
Einflüsse verschiedener Membranen auf die viralen Kaliumkanäle Kcv_{NTS}, Kcv_S und Kmpv_{12T}

Influence of different membrane types on the viral potassium channels Kcv_{NTS}, Kcv_S and Kmpv_{12T}

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades

eines *Doctor rerum naturalium*

Dissertation von

Laura-Marie Winterstein

1. Referentin: Dr. Indra Schröder

2. Referent: Prof. Dr. Adam Bertl

Eingereicht am: 18.04.2019

Darmstadt 2019

Winterstein, Laura-Marie: Einflüsse verschiedener Membranen auf die viralen
Kaliumkanäle K_{CVNTS} , K_{CVS} und K_{MPV12T}

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUPrints: 2019

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.2019

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-88066

Veröffentlicht unter CC BY-NC-ND 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Summary	IV
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau und physikalische Eigenschaften einer Membran	1
1.1.1 Membranlipide	2
1.1.2 Phospholipide	3
1.1.2.1 Geladene Phospholipide	4
1.1.3 Sterole	6
1.1.3.1 Cholesterol als Membranlipid	7
1.1.4 Fettsäureketten und ihre Eigenschaften	9
1.1.5 Chemisch - physikalische Eigenschaften einer reinen Doppellipidmembran	10
1.2 Membranproteine	12
1.2.1 Transportproteine	13
1.2.1.1 Ionenkanäle	14
1.3 Protein-Lipid-Interaktionen	16
1.4 Kaliumkanäle	19
1.4.1 <i>Gating</i> - Mechanismen	21
1.5 Virale Kaliumkanäle	22
2 Methoden	26
2.1 Molekularbiologische Methoden	26
2.1.1 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α -Zellen sowie Plasmid - Isolierung	26
2.1.2 Proteinexpression mit Nanodiscs und Proteinaufreinigung	26
2.2 Elektrophysiologische Messmethoden	28
2.2.1 Planare Lipid <i>Bilayer</i> Technik	28
2.2.2 <i>Contact Bubble Bilayer</i> Technik	30
2.2.2.1 Technische Aspekte	32
2.2.2.2 Herstellung der Liposomen	34
2.2.2.3 Herstellung der Glaspipettenspitzen	34
2.3 Auswertung und Darstellung der Daten	35
2.3.1 Statistische Analyse	35
3 Ergebnisse und Diskussion	36
3.1 Charakterisierung von Kcv _{Next-to-Smith} , Kcv _{Smith} und Kmpv _{12T} am Planaren Lipid <i>Bilayer</i>	37
3.1.1 Kcv _{NTS} und Kcv _S sind sich strukturell sehr ähnlich, besitzen jedoch signifikant unterschiedliche Offenwahrscheinlichkeiten	37
3.1.2 Der virale Kaliumkanal Kmpv _{12T} ist ein Einwärtsgleichrichter und besitzt eine Unterleitfähigkeit	41
3.2 Etablierung der <i>in vitro</i> Expressionsmethode und Überprüfung ihrer Anwendbarkeit auf Protein-Lipid-Untersuchungen mit Hilfe der <i>Contact Bubble Bilayer</i> Methode	43
3.2.1 Eignet sich die <i>in vitro</i> Synthese viraler Kaliumkanäle in Nanodiscs zur Untersuchung von Protein-Lipid-Interaktionen?	43
3.2.1.1 In MM - Disks exprimierte Kir _{2.1} Kanäle führen zu distinktem Kanalschalten in PIP ₂ enthaltenden DPhPC Membranen der CBB Methode	47
3.2.1.2 Die CBB Methode eignet sich ebenfalls zur Untersuchung von bakteriellen Kaliumkanälen	48

3.2.1.3	Direkte Expression des Kaliumkanals KcV _{N_TS} im <i>Contact Bubble Bilayer</i> System	49
3.2.2	Elektrophysiologische Untersuchungen mit der <i>Contact Bubble Bilayer</i> Methode und der Planaren Lipid <i>Bilayer</i> Methode führen zu ähnlichen Ergebnissen.....	50
3.2.3	Zusammenfassung.....	56
3.3	Protein-Lipid-Interaktionen der viralen Kaliumkanäle KcV _{N_TS} , KcV _S und KmpV _{12T} in ungeladenen Membranen mit verschiedenen Fettsäureketten	57
3.3.1	Einfluss gemischter Fettsäureketten auf die Leitfähigkeit und das Kanalschalten der viralen Kaliumkanäle KcV _{N_TS} , KcV _S und KmpV _{12T}	58
3.3.2	Einfluss von POPC auf die Leitfähigkeit und das Kanalschalten der viralen Kaliumkanäle KcV _{N_TS} , KcV _S und KmpV _{12T}	64
3.3.3	Zusammenfassung.....	71
3.4	Der Einfluss von Cholesterol auf die viralen Kaliumkanäle KcV _{N_TS} , KcV _S und KmpV _{12T}	73
3.4.1	Cholesterol hat geringe, aber kanalspezifische Auswirkungen auf die viralen Kaliumkanäle KcV _{N_TS} , KcV _S und KmpV _{12T}	73
3.4.2	KcV _{N_TS} ist in der Lage eine definierte Cholesterolkonzentration von 20 mol% um sich herum zu rekrutieren.	81
3.4.3	Zusammenfassung.....	86
3.5	Der Einfluss von anionischen Lipiden auf virale Kaliumkanäle	89
3.5.1	Der Einfluss von DPhPS auf die viralen Kaliumkanäle KcV _{N_TS} , KcV _S und KmpV _{12T}	90
3.5.1.1	Die anionischen Lipide DPhPS und DPhPG zeigen identische kanalspezifische Auswirkungen auf KcV _{N_TS} , KcV _S und KmpV _{12T}	100
3.5.2	Die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit von KcV _S ist spezifisch für monovalente anionische Lipide	103
3.5.3	Die Auswirkungen von DPhPS auf KcV _S und KcV _{NH} sind denen von einer Punktmutation am inneren <i>Gate</i> beider Kanäle sehr ähnlich.....	105
3.5.3.1	DPhPS ruft die gleiche Spannungsabhängigkeit in KcV _{NH} hervor wie die Mutation des inneren <i>Gates</i>	106
3.5.4	Lokalisationsuntersuchungen eines potenziellen Wirkungsbereichs von DPhPS auf Kcv - Kanäle.....	115
3.5.5	Zusammenfassung.....	120
4	Fazit	121
	Literaturverzeichnis.....	IX
	Abbildungsverzeichnis.....	XVII
	Tabellenverzeichnis.....	XXIII
	Abkürzungsverzeichnis.....	XXIV
	Einheiten.....	XXV
	Anhang	XXVI
	Eigene Arbeit.....	XXVII
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	XXVIII
	Lebenslauf und Publikationen	XXIX
	Danksagung	XXX

Zusammenfassung

Es ist seit langem bekannt, dass die Funktion von Membranproteinen nicht nur auf ihre eigene Struktur zurückzuführen ist, sondern auch durch die chemisch - physikalischen Eigenschaften der Membran moduliert wird. Am besten kann man solche Interaktionen an Ionenkanälen untersuchen, da sich Funktionsänderungen sogar an einzelnen Proteinen durch Änderung des elektrischen Stromes sehr einfach quantifizieren lassen. Es gibt Ionenkanäle wie Kir - Kanäle, die für ihre Funktion auf spezielle Membranlipide angewiesen sind und wiederum andere, dessen Funktion durch die Membran lediglich beeinflusst werden. Dabei spielen chemisch - physikalische Eigenschaften wie Membrandicke, lateraler Druck, Fluidität und die Eigenschaften der Lipidkopfgruppen eine große Rolle.

Um die Auswirkungen von Membranen auf die Funktion von Ionenkanälen zu untersuchen wurden in dieser Arbeit virale Kaliumkanäle verwendet, die aufgrund ihrer minimalistischen Struktur gänzlich in eine Doppellipidmembran eingebettet sind und somit deren Eigenschaften komplett ausgesetzt sind. Bei den untersuchten Kaliumkanälen handelt es sich um zwei Kcv - Kanäle, Kcv_{NTS} und Kcv_S mit jeweils 82 AS pro Monomer und um Kmpv_{12T}, dem bisher kleinsten bekannten Kaliumkanal mit nur 78 AS pro Monomer.

Um die Funktion der drei Kanäle in verschiedenen artifiziellen Membranen zu untersuchen wurden die Planare Lipid *Bilayer* Methode, sowie die *Contact Bubble Bilayer* Methode verwendet. Um die korrekte Faltung der Kanalproteine zu gewährleisten wurden sie in Anwesenheit sogenannter Nanodisks exprimiert; kleinen Membranen, die von einem Gerüstprotein umschlossen sind. Diese Expressionsmethode wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Anwendbarkeit in verschiedenen Messsystemen, auf verschiedene Ionenkanäle sowie auf die Eignung für anschließende Protein-Lipid-Interaktionsuntersuchungen getestet.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Offenwahrscheinlichkeit von Kcv_S durch monovalent anionische Lipide von 35% auf 90% erhöht wird. Durch nähere Analysen wurde festgestellt, dass dies durch eine Konformationsänderung des Proteins zustande kommt, die der einer Mutation an Position 77 (S77G) sehr ähnlich ist und die Funktion des inneren *Gates* beeinflusst. Dies lässt den Schluss zu, dass die Auswirkungen von Punktmutationen durch eine bestimmte Membranzusammensetzung aufgehoben werden können.

In Zusammenarbeit mit der Universität Mailand wurde zudem festgestellt, dass Kcv_{NTS} in cholesterolhaltigen Membranen in der Lage ist sich seine Membranumgebung selbst zu schaffen, also die Bildung von Micro - Domänen wie *Lipid - Rafts* zu induzieren, indem er eine Cholesterolkonzentration von ungefähr 20 mol% um sich rekrutiert.

Summary

It has been known for decades that the function of membrane proteins is not only due to their own structure but is also modulated by the chemical and physical properties of the membrane. These interactions can easily be investigated with ion channels, since functional changes can be quantified by changes in the electrical current, even on single protein level. There are ion channels such as Kir channels, which need special membrane lipids for proper function and others, whose function are merely influenced by the membrane. Therefore, chemical and physical properties, such as membrane thickness, lateral pressure, fluidity and the properties of the lipid head groups play an important role.

In order to investigate the effects of membranes on the function of ion channels, viral potassium channels were used in this work. Due to their minimalistic structure, they are completely embedded in a lipid bilayer and are therefore completely exposed to its properties. The investigated potassium channels are two Kcv channels, Kcv_{NTS} and Kcv_S with 82 AS per monomer and Kmp_{V12T}, the so far smallest known potassium channel with only 78 AS per monomer.

The Planar Lipid Bilayer and the Contact Bubble Bilayer method were used to investigate the function of these three channels in different artificial membranes. To ensure the correct folding of the channel proteins, they were expressed in the presence of so-called nanodiscs; small membranes enclosed by a *scaffold* protein. In the present work, the applicability of this expression method was tested in different measurement systems, with different ion channels and for its suitability for subsequent investigation of protein-lipid interactions.

Furthermore, it was shown that the open probability of Kcv_S is increased from 35% to 90% using monovalent anionic lipids. Further analysis has shown that this is due to a conformational change of the protein that is very similar to a mutation at position 77 (S77G) and affects the function of the inner gate. This leads to the conclusion that the effects of point mutations can be neutralized by a specific membrane composition.

In cooperation with the University of Milan, it was also found that Kcv_{NTS} can create its own membrane environment in cholesterol-containing membranes, i.e. to induce the formation of micro-domains such as lipid rafts, by recruiting a cholesterol concentration of approximately 20 mol% around itself.

1.1.1 Membranlipide

Membranlipide können eine komplexe Chemie aufweisen und sich in ihren Kopfgruppen, Fettsäureketten sowie verschiedene Linkergruppen unterscheiden; damit bilden sie eine sehr heterogene Gruppe an Molekülen mit deutlich unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften.

Natürliche Membranen bestehen hauptsächlich aus Phospholipiden und Sphingolipiden. Bei Phospholipiden ist die Kopfgruppe über eine Phosphatgruppe (ortho - Phosphatmolekül) mit dem Grundgerüst und den Fettsäureketten verestert (**Abbildung 1 C; Abbildung 2**). Es gibt zwei Arten an Phospholipiden, die Phosphoglyceride, die Glycerin als Grundgerüst tragen und Sphingomyeline, welche Sphingosin als Grundgerüst besitzen.

Sphingolