Sekundärstrukturen der mRNA [20].

Da das AQP11 für die zellfreie Funktionstestung verwendet werden sollte, war es wichtig die Produktion durch die zugegebenen Detergenzien zu optimieren. Denn bisher wurde hauptsächlich nicht-fluoreszierendes und somit wahrscheinlich falsch gefaltetes Protein produziert. Durch die vermehrte Zugabe von dem Detergens Brij78 konnte das Verhältnis nun zur unteren, richtig gefalteten Bande verschoben werden. Ein weiterer Effekt der vermehrten Zugabe war die Zunahme der Viskosität, wodurch ebenfalls eine verbesserte Faltung hatte stattfinden können.

Zuvor konnte bereits von L. Isaksson *et al.* (2012) [36] AQP11 zellfrei, beim Testen von vielen Proteinen, hergestellt werden. Die Ausbeuten waren mit der Zugabe von Brij58 als Detergens aber recht gering.

Das Detergens DDM eignete sich nicht für die Proteinreinigung mit den Nickel-NTA *Beads*. Nur die Detergenzien der Fos-Choline Gruppe brachten hier einen Erfolg. Schon von K. Yakata *et al.* (2007) [29] wurde diese Erkenntnis beschrieben. Auch die Solubilisierung des AQP11 aus den Sf9 Insektenzellen war am erfolgreichsten mit 1% Fos-Choline 10 oder Digitonin. Allerdings ließ sich hier auch AQP11 mit β -Octylglykosid solubilisieren, was bei dem zellfrei hergestellten Protein nicht gelang.

Insgesamt betrachtet ließen sich alle Proteine, die im präparativen Ansatz hergestellt wurden, in Mengen von über 2 mg/ml Ansatz herstellen, was auch aktuellen Publikationen entspricht [99]. Durch das energieregenerierende System und die kontinuierliche Versorgung von z. B. Aminosäuren über die Dialysemembran wurden die Proteine über 20 Stunden hergestellt, wodurch es zu den großen Ausbeuten kam.

5.2 Mutagenese des internen GFP-Startcodons

Im zellfreien System wurde mit dem pIVEX2.3w-GFP Vektor immer eine zusätzliche GFP Bande im SDS-Gel erhalten. Nun galt es herauszufinden, ob es an den beiden Startcodons zu Beginn der GFP Sequenz liegt. Hierzu wurden diese beiden Methionine mit einer Mutagenese-PCR zu einem Valin und einem Asparagin mutiert. Beim

Vergleich des pIVEX2.3w-GFP-rUT-B Konstruktes vor und nach der Mutagenese mittels zellfreier Expression, fiel auf, dass die GFP Bande zwar deutlich reduziert, aber nicht verschwunden war. Im Fall des Konstruktes lag der T7 Promotor ca. 1 300 bp oberhalb der *gfp* Sequenz und ca. 60 bp oberhalb des offenen Leserahmens vom *rut-b* Gen.

Normalerweise befindet sich in prokaryotischen Zellen die Promotorsequenz 35 bp bis 10 bp oberhalb des offenen Leserahmens. Es gibt aber bei *E. coli* auch Transkriptionsstarts, die bei über -200 bp lokalisiert sind [100, 101]. Bei eukaryotischen Systemen ist es sogar möglich, regulatorische Sequenzen bei über -10 000 bp vorzufinden, allerdings sind sie in der Regel bei -500 bp [100]. Des Weiteren war bereits bekannt, dass die T7-RNA-Polymerase mehrere Gene hintereinander transkribieren kann [102].

Folglich ist es also möglich, dass alle Startmethionine von der T7-RNA-Polymerase erkannt wurden. Doch nicht die gesamte *gfp* Expression schien durch die Start-tripletts hervorgerufen zu sein, denn auch bei dem mutierten Konstrukt war eine schwache Bande zu erkennen. Das führte zu der Annahme, dass das GFP Protein, das nur mit einem kurzen Linker von 42 bp C-Terminal mit dem zu untersuchenden Protein verbunden war, von diesem abbrechen konnte. Da nach der zellfreien Herstellung das Fusionsprotein über den poly-Histag gereinigt wurde, der sich C-Terminal vom GFP befand, wurde nur das GFP und das Fusionsprotein erhalten. Mit dem mutierten pIVEX2.3w-GFP war es nun möglich, Fusionsproteine mit einem deutlich geringeren GFP Anteil herzustellen. Dadurch blieben nun mehr Ressourcen während der zellfreien Synthese, wie Aminosäuren und Nukleotide, für die Fusionsproteinherstellung und werden nicht für die zusätzlich GFP Herstellung benötigt.

5.3 Codonoptimierung von DNA Sequenzen

Zu Beginn war es nicht möglich, das PfFNT, das Pf70 und das Pf75 in *S. cerevisiae*, *E. coli* und im zellfreien System herzustellen.

Deshalb wurden die A+T Gehälter der Genome verglichen: *Plasmodium falciparum* besitzt den höchsten bekannten A+T Gehalt von 80,6 % [84], *Escherichia coli* hingegen nur 50 % [85] und *Saccharomyces cerevisiae* hat einen A+T Gehalt von 62 % [86]. Der A+T Gehalt unterscheidet sich bei *E. coli* und *S. cerevisiae* stark von

dem von *P. falciparum*, was erklären kann, wenn die Gene nicht oder nur minimal exprimiert wurden.

Durch den hohen A+T Gehalt im Genom wurden in den Genen Triplets bevorzugt mit Adenin und Thymin verwendet. Was weiterhin bedeutet, dass in dem jeweiligen Genom die tRNA-Häufigkeit zu der Codonverteilung passt und es somit zu Limitierungen kommen kann, wenn ein Gen in einem anderen System exprimiert wird. Hier stimmt dann folglich die Codonverteilung nicht mit der zelleigenen tRNA-Häufigkeit überein und es kommt zu Engpässen.

Dies konnte bei den *E. coli* basierten und Hefe Systemen festgestellt werden, als Gene aus *P. falciparum* exprimiert werden sollten. Daraufhin wurden der A+T Gehalt und demnach die Codonhäufigkeiten der *Plasmodium* Gene denen von *E. coli* Zellen angepasst.

Nach der Codonoptimierung wurden die Proteine erneut im zellfreien System hergestellt und in allen drei Fällen gab es fluoreszierende GFP-Fusionsproteine. Zu der Monomerbande war bei dem optimalen Detergens auch immer eine Dimerbande zu sehen.

Zum einen kam es jetzt durch den angepassten A+T Gehalt nicht mehr zu Limitierungen der tRNA, auch durch die hohe mRNA Kopienanzahl, hervorgerufen durch den T7-Promotor zusammen mit der T7-RNA-Polymerase [103]. Zum anderen kann es sein, dass es zu einer verbesserten Proteinfaltung durch die angepasste Codonverteilung kam. Denn bei DNA Abschnitten mit seltenen Codons entstand durch die verlangsamte Translation häufig im Protein die *Random Coil* Struktur [104]. Es wird sogar vermutet, dass Abschnitte mit gehäuften seltenen oder häufigen Codons eine Rolle bei der Genexpression spielten [104].

Neben der Codonverwendung stellte sich die Frage bei den Pf70 und Pf75, ob deren Faltung nicht, wie bei den eukaryotischen Monocarboxylat Transportern (MCT), ein zusätzliches Protein z. B. als Chaperon benötigen. Denn MCTs brauchen für ihre richtige Faltung und Lokalisation in der Plasmamembran die Proteine Basigin oder Embigin [105].

Da die beiden Pf70-GFP und Pf75-GFP im zellfreien System hergestellt wurden, gab es die Überlegung, ob GFP die Faltung unterstützt. Andererseits wurde im *Plasmodium*genom bei einer *in silico* Suche von J. Rambow weder ein Basigin- noch Embigin-ähnliches Protein gefunden. Also wurden Pf70 und Pf75 ohne das fusionierte GFP zellfrei hergestellt. Hier wurde beide Proteine erhalten und demnach hatte das GFP keinen Einfluss auf die zellfreie Herstellung dieser beiden Proteine.

Durch die optimierten Sequenzen war es nun möglich, die drei Proteine auch in der Hefe und in *E. coli* herzustellen, wodurch die Funktion des PfFNT beschrieben werden und zugleich der Beteiligung des Pf70 und Pf75 am plasmodialen Laktattransport widersprochen werden konnte (Experimente durchgeführt von J. Rambow).

5.4 Kristallisation von PfFNT

Die Funktion des putativen Formiat-Nitrit Transporters aus dem Malariaerreger *P. falciparum* wurde in unserer Arbeitsgruppe geklärt. Da dieses Membranprotein ein mögliches pharmazeutisches Wirkstoffziel in der Malariabekämpfung darstellt, wird für weitere Studien, z. B. die Suche nach einem hochpotenten Inhibitor, die genaue Proteinstruktur benötigt.

Das verwendete, zellfrei hergestellte Protein wurde in hohen Konzentrationen zwischen 7 und 8 mg/ml erhalten. Allerdings handelte es sich hier um einen ersten Kristallisationsansatz und das Protein wurde nur mittels Nickel-NTA *Beads* gereinigt. Es fehlten Reinigungsschritte, wie z. B. die Gelfiltration, bei der nur Proteine einer Größe, bzw. Faltungsart gesammelt werden [106]. Zudem befanden sich sowohl N-Terminal ein HA-*Tag* als auch C-Terminal ein His-*Tag* an dem Protein. Im Detergenzscreen waren auch bei dem geeignetsten Detergens Brij78 noch im gleichen Verhältnis eine obere und untere Bande zu sehen und somit zwei Faltungsformen vorhanden.

Das zellfreie System eignet sich sehr gut für die Kristallisationsansätze, da hier in kurzer Zeit, über Nacht, große Mengen von Protein hergestellt werden können.

Das PfFNT befand sich für die Kristallisationsansätze in einem Puffer mit 300 mM Natriumchlorid, 20 mM Tris, pH 8, und 0,05 % DDM, wobei die empfohlene Salzkonzentration von Z. Newby *et al* (2009) [106] bei 150 mM Natriumchlorid liegt.

Keine der Pufferzusammensetzungen entsprach den vormals erfolgreichen Puffern, die zur Kristallisation von Proteinen aus der Formiat-Nitrit Transporter Familie führte [46, 47, 48, 49].

Letztendlich gelang es nicht, Proteinkristalle herzustellen, sondern nur Salzkristalle. Bei erneuten Versuchen sollte sich weniger Natriumchlorid im Proteinpuffer befinden, die HA- und His-*Tags* entfernt werden und das Protein durch Gelfiltration auf eine Faltungsform gebracht werden. Zusätzlich sollen noch die langen Termini trunziert werden, wie bereits bei Wang *et al.* (2009) [46] durchgeführt.

5.5 Proteoliposomen

Erste Liposomen wurden von A. Bangham *et al.* (1965) [107] hergestellt, die sich als sehr permeabel für Wasser erwiesen. Erste *Stopped Flow* Versuche mit Proteoliposomen mit rekonstituiertem AQP1 wurden 1992 von M. Zeidel *et al.* [108] publiziert. Hier konnte gezeigt werden, dass der Wassereinstrom in Proteoliposomen mit Aquaporin deutlich schneller vonstatten ging als bei den Liposomen ohne Protein.

Der kritische Schritt der Proteinrekonstitution war die Entfernung des Detergens, das zur Solubilisierung des Membranproteins und der Lipide benötigt wurde. Sobald es entfernt wird, ordnen sich die Lipide mit den Proteinen zu einer Doppelschicht an. Die treibende Kraft für diesen thermodynamischen Prozess ist der hydrophobe Effekt [109].

Es wurden Proteoliposomen für zwei verschiedene Methoden hergestellt: für SURFE²R Messungen und für *Stopped Flow* Messungen.

Die Proteoliposomen für die SURFE²R Messungen, hergestellt unter Verwendung der *Biobeads* und Triton-X 100 als Detergens, ließen sich gut reproduzieren. Für dieses System sind sowohl Proteoliposomen als auch Membranpräparationen geeignet, die nach dem Aufbringen auf den Sensor zentrifugiert werden [78]. Hierbei war es nicht wichtig, ob ein Proteoliposom eine perfekte Kugel ist, da durch den Zentrifugationsschritt auch Liposomfragmente auf dem Sensor aufgebracht werden. Des Weiteren ging es hier nicht um einen Schwell- oder Schrumpfprozess wie bei den *Stopped Flow* Messungen, sondern um eine Ladungsverschiebung von Ionen entlang eines chemischen Gradienten.

Bei den Proteoliposomen, hergestellt für die *Stopped Flow* Messungen, war die Herstellung problematisch. Bei den ersten Versuchen wurden das Detergens Triton-X 100 mit den *Biobeads* entfernt [110, 82]. Hier wurde in der Arbeit von A. Müller-Lucks (2012) [94] allerdings festgestellt, dass die zugefügte *Biobead*menge mit der Wasserdurchlässigkeit der Liposomen korrelierte. Je mehr *Biobeads* zum Entfernen hinzugegeben wurden, desto schneller schollen die Liposomen. Deshalb lag die Vermutung nahe, dass die *Biobeads* auch die Lipide adsorbierten. Wenn aber die zugegebenen Mengen an *Biobeads* in Probe und Negativkontrolle gleich waren, konnten die erhaltenen Werte miteinander verglichen werden.

Da Probleme mit der Reproduktion bestanden, wurden weitere Verfahren zur Entfernung des Detergens durchgeführt. Mit dem Verdünnungsverfahren werden die

Detergenzien durch Verdünnung unter ihre spezifische CMC gebracht, bei der Detergenzien keine Mizellen mehr bilden können, sondern die einzelnen Moleküle frei in Lösung vorliegen. Dieses Verfahren wurde in Kombination mit dem Detergens β -Octylglycosid bereits für Aquaporine in einigen Publikationen veröffentlicht [108, 77, 111], jedoch gelang es nicht, dies zu reproduzieren. Mit dem Detergens β -Octylglycosid ließ sich kein Protein in die Liposomen rekonstituieren, wie im Saccharosegradienten zu sehen war und es war somit ungeeignet.

Beim Pufferaustausch über eine Gelfiltrationssäule fand der gleiche Verdünnungsprozess statt, wie bei der direkten Injektion der Probe in ein größeres Volumen, allerdings langsamer. So blieb den Lipiden und Proteinen mehr Zeit, sich thermodynamisch zusammenzufinden. Da die Proteoliposomen hier größere τ -Werte aufwiesen, schienen die Lipide eine stabilere Lipiddoppelschicht auszubilden.

Zur Überprüfung der Rekonstitutionseffizienz wurde der Saccharosegradient verwendet. Hier wurde der Proteoliposomenansatz anhand seiner Dichte aufgetrennt [29]. Die reinen Proteine mit der höchsten Dichte befanden sich am Grund des Zentrifugationsröhrchens, leere Liposomen befanden sich in einer Fraktion über den Proteoliposomen, da hier nur die Lipide vorhanden waren. Proteoliposomen besaßen sowohl die Lipide von geringer Dichte als auch die Proteine mit recht hohen Dichten.

Das AQP11 wurde mit verschiedenen Detergenzien rekonstituiert. Das Detergens β -Octylglycosid führte, wie schon erwähnt, zu keinem Erfolg. Bei Triton-X 100 und Fos-Choline-10 zeigten die Proteoliposomen unterschiedliche Dichten. Die mit Triton-X 100 hergestellten Proteoliposomen hatten eine geringere Dichte als die mit Fos-Choline-10 hergestellten, weil eventuell hier weniger Proteine rekonstituiert wurden, oder weil sich bei den mit Fos-Choline-10 hergestellten Proteoliposomen mehr von dem Detergens in den Proteoliposomen befand und sich so die Dichte erhöhte.

Bei den beiden Methoden zur Proteindetektion aus den einzelnen Saccharosegradientfraktionen zeigten sich zwei unterschiedliche Ergebnisse. Beim Fusionsprotein und GFP war zwar In-Gel Fluoreszenz zu sehen, aber nicht beim Westernblot. Hier war nur ein Signal beim GFP zu sehen. Der GFP (FL) Antikörper hatte vermutlich nicht die Epitope detektiert, da sich das C-Terminale GFP noch in den scheinbar intakten Proteoliposomen befand. Die Proteine waren demnach auch in der richtigen Orientierung rekonstituiert. Sobald die Proteine mit TCA in den Fraktionen gefällt wurden, wurden die Liposomen und selbst das Fluorophor des GFP zerstört, denn hier war nun ein deutliches Westernblot Signal von dem Fusionsprotein nachweisbar, allerdings war die In-Gel Fluoreszenz nicht mehr vorhanden.

Zur genauen Überprüfung der Rekonstitutionseffizienz ist der Saccharosegradient nicht geeignet, da sich Proteine durch den Rekonstitutionsprozess im Inneren der Liposomen befinden und so das Ergebnis verfälschen können. Eine genauere Methode wäre das *Freeze Fracturing* [112], bei der die einzelnen Proteine in den Liposomen mittels bildgebender Verfahren ausgezählt werden können und so auf die Anzahl der Proteine pro Liposom geschlossen werden kann.

5.6 Dynamische Lichtstreuungsmessungen mit der *Stopped Flow Apparatur*

Hier konnte zum ersten Mal zellfrei hergestelltes Aquaporin 11 funktionell in Proteoliposomen gezeigt werden. Der Wassereinstrom mit AQP11 rekonstituierten Proteoliposomen war siebenmal schneller als bei den Liposomen ohne Proteine, bei denen Wasser nur durch die Doppellipidschicht dringt. Die gleichen Werte wurden auch bei der Funktionstestung von *aqp11* exprimierenden *D. discoideum* erhalten. Diese Werte stimmen mit denen von K. Yakata *et al.* (2007) [29] überein, worauf weiter in Abschnitt 5.8 auf Seite 132 f. eingegangen wird.

5.7 SURFE²R Messungen

SURFE²R Messungen ließen sich am besten auf einem Sensor vergleichen. Hier sollte der Sensor nacheinander mit den verschiedenen zu untersuchenden Lösungen gespült und diese direkt miteinander verglichen werden. Die Standardabweichung reduzierte sich auch beim Vergleich mehrerer Sensoren nach der Einführung des Zentrifugationsschritts.

Bei der Sensorbeschichtung wurde das *Self Assembled Monolayer* (SAM) [113] Verfahren angewendet. Hier wurde die Goldschicht zuerst mit einem Alkanthiol beschichtet, wobei die Thiolgruppe eine starke kovalente Bindung mit dem Gold eingeht und einen dicht gepackten Monolayer ausbildet. Auf diese erste Schicht wurde anschließend ein zweiter Monolayer aus dem Lipid Diphytanoyl-Phosphatidylcholine (DPhPC) und Octadecylamine aufgebracht. Anschließend wurden die Proteoliposomen auf den so beschichteten Sensor gegeben und durch den Zentrifugationsschritt

auf dem Sensor fixiert. Zum einen wurden durch diesen Schritt die Proteoliposomen fest mit dem Sensor verbunden, zum anderen wurde auch der Lipidmonolayer gleichmäßig auf der Alkanthiolschicht verteilt. So machte es keinen Unterschied, ob ein Membranfragment oder ein intaktes Proteoliposom auf dem beschichteten Sensor vermessen wurde, weil sich bei beiden Arten die gleichen elektrischen Eigenschaften über die Lipidschicht ausbildeten [78].

Die Lipidschichten machten den Sensor aber auch anfällig gegenüber transportunabhängigen Ionensignalen [114]. Z. B. war es nicht möglich, Calciummessungen durchzuführen, da hierbei immer ein Störsignal alleine durch das Calcium entstand, das alle anderen Signale überlagerte. Eine Vermutung dazu war von B. Frankenhauser und A. Hodgkin (1957) [87], dass die Calciumionen eventuell an der Außenseite der Membran absorbiert werden, dadurch ein elektrisches Feld im Inneren der Membran ausbilden und somit das innere Potential verschieben.

Zur Etablierung der SURFE²R Messungen wurde die Ionophore Gramicidin verwendet, die monovalente Kationen hindurchlässt. Es besteht aus 15 nichtpolaren Aminosäuren und formt in einer Doppellipidschicht einen porenartigen Kanal [115]. Das natürlich vorkommende Gramicidin besteht aus drei Gramicidinvarianten: 72 % Gramicidin A, 9 % Gramicidin B und 19 % Gramicidin C [115] und ist besonders durchlässig für Kalium, Natrium und Lithium mit der folgenden Permeabilitätsreihenfolge: $K^+ > Na^+ > Li^+$ [87].

Bei den hier vorliegenden Messungen wurden aber Permeabilitäten in umgekehrter Reihenfolge gemessen: $Li^+ > Na^+ > K^+$. Daraufhin wurden weitere Messungen durchgeführt, um diese Permeabilitäten zu bestätigen. Hierfür wurden die Liposomen mit Natriumionen gefüllt und anschließend mit Lithiumionen und Kaliumionen gespült. Je nach Permeabilität wurde entweder ein positives oder negatives Signal erwartet und auch erhalten. Die Ergebnisse bestätigten die Permeabilitäten aus dem ersten Versuch.

Um weitere Kontrollversuche mit rekonstituierten zellfrei hergestellten Proteinen durchzuführen, wurde der bereits für SURFE²R Messungen beschriebene M2-Protonenkanal verwendet [88]. Im Gegensatz zu der Publikation von V. Balannik *et al.* (2010) [88] wurde hier allerdings ein GFP-Fusionsprotein vermessen, wobei aber ähnliche Ergebnisse wurden. Die GFP Fusion beeinträchtigt demnach weder die Rekonstitution, noch die Funktion des M2.

In der Publikation von V. Balannik *et al.* (2010) [88] wurden die SURFE²R Messun-

gen mit M2 exprimierenden CHO Zellmembranen durchgeführt. Da die Inhibition (43 %) mit Amantadin nicht vollständig durchführbar war, wurde zusätzlich CuSO₄ auf die Membranen gegeben, da endogene pH-Kanäle vermutet wurden. Hierdurch wurde eine Inhibition um 75 % erreicht.

Bei den Proteoliposomen mit dem zellfrei hergestellten M2-GFP war nur das gewünschte Protein rekonstituiert. Hier ließ sich das Signal um 62 % auf $28 \text{ pA} \pm 5 \text{ pA}$ reduzieren. Bei Liposomen ohne Protein, wurden hingegen Ströme von $20 \text{ pA} \pm 7 \text{ pA}$ (pH-Sprung) und $17 \text{ pA} \pm 3 \text{ pA}$ (pH-Sprung mit Amantadin) erhalten. Wenn dieser durch die Zusammensetzung des aktivierenden Puffers entstandene Strom ebenfalls von den Werten subtrahiert wurde, dann ergab sich eine Inhibition von 80 %, was mit den Werten von V. Balannik *et al.* (2010) [88] übereinstimmt. Demnach konnten mit dem SURFE²R System und zellfrei hergestelltem Protein Ergebnisse anderer Gruppen reproduziert werden.

Im nächsten Schritt wurde der M2-GFP Protonenkanal mit dem Amphipol PMAL C8 hergestellt und anschließend in diesem System funktionell getestet.

Amphipole sind im Gegensatz zu Detergenzien unabhängig von der CMC und können sich selbst sehr kleinen Radien anpassen. Dadurch umgeben sie das Protein nur mit einer dünnen Schicht. Detergenzien hingegen vergrößern den Radius deutlich mehr [116]. In einer vorherigen Publikation war es nur möglich, zellfrei Protein herzustellen, wenn das nichtionische Amphipol A8-35 für die Solubilisierung verwendet wurde [16]. Es stellte sich daraufhin die Frage, ob auch andere Amphipole sich für die zellfreie Herstellung eignen.

In den von E. Mak durchgeführten Versuchen konnte das M2-GFP Protein zusammen mit PMAL C8 zellfrei hergestellt werden. Der Transkriptions-/Translationsprozeß wurde also nicht von dem Amphipol beeinträchtigt. Auch ließ sich In-Gel Fluoreszenz des GFP-Fusionsproteins nachweisen, was auf eine richtige Faltung schließen ließ.

Bei der Funktionstestung mit dem SURFE²R hingegen stellte sich heraus, dass sich das M2-GFP Protein nicht mehr inhibieren ließ, sobald das Amphipol PMAL C8 an der Herstellung oder Reinigung beteiligt war.

Eine Vermutung wäre, da Amphipole unabhängig von der CMC sind, dass sich durch die noch vorhandenen PMAL C8 Moleküle das pentamere Protein aus den einzelnen M2-GFP Monomeren nicht richtig zusammenfinden konnte. Dies ist allerdings unwahrscheinlich, da von Popot *et al.* [117] bereits beschrieben, dass Protein-Protein Interaktionen geringer durch die Amphipole als durch Detergenzien gestört

werden und weil immer noch ein Protonenstrom detektierbar war. Ober aber, dass durch die PMAL C8 Moleküle der Kanal bzw. die Kanalöffnungen so beeinträchtigt wird, dass das Amantadin nicht an das Serin31 gelangen kann [57] und somit keine Inhibition stattfindet.

Zusätzlich ist es möglich, dass das Amantadin direkt an die Amphipole bindet, da von diesen bekannt ist, dass sie an hydrophoben Oberflächen adsorbieren [117].

Zusätzlich zu den SURFE²R Messungen wurden noch Dichtegradienten mit den einzelnen Chargen durchgeführt. Hier stellte sich heraus, dass sich Proteine, mit PMAL C8/DDM und B78/PMAL C8 hergestellt, nicht oder nur zu einem geringen Prozentsatz rekonstituieren ließen. Nur bei PMAL C8/PMAL C8 und B78/DDM war rekonstituiertes Protein nachweisbar. Die Amphipole in Kombination mit den Detergenzien befanden sich wahrscheinlich an den Proteinen, sodass die Hydrophobizität an den Grenzschichten verändert wurde und diese dann nicht mehr mit den Lipiden kompatibel sind.

Das Amphipol PMAL C8 konnte zwar für die zellfreie Herstellung verwendet werden, da es scheinbar nicht den Transkriptions-/Translationsprozess stört, jedoch eignete es sich nicht für Transporterproteine, die funktionell aktiv sein sollen.

Es wurden im Weiteren Messungen mit dem anionenpermeablen Aquaporin 6 durchgeführt. Dieser Kanal ist pH-gesteuert, kann allerdings auch durch Quecksilberionen induziert werden [42].

Für die Versuche wurde deshalb ein pH-Sprung appliziert mit oder ohne zusätzlichen Chloridionen. Bei den SURFE²R Messungen wurde ein höheres Signal beim alleinigen pH-Sprung als beim kombinierten pH-Sprung mit zusätzlichen Chloridionen erhalten. Hier besteht nun die Annahme, dass der pH-Sprung die rekonstituierten Proteine in den Proteoliposomen protoniert und es somit zu einem positiven Artefakt kommt. Wenn nun der pH-Sprung durchgeführt wurde und sich gleichzeitig die Chloridionen im Badmedium befanden, kam es zwar zu der Protonierung der Proteine, aber gleichzeitig gelangten die Chloridionen in das Innere der Proteoliposomen und verschoben die innere Ladung ins Negativere.

5.8 Proteinherstellung und Funktionstestung in *D. discoideum*

Bisher produzierte die Sf9 Insektenzelllinie als einziges Expressionssystem das Aquaporin 11 funktionell, so dass es für die Funktionstestung verwendet werden konnte [29, 35]. *Xenopus* Oozyten Schwelltests [27, 28] zeigten keine Leitfähigkeit und die Expression in Hefe [34] führte auch zu keinem Erfolg.

Wie bereits beschrieben war es möglich, das AQP11 zellfrei funktionell herzustellen. Um ein weiteres Expressions- und Testsystem aufzuzeigen, fiel die Wahl auf die soziale Amöbe *D. discoideum*. *D. discoideum* ist ein einfacher eukaryotischer Organismus, der ein schnelles Zellwachstum besitzt, einfach zu kultivieren und selektieren ist und posttranslationale Modifikationen durchführen kann [118]. Bereits im Jahr 1997 wurde von F. Chaumont *et al.* [119] beschrieben, dass es in *D. discoideum* möglich ist, ein pflanzliches Aquaporin zu exprimieren und dieses so einen veränderten Phänotyp aufweist. So veränderte sich der Zellzyklus, wenn sich die Zellen in hypoosmolarem Puffer befanden. Das Aquaporin wurde hier also funktionell in die Plasmamembran eingebaut.

Aus diesem Grund wurde der Versuch gestartet, das humane Aquaporin 11 in *D. discoideum* rekombinant zu exprimieren. Als Kontrollprotein diente das AQP1, ein sehr gut charakterisierter Wasserkanal [120], der an der extrazellulären Schleife A glykosyliert wird [120].

Zunächst wurden die Gene für hAQP11, hAQP1 und PfAQP in den pDXA-GFP2 Vektor kloniert. Dieser Vektor wurde zum exprimieren von GFP-Fusionsproteinen in *D. discoideum* konstruiert [121]. Zur Selektion enthielt der Vektor eine Sequenz zur G418 Resistenz. Der Vektor erlaubte sowohl eine N-Terminale als auch C-Terminale GFP-Fusion, allerdings waren die Schnittstellen in der *Multiple Cloning Site* (MCS) nur zur N-Terminale GFP-Fusion mit den Gensequenzen kompatibel. Dadurch war keine zusätzliche Faltungskontrolle durch ein C-Terminales GFP gegeben. Durch die GFP-Fusion war es jedoch möglich die Produktion der Proteine zu überprüfen.

Sobald die Konstrukte vorlagen, wurden diese in die Amöben eingebracht. Die Amöben wurden sowohl mit AQP1 und AQP11 als auch mit dem Leervektor transformiert. Zusätzlich gab es auch einen Ansatz ohne Plasmid, auch diese Zellen wurden dem Transformationsprozess unterworfen. Nach der Transformation war die erste

GFP Fluoreszenz erst nach ca. 7 Tagen sichtbar, was zuvor schon beobachtet wurde [122].

Die Wildtypzellen zeigten unter den axenischen Wachstumsbedingungen eine Generationszeit von 10 Stunden, was den Ergebnissen von P. Fey *et al.* (2007) [123] entspricht. Die mit den Vektoren transformierten Amöben zeigten hingegen eine dreifach höhere Generationszeit [119], was an dem erhöhten Energieverbrauch durch die vermehrte Proteinsynthese liegt, die nun bei den Verdopplungsprozessen fehlt.

Beim anschließenden Western-Blotting der Amöben mit GFP-AQP1, GFP-AQP11 oder GFP zeigten sich bei allen Proben positive Ergebnisse, es war sogar In-Gel Fluoreszenz zu detektieren. Hier zeigte die GFP-AQP1 Spur immer eine doppelte Bande. *D. discoideum* [118] war auch in der Lage AQP1 [120] zu glykosylieren. Die untere Bande stellte demnach das GFP-AQP1 dar und die ca. 10 kDa höher laufende Bande zeigte das glykosylierte GFP-AQP1 [124].

Durch die drei Nachweismethoden der Fusionsproteine im Westernblot konnte bestätigt werden, dass es sich in allen Fällen um die richtigen Proteine handelte. Die direkte Fluoreszenzdetektion in den SDS Gelen zeigte, dass das GFP vorhanden ist und richtig gefaltet wurde, auch wenn hier keine Aussage über die Faltung der Aquaporine getroffen werden konnte, da sich das GFP N-Terminal befindet. Die beiden Antikörper GFP (FL) und AQP1 (C-20) bestätigten zusätzlich, dass beide Proteine vorhanden sind. Beim AQP1 (C-20) war nur ein Signal in der GFP-AQP1 Spur auszumachen, nicht aber in der GFP Spur. Es konnten hier also auch unspezifische Banden ausgeschlossen werden.

Die *Stopped Flow* Messungen wurden zum ersten Mal mit heterolog exprimierten Proteinen in *D. discoideum* durchgeführt. Bisher wurden nur *knockout* Zellen [125] vermessen und zelleigene Proteine [126] mit der *Stopped Flow* Apparatur untersucht. Die Messungen zeigten hier wahrscheinlich, dass Zellen mit GFP-AQP1 und GFP-AQP11 einen zwischen sieben- und achtfach schnelleren Wassereinstrom als die Kontrollzellen besaßen. Zuvor wurde bereits von V. Laizé *et al.* (1997) [127] hAQP1 rekombinant in Hefe hergestellt und anschließend in Proteoliposomen rekonstituiert. Bei *Stopped Flow* Messungen erhielten sie einen 13fach schnelleren Wassereinstrom als bei den Kontrollliposomen, was etwa fünffach schneller ist als bei den *D. discoideum* Messungen. Gleiche Raten gab es auch bei rAQP1 exprimiert in *Xenopus* Oozyten [90] und ähnliche Raten bei *S. cerevisiae* (15fach) [128].

Das AQP11 zeigte die gleiche Wasserleitfähigkeit wie das AQP1 in der *Stopped Flow*

Messung. Dieser Wert stimmte auch mit der Funktionstestung des zellfrei hergestellten und dann in Proteoliposomen rekonstituierten AQP11 überein. Hier wurde auch ein siebenfach schnellerer Wassereinstrom gegenüber der Negativkontrolle gemessen. Auch bei den von K. Yakata *et al.* (2007) [29] gemessenen Werten existierte eine Übereinstimmung der Wasserleitfähigkeitswerte von AQP1 und AQP11. Sie war in beiden Fällen fünffach erhöht.

2011 gab es eine erneute Publikation von K. Yakata *et al.* [35], in der Sf9 Vesikel direkt in der *Stopped Flow* Apparatur vermessen wurden. Hier erhielten sie deutlich abweichende Werte hinsichtlich AQP1 mit einer 30fach erhöhten Wasserleitfähigkeit. Die AQP11 Werte blieben allerdings bei ca. vierfach gesteigerter Wasserleitfähigkeit. Die reduzierte Wasserleitfähigkeit von fünf- auf vierfach in AQP11 wurde mit dem Stören des Detergens Fos-Choline 10 im Rekonstitutionsprozess begründet [29]. Die veränderte AQP1 Wasserleitfähigkeit wurde nicht begründet und schien im Vergleich mit Messungen in *Xenopus* Oozyten, *S. cerevisiae* und Proteoliposomen sehr hoch zu sein. In allen Versuchen, außer bei den *Xenopus* Oozyten, wurde Saccharose als Osmolyt verwendet, was somit den direkten Vergleich der Raten erlaubt [128]. Bei den *Xenopus* Oozyten wurde der Messpuffer verdünnt und so die Osmolarität heruntergesetzt.

Im Westernblot und in den Fluoreszenzbildern wurde nachgewiesen, dass das GFP-AQP1 und GFP-AQP11 hergestellt wurden. Die richtige Faltung wurde durch die Funktion als Wasserkanal bewiesen.

Es ist allerdings möglich, dass sowohl beim GFP-AQP1 als auch beim GFP-AQP11 nicht das gesamte Protein in der Plasmamembran lokalisiert war. Dies ließ sich mit dem Westernblot und den Fluoreszenzbildern nicht nachweisen. Zudem konnte nicht ausgeschlossen werden, dass das N-Terminale GFP die Funktion beeinträchtigte und es somit zu der geringeren Wasserleitfähigkeit beim GFP-AQP1 kam.

Die reine GFP Expression hatte in den *D. discoideum* Amöben keinen Einfluss auf die Wasserleitfähigkeit. Hier wurden die gleichen Werte wie bei *Stopped Flow* Messungen bei den Wildtyp Zellen erhalten.

Die Fluoreszenzbilder von *D. discoideum* mit GFP, GFP-AQP1 und GFP-AQP11 zeigen alle GFP Fluoreszenz. Mit den Westernblots wurde zudem bestätigt, dass es sich hierbei auch um die vollständigen Fusionsproteine handelt. Mit den Bildern konnte also die Herstellung des Proteins geklärt werden, allerdings war es nicht möglich nähere Aussagen über die Lokalisation zu geben. Hierfür war die Art des Mikroskops nicht optimal, weil die gesamte Zelle durchleuchtet wurde. Genauere

5 *Diskussion*

Aussagen hätten bei schichtweisen Aufnahmen mit einem konfokalen Mikroskop getroffen werden können.

Ausblick

Die zellfreie Proteinsynthese begann vor fünf Dekaden mit dem Ziel, die Translation von mRNA zu Polypeptiden zu verstehen [11, 4]. Ende der 1980er Jahre entwickelte es sich zu einer alternativen Methode der Proteinherstellung, indem größere Mengen hergestellt werden konnte [5]. Allerdings genügen die bisher erreichten Ausbeuten nur um im kleinen Maßstab für die Forschung Protein herzustellen; jedoch nicht, um kommerziell Protein zellfrei in großen *Batch* oder *Fed-Batch* Reaktoren zu betreiben. Hierfür sind die Kosten für die verwendeten Komponenten noch zu hoch. Sobald die Effizienz, also die Milligrammausbeute pro Milliliter Reaktionsansatz aber steigt, wird das Verfahren profitabel für bisher schwer herstellbare Proteine.

Um die richtige Faltung der Proteine im größeren Ansatz zu gewährleisten, bietet es sich an, die Faltungskontrolle durch GFP-Fusion zu verwenden. Hier können parallel 96 - oder mehr - Bedingungen in Mikrotiterplatten getestet werden und kontinuierlich in einem Fluorimeter auf ihre Fluoreszenz überprüft werden. Über die Fluoreszenz kann zügig die optimale Bedingung für die richtige Faltung ermittelt werden. Anschließend wird entweder das GFP mit einer Protease entfernt, oder bei der optimalen Bedingung werden zukünftig die Proteine ohne GFP-Fusion hergestellt.

Das AQP11 konnte in der sozialen Amöbe *D. discoideum* und zellfrei in Ausbeuten von über 2,3 mg/ml Ansatz hergestellt werden. Des Weiteren wurde in beiden Systemen bei *Stopped Flow* Messungen eine sieben bis achtfache Wasserleitfähigkeit gegenüber der Negativkontrolle ohne AQP11 erhalten. Da das AQP11 ein ungewöhnliches NPA Motiv besitzt und die Wasserleitfähigkeit für ein Aquaporin eher gering ist, besteht die Vermutung, dass es noch weitere Funktionen besitzt, auch wenn keine Glycerol und Harnstoff Leitfähigkeiten gezeigt werden konnten.

Neben dem AQP11 konnte auch der Formiat-Nitrit Transporter aus *P. falciparum* PfFNT nach der Codonoptimierung in großen Ausbeuten von ebenfalls über 2,3 mg/ml Ansatz hergestellt werden. Im nächsten Schritt sollte das Protein gut gereinigt erneut für die Kristallisation verwendet werden. Die aufgeklärte Struktur kann dann zum Design von neuen Inhibitoren und weiterer Funktionsaufklärung genutzt werden. Zusätzlich sollte das PfFNT mit schon bestehenden Inhibitoren kristallisiert werden, um die genauen Bindemechanismen von Inhibitor in der Porenstruktur darzustellen.

Literaturverzeichnis

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molekularbiologie der Zelle*. WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 4. edition, 2004.
- [2] F. Lottspeich and J. Engels. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, München, 2. edition, 2006.
- [3] D. Schwarz, F. Junge, F. Durst, N. Frölich, B. Schneider, S. Reckel, S. Sobhanifar, V. Dötsch, and F. Bernhard. Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nature Protocols*, 2:2945–2957, 2007.
- [4] M. Nirenberg and J. Matthaei. The dependence of cell-free protein synthesis in *e. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *PNAS*, 47:1588–1602, 1961.
- [5] A. Spirin, V. Baranov, L. Ryabova, S. Ovodov, and Y. Alakhov. A continuous cell-free translations system capable of producing polypeptides in high yield. *Science*, 242:1162–1164, 1988.
- [6] M. Hino, M. Kataoka, K. Kajimoto, T. Yamamoto, J. Kido, Y. Shinohara, and Y. Baba. Efficiency of cell-free protein synthesis based on a crude cell extract from *Escherichia coli*, wheat germ, and rabbit reticulocytes. *Journal of Biotechnology*, 133:183–189, 2008.
- [7] A. Brödel, A. Sonnabend, and S. Kubick. Cell-free protein expression based on extracts from CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 111:25–36, 2014.

- [8] J. Douthwaite and R. Jackson. *Ribosome Display and Related Technologies: Methods and Protocols*, volume 805 of *Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media, 2012.
- [9] C. Huang, K. Lokugamage, J. Rozovics, K. Narayanan, B. Semler, and S. Makino. Alphacoronavirus transmissible gastroenteritis virus nsp1 protein suppresses protein translation in mammalian cells and in cell-free hela cell extracts but not in rabbit reticulocyte lysate. *Journal of Virology*, 85:638–643, 2011.
- [10] F. Bernhard and Y. Tozawa. Cell-free expression - making a mark. *Current Opinion in Structural Biology*, 23:374–380, 2013.
- [11] F. Katzen, G. Chang, and W. Kudlicki. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends in Biotechnology*, 23:150–156, 2005.
- [12] D. Schwarz, C. Klammt, A. Koglin, F. Löhr, B. Schneider, V. Dötsch, and F. Bernhard. Preparative scale cell-free expression systems: New tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. *Methods*, 41:355–369, 2007.
- [13] D. Nelson and M. Cox. *Lehninger Biochemie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 3. edition, 2001.
- [14] D. Acati and J. Ferry. Purification and characterization of acetate kinase from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *The Journal of Biological Chemistry*, 263:15444–15448, 1988.
- [15] B. Schneider, F. Junge, V. Shirikov, F. Durst, D. Schwarz, V. Dötsch, and F. Bernhard. *Membrane Protein Expression in Cell-Free Systems*, volume 601 of *Heterologous Expression of Membrane Proteins*. Humana Press, 2010.
- [16] P. Bazzacco, E. Billion-Denis, S. Sharma, L. Catoire, S. Mary, C. Le Bon, E. Point, J. Baneres, G. Durand, F. Zito, B. Pucci, and J. Popot. Non-ionic homopolymeric amphipols: Application to membrane protein folding, cell-free synthesis, and solution NMR. *Biochemistry*, 51:1416–1430, 2012.
- [17] C. Midgett and D. Madden. Breaking the bottleneck: Eukaryotic membrane

- protein expression for high-resolution structural studies. *Journal of Structural Biology*, 160:265–274, 2007.
- [18] E. Wallin and G. von Heijne. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Science*, 7:1029–1038, 1998.
- [19] C. Gustafsson, S. Govindarajan, and J. Minshull. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22:346–353, 2004.
- [20] A. Freischmidt, M. Liss, R. Wagner, H. Kalbitzer, and G. Horn. RNA secondary structure and in vitro translation efficiency. *Protein Expression and Purification*, 82:26–31, 2012.
- [21] S. Wagner, M. Bader, D. Drew, and J. de Gier. Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends in Biotechnology*, 24:364–371, 2006.
- [22] A. Halestrap. The monocarboxylate transporter family—structure and functional characterization. *IUBMB Life*, 64:1–9, 2012.
- [23] R. Kopito. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology*, 10:524–530, 2000.
- [24] E. Lander, L. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409:860–921, 2001.
- [25] K. Ishibashi, M. Kuwahara, Y. Kageyama, S. Sasaki, M. Suzuki, and M. Imai. *Molecular cloning of a new aquaporin superfamily in mammals: AQPX1 and AQPX2*. Kluwer Academic, New York, 2000.
- [26] K. Ishibashi. *Aquaporins, Handbook of Experimental Pharmacology*, volume 190, chapter New Members of Mammalian Aquaporins: AQP10-AQP12. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009.
- [27] Y. Morishita, T. Matsuzaki, M. Hara-chikuma, A. Andoo, M. Shimono, A. Matsuki, K. Kobayashi, M. Ikeda, T. Yamamoto, A. Verkman, E. Kusano, S. Ookawara, K. Takata, S. Sasaki, and K. Ishibashi. Disruption of aquaporin-11

- produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. *Molecular and Cellular Biology*, 25:7770–7779, 2005.
- [28] D. Gorelick, J. Praetorius, T. Tsunenari, S. Nielsen, and P. Agre. Aquaporin-11: A channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. *BMC Biochemistry*, 7, 2006.
- [29] K. Yakata, Y. Hiroaki, K. Ishibashi, E. Sohara, S. Sasaki, K. Mitsuoka, and Y. Fujiyoshi. Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, pages 688–693, 2007.
- [30] B. Wu, C. Steinbronn, M. Alsterfjord, T. Zeuthen, and E. Beitz. Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel. *The EMBO Journal*, 28:2188–2194, 2009.
- [31] K. Ishibashi. Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758:989–993, 2006.
- [32] E. Techekneva, Z. Khuchua, L. Davis, V. Kadkina, S. Dunn, S. Bachman, K. Ishibashi, E. Rinchik, R. Harris, M. Dikov, and M. Breyer. Single amino acid substitution in aquaporin 11 causes renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19:1955–1964, 2008.
- [33] S. Okada, T. Misaka, Y. Tanaka, I. Matsumoto, K. Ishibashi, S. Sasaki, and K. Abe. Aquaporin-11 knockout mice and polycystic kidney disease animals share a common mechanism of cyst formation. *FASEB Journal*, 22:3672–3684, 2008.
- [34] F. Öberg, M. Ekvall, M. Nyblom, A. Backmark, R. Neutze, and K. Hedfalk. Insight into factors directing high production of eukaryotic membrane proteins; production of 13 human AQPs in pichia pastoris. *Molecular Membrane Biology*, 26:215–227, 2009.
- [35] K. Yakata, K. Tani, and Y. Fujiyoshi. Water permeability and characterization of aquaporin-11. *Journal of Structural Biology*, 174:315–320, 2011.
- [36] L. Isaksson, J. Enberg, R. Neutze, G. Karlsson, and A. Pedersen. Expressi-

- on screening of membrane proteins with cell-free protein synthesis. *Protein Expression and Purification*, 82:218–225, 2012.
- [37] M. Ikeda, A. Andoo, M. Shimono, N. Takamatsu, A. Taki, K. Muta, W. Matsushita, T. Uechi, T. Matsuzaki, N. Kenmochi, K. Takata, S. Sasaki, K. Ito, and K. Ishibashi. The NPC motif of aquaporin-11, unlike the NPA motif of known aquaporins, is essential for full expression of molecular function. *Journal of Biological Chemistry*, 2010.
- [38] M. Yasui, T. Kwon, M. Knepper, S. Nielsen, and P. Agre. Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *PNAS*, 96:5808–5813, 1999.
- [39] H. Nagase, J. Ågren, A. Saito, K. Liu, P. Agre, A. Hazama, and M. Yasui. Molecular cloning and characterization of mouse aquaporin 6. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352:12–16, 2007.
- [40] E. Beitz, K. Liu, M. Ikeda, W. Guggino, P. Agre, and M. Yasui. Determinants of AQP6 trafficking to intracellular sites versus the plasma membrane in transfected mammalian cells. *Biology of the Cell*, 98:101–109, 2006.
- [41] M. Yasui, A. Hazama, T. Kwon, S. Nielsen, W. Guggino, and P. Agre. Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature*, 402:184–187, 1999.
- [42] A. Hazama, D. Kozono, W. Guggino, P. Agre, and M. Yasui. Ion permeation of AQP6 water channel protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:29224–29230, 2002.
- [43] M. Ikeda, E. Beitz, D. Kozono, W. Guggino, and P. Agre. Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:39873–39879, 2002.
- [44] A. Warshel. Inverting the selectivity of aquaporin 6: Inverting the selectivity of aquaporin 6: Gating versus direct electrostatic interaction. *PNAS*, 102:1813–1814, 2005.

- [45] Holm, D. Klaerke, and T. Zeuthen. Aquaporin 6 is permeable to glycerol and urea. *Pflugers Arch*, 448:181–186, 2004.
- [46] Y. Wang, Y. Huang, J. Wang, C. Cheng, W. Huang, P. Lu, Y. Xu, P. Wang, N. Yan, and Y. Shi. Structure of the formate transporter foca reveals a pentameric aquaporin-like structure of the formate transporter foca reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature*, 462:467–473, 2009.
- [47] A. Waight, J. Love, and D. Wang. Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17:31–38, 2010.
- [48] W. Lü, J. Du, T. Wacker, E. Gerbig-Smentek, S. Andrade, and O. Einsle. pH-dependent gating in a FocA formate channel. *Science*, 332:352–354, 2011.
- [49] B. Czyzewski and D. Wang. Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature*, 483:494–497, 2012.
- [50] W. Lü, N. Schwarzer, J. Du, E. Gerbig-Smentek, S. Andrade, and O. Einsle. Structural and functional characterization of the nitrite channel NirC from *Salmonella typhimurium*. *PNAS*, 109:18395–18400, 2012.
- [51] A. Waight, B. Czyzewski, and D. Wang. Ion selectivity and gating mechanisms of FNT channels. *Current Opinion in Structural Biology*, 23:1–8, 2013.
- [52] S. Clegg, F. Yu, L. Griffiths, and J. Cole. The roles of the polytopic membrane proteins NarK, NarU and NirC in *Escherichia coli* K-12: two nitrate and three nitrite transporters. *Molecular Microbiology*, 44:143–155, 2002.
- [53] W. Lü, J. Du, N. Schwarzer, E. Gerbig-Smentek, O. Einsle, and S. Andrade. The formate channel FocA exports the products of mixed-acid fermentation. *PNAS*, 109:13254–13250, 2012.
- [54] J. Schnell and J. Chou. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature*, 451:591–595, 2008.
- [55] L. Pinto and R. Lamb. Influenza virus proton channels. *Photochemical & Photobiological Science*, 5:629–632, 2006.

- [56] M. Hong and W. DeGrado. Structural basis for proton conduction and inhibition by the influenza M2 protein. *The Protein Society*, 21:1620–1633, 2012.
- [57] S. Cady, K. Schmidt-Rohr, J. Wang, C. Soto, W. DeGrado, and M. Hong. Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. *Nature*, 463:689–692, 2010.
- [58] M. Sharma, H. Yi, M. Dong, H. Qin, E. Peterson, D. Busath, H. Zhou, and T. Cross. Insight into the mechanism of the influenza A proton channel from a structure in a lipid bilayer. *Science*, 330:509–512, 2010.
- [59] T. Cross, H. Dong, M. Sharma, D. Busath, and H. Zhou. M2 protein from influenza A: from multiple structures to biophysical and functional insights. *Current Opinion in Virology*, 2:128–133, 2012.
- [60] L. Pauling, R. Corey, and H. Branson. The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *PNAS*, 37:205–211, 1951.
- [61] M. Montoya and E. Gouaux. β -barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of α -hemolysin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1609:19–27, 2003.
- [62] K. Dill and J. MacCallum. The protein-folding problem, 50 years on. *Science*, 338:1042–1046, 2012.
- [63] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, R. Dror, and D. Shaw. How fast-folding proteins fold. *Science*, 334:517–520, 2011.
- [64] H. Ecroyd and J. Carver. Unraveling the mysteries of protein folding and misfolding. *IUBMB Life*, 60:769–774, 2008.
- [65] S. Wickner. Posttranslational quality control: Folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, 286:1888–1893, 1999.
- [66] J. Frydman and U. Hartl. Principles of chaperone-assisted protein folding: Differences between in vitro and in vivo mechanisms. *Science*, 272:1497–1502, 1996.

- [67] G. Waldo, B. Standish, J. Berendzen, and T. Terwilliger. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature*, 17:691–695, 1999.
- [68] D. Drew, M. Lerch, E. Kunji, D. Slotboom, and J. de Gier. Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions. *Nature Methods*, 3:303–313, 2006.
- [69] E. Geertsma, M. Groeneveld, D. Slotboom, and B. Poolman. Quality control of overexpressed membrane proteins. *PNAS*, 105:5722–5727, 2008.
- [70] Y. Ashikawa, M. Ihara, N. Matsuura, Y. Fukunaga, Y. Kusakabe, and A. Yamashita. GFP-based evaluation system of recombinant expression through the secretory pathway in insect cells and its application to the extracellular domains of class C GPCRs. *Protein Science*, 20:1720–1734, 2011.
- [71] S. Newstead, H. Kim, G. von Heijne, S. Iwata, and D. Drew. High-throughput fluorescent-based optimization of eukaryotic membrane protein overexpression and purification in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*, 104:13936–13941, 2007.
- [72] R. Heim, A. Cubitt, and R. Tsien. Improved green fluorescence. *Nature*, 373:663–664, 1995.
- [73] M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254, 1976.
- [74] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.
- [75] H. Rehm and T. Letzel. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 6. edition, 2010.
- [76] C. Klammt, D. Schwarz, K. Fendler, W. Haase, V. Dötsch, and F. Bernhard. Evaluation of detergents for the soluble expression of α -helical and β -barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *FEBS Journal*, 272:6024–6038, 2005.
- [77] M. Borgnia, D. Kozono, G. Calamita, P. Maloney, and P. Agre. Functional

- reconstitution and characterization of AqpZ, the *E. coli* water channel protein. *Journal of Molecular Biology*, 291:1169–1179, 1999.
- [78] P. Schulz, J. Garcia-Celma, and K. Fendler. SSM-based electrophysiology. *Methods*, 46:97–103, 2008.
- [79] P. Schulz, B. Dueck, A. Mourot, L. Hatahet, and K. Fendler. Measuring ion channels on solid supported membranes. *Biophysical Journal*, 97:388–396, 2009.
- [80] H. Chmiel. *Bioprozesstechnik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3. edition, 2011.
- [81] T. Kim, J. Keum, I. Oh, C. Choi, C. Park, and D. Kim. Simple procedures for the construction of a robust and cost-effective cell-free protein synthesis system. *Journal of Biotechnology*, 126:554–561, 2006.
- [82] E. Geertsma, N. Mahmood, G. Schuurman-Wolters, and B. Poolman. Membrane reconstitution of ABC transporters and assays of translocator function. *Nature Protocols*, 3:256–266, 2008.
- [83] C. Renn. Klonierung und zellfreie Expression der Membranproteine hAQP11 und PfFocA. Bachelorarbeit, July 2012.
- [84] M. Gardner, N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R. Hyman, J. Carlton, A. Pain, K. Nelson, S. Bowman, I. Paulsen, K. James, J. Eisen, K. Rutherford, S. Salzberg, A. Craig, S. Kyes, M. Chan, V. Nene, S. Shallom, B. Suh, J. Peterson, S. Angiuoli, M. Pertea, J. Allen, J. Selengut, D. Haft, M. Mather, A. Vaidya, D. Martin, A. Fairlamb, M. Fraunholz, D. Roos, S. Ralph, G. McFadden, L. Cummings, G. Subramanian, C. Mungall, J. Venter, D. Carucci, S. Hoffman, C. Newbold, R. Davis, C. Fraser, and B. Barrell. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419:498–511, 2002.
- [85] F. Blattner, G. Plunkett, C. Bloch, N. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. Glasner, C. Rode, G. Mayhew, J. Gregor, N. Davis, H. Kirkpatrick,

- M. Goeden, D. Rose, B. Mau, and Y. Shao. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277:1453–1462, 1997.
- [86] G. Giaever, A. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Véronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. André, A. Arkin, A. Astromoff, M. El-Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Güldener, J. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D. Jaramillo, D. Kelly, S. Kelly, P. Kötter, D. LaBonte, D. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S. Ooi, J. Revuelta, C. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R. Storms, J. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C. Wang, T. Ward, J. Wilhelmy, E. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R. Davis, and M. Johnston. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418:387–391, 2002.
- [87] B. Hille. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Inc., 3. edition, 2001.
- [88] V. Balannik, P. Obrdlik, S. Inayat, C. Steensen, J. Wang, J. Rausch, W. De-Grado, B. Kelety, and L. Pinto. Solid-supported membrane technology for the investigation of the influenza A virus M2 channel activity. *Plugers Arch*, 459:593–605, 2010.
- [89] J. Popot, T. Althoff, D. Bagnard, J. Banères, P. Bazzacco, E. Billion-Denis, L. Catoire, P. Champeil, D. Charvolin, M. Cocco, G. Crémel, T. Dahmane, L. de la Maza, C. Ebel, F. Gabel, F. Giusti, Y. Gohon, E. Goormaghtigh, E. Guittet, J. Kleinschmidt, W. Kühlbrand, C. Le Bon, K. Martinez, M. Picard, B. Pucci, J. Sachs, C. Tribet, C. van Heijenoort, F. Wien, F. Zito, and M. Zoonens. Amphipols from A to Z. *Annual Reviews of Biophysics*, 40:379–408, 2011.
- [90] J. von Bülow, A. Müller-Lucks, L. Kai, F. Bernhard, and E. Beitz. Functional characterization of a novel aquaporin from *Dictyostelium discoideum* amoebae implies a unique gating mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 287:7487–7494, 2012.

- [91] Y. Son, J. Bae, S. Chong, H. Lee, S. Mo, T. Kim, and H. Choe. Expression, high cell density culture and purification of recombinant EC-SOD in *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162:1585–1598, 2010.
- [92] A. Müller-Lucks, S. Bock, B. Wu, and E. Beitz. Fluorescent *In Situ* folding control for rapid optimization of cell-free membrane protein synthesis. *PLoS one*, 7:e42186, 2012.
- [93] D. Prasher, V. Eckenrode, W. Ward, F. Prendergast, and M. Cormier. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111:229–233, 1992.
- [94] A. Müller-Lucks. *Optimierung der zellfreien Proteinsynthese durch Etablierung einer schnellen in-situ Faltungskontrolle mittels GFP-Fusion*. PhD thesis, Mathematisch Naturwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2012.
- [95] N. Greenfield. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nature Protocols*, 1:2527–2535, 2006.
- [96] F. Öberg, J. Sjöhamn, G. Fischer, A. Moberg, A. Pedersen, R. Neutze, and K. Hedfalk. Glycosylation increases the thermostability of human aquaporin 10 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286:31915–31923, 2011.
- [97] C. Shayakul, B. Clémenton, and M. Hediger. The urea transporter family (SLC14): Physiological, pathological and structural aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, 34:313–322, 2013.
- [98] Z. Newby, J. O’Connell, Y. Robles-Colmenares, S. Khademi, L. Miercke, and R. Stroud. Crystal structure of the aquaglyceroporin PfAQP from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15:619–625, 2008.
- [99] F. Caschera and V. Noireaux. Synthesis of 2.3 mg/ml of protein with an all *Escherichia coli* cell-free transcription-translation system. *Biochimie*, Epub ahead of print, 2013.

- [100] J. Xiong. *Essential Bioinformatics*. Cambridge University Press, 2006.
- [101] A. Mendoza-Vargas, L. Olvera, M. Olvera, R. Grande, L. Vega-Alvarado, B. Taboada, V. Jimenez-Jacinto, H. Salgado, K. Jua ÃÁrez, B. Contreras-Moreira, A. Huerta, J. Collado-Vides, and E. Morett. Genome-wide identification of transcription start sites, promoters and transcription factor binding sites in *E. coli*. *PLoS one*, 4:e7526, 2009.
- [102] L. Du, S. Villarreal, and A. Forster. Multigene expression in vivo: supremacy of large versus small terminators for T7 RNA polymerase. *Biotechnology and Bioengineering*, 109:1043–1050, 2012.
- [103] F. Studier and B. Moffatt. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189:113–130, 1986.
- [104] A. Angov. Codon usage: Nature’s roadmap to expression and folding of proteins. *Biotechnology Journal*, 6:650–659, 2011.
- [105] A. Halestrap and M. Wilson. The monocarboxylate transporter family-role and regulation. *IUBMB Life*, 64:109–119, 2012.
- [106] Z. Newby, J. O’Connell, F. Gruswitz, F. Hays, W. Harries, I. Harwood, J. Ho, J. Lee, D. Savage, L. Miercke, and R. Stroud. A general protocol for the crystallization of membrane proteins for X-ray structural investigation. *Nature Protocols*, 4:619–637, 2009.
- [107] A. Bangham, M. Standish, and J. Watkins. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13:238–252, 1965.
- [108] M. Zeidel, S. Ambudkar, B. Smith, and P. Agre. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry*, 31:7436–7440, 1992.
- [109] D. Marsh. Thermodynamics of phospholipid self-assembly. *Biophysical Journal*, 102:1079–1087, 2012.

- [110] L. Verdoucq, A. Grondin, and C. Maurel. Structure-function analysis of plant aquaporin AtPIP2;1 gating by divalent cations and protons. *Biochemical Journal*, 415:409–416, 2008.
- [111] A. Müller-Lucks, P. Gena, D. Frascaria, N. Altamura, M. Svelto, E. Beitz, and G. Calamita. Preparative scale production and functional reconstitution of a human aquaglyceroporin (AQP3) using a cell free expression system. *New Biotechnology*, 30:545–551, 2013.
- [112] S. Bibi, R. Kaur, M. Henriksen-Lacey, S. McNeil, J. Wilkhu, E. Lettmann, D. Christensen, A. Mohammed, and Y. Perrie. Microscopy imaging of liposomes: From coverslips to environmental SEM. *International Journal of Pharmaceutics*, 417:138–150, 2011.
- [113] A. Ulman. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical Reviews*, 96:1533–1554, 1996.
- [114] J. Garcia-Celma, L. Hatahet, W. Kunz, and K. Fendler. Specific anion and cation binding to lipid membranes investigated on a solid supported membrane. *Langmuir*, 23:10074–10080, 2007.
- [115] E. Bamberg, K. Noda, E. Gross, and P. Lauger. Single-channel parameters of gramicidin A, B and C. *Biochimica et Biophysica Acta*, 419:223–228, 1976.
- [116] J. Popot, E. Berry, D. Charvolin, C. Creuzenet, C. Ebel, D. Engelman, M. Flötenmeyer, F. Giusti, Y. Gohon, Q. Hong, J. Lakey, K. Leonard, H. Shuman, P. Timmins, D. Warschawski, F. Zito, M. Zoonens, B. Pucci, and C. Tribet. Amphipols: polymeric surfactants for membrane biology research. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60:1559–1574, 2003.
- [117] J. Popot. Amphipols, nanodiscs, and fluorinated surfactants: Three nonconventional approaches to studying membrane proteins in aqueous solutions. *Annual Reviews of Biochemistry*, 79:737–775, 2010.
- [118] R. Arya, A. Bhattacharya, and K. Saini. *Dictyostelium discoideum*-a promising expression system for the production of eukaryotic proteins. *The FASEB Journal*, 22:4055–4066, 2008.

- [119] F. Chaumont, W. Loomis, and M. Chrispeels. Expression of an *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin in *Dictyostelium* results in hypoosmotic sensitivity and developmental abnormalities. *PNAS*, 94:6202–6209, 1997.
- [120] K. Murata, K. Mitsuoka, T. Hirai, T. Walz, P. Agre, J. Heymann, A. Engel, and Y. Fujiyoshi. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 407:599–605, 2000.
- [121] S. Levi, M. Polyakov, and T. Egelhoff. Green fluorescent protein and epitope tag fusion vectors for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid*, 44:231–238, 2000.
- [122] P. Gaudet, K. Pilcher, P. Fey, and R. Chisholm. Transformation of *Dictyostelium discoideum* with plasmid DNA. *Nature Protocols*, 2:1317–1324, 2007.
- [123] P. Fey, A. Kowal, P. Gaudet, K. Pilcher, and R. Chisholm. Protocols for growth and development of *Dictyostelium discoideum*. *Nature Protocols*, 2:1307–1316, 2007.
- [124] E. Beitz, B. Wu, L. Holm, J. Schultz, and T. Zeuthen. Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *PNAS*, 103:269–274, 2006.
- [125] J. von Bülow. *Sind Aquaporine an der Zellwanderung beteiligt?* PhD thesis, Mathematisch Naturwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2011.
- [126] E. Kuczmariski, L. Palivos, C. Aguado, and Z. Yao. Stopped-flow measurement of cytoskeletal contraction: *Dictyostelium* myosin II is specifically required for contraction of amoeba cytoskeletons. *Journal of Cell Biology*, 114:1191–1199, 1991.
- [127] V. Laizé, P. Ripoché, and F. Tacnet. Purification and functional reconstitution of the human CHIP28 water channel expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification*, 11:284–288, 1997.
- [128] J. Song, A. Almasalmeh, D. Krenc, and E. Beitz. Molar concentrations of sorbitol and polyethylene glycol inhibit the *Plasmodium* aquaglyceroporin but

not that of *E. coli*: Involvement of the channel vestibules. *Biochimica et Biophysica Acta*, pages 1218–1224, 2012.

Lebenslauf

Sinja Bock
geboren am 23. April 1984
geboren in Eckernförde
Nationalität Deutsch

Schule und Studium

2003 Abitur, Integrierte Gesamtschule Eckernförde
2007 Bachelor of Science with Distinction in Biotechnology,
University of Abertay Dundee, UK
2010 Master of Science in Life Science,
Leibniz Universität Hannover

Promotion

seit 2010 Promotion zum Thema „Zellfreie Synthese von schwer
herstellbaren Proteinen“ am Pharmazeutischen Institut,
Abt. Pharmazeutische und Medizinische Chemie,
Christian-Albrechts Universität zu Kiel,
Betreuung des 4. Fachsemesters Pharmazie

Publikation

Müller-Lucks A, **Bock S**, Wu B, Beitz E (2012) Fluorescent *In Situ* Folding Control for Rapid Optimization of Cell-Free Membrane Protein Synthesis. PLoS one 7(7): e42186

Vortrag

„Zellfreie Herstellung schwieriger Proteine“ bei der Studierendentagung zu den Life Sciences in Kiel, 2013.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Abhandlung, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, dass alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht sind. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

Teile dieser Arbeit wurde unter dem folgenden Titel publiziert:

- A. Müller-Lucks, S. Bock, B. Wu, and E. Beitz. Fluorescent *In Situ* Folding Control for Rapid Optimization of Cell-Free Membrane Protein Synthesis. *PLoS one*, 7(7):e42186, Juli 2012.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln zur guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, den 21. Januar 2014

Sinja Bock

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Eric Beitz. Ihm möchte ich für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas herzlich danken. Ich verdanke ihm darüber hinaus jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung und viele anregende Diskussionen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Kollegen sowie alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Instituts und meinem Arbeitskreis für das freundliche Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Im Besonderen geht mein Dank an Ellen, Julia vB, Janis und zum Ende auch Julia HB, die mir mit ihrer jeweils eigenen Sichtweise auf die Dinge oft sehr weitergeholfen haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Und Annika für die stundenlangen Diskussionen zur weiteren Optimierung von den den ganzen Einzelschritten der zellfreien Proteinsynthese. Wir hatten eine echt schöne Zeit!

Björn möchte ich ausserdem noch für die unermüdlichen Hilfe bei der *French Press* und dem Autoklavieren des Fermenters danken.

Diese Arbeit wäre ohne eure Hilfe nicht möglich gewesen, weshalb ich mich bei allen herzlich bedanken will.

Danken möchte ich auch meinen Freunden und Familie und besonders meinen Eltern, die mich immer ermutigt haben meinen Weg zu gehen und dabei immer hinter mir standen. Ohne euch hätte ich das nie geschafft. Meiner Mutter danke ich zusätzlich für die akribische Durchsicht dieser Arbeit.

Vielen Dank!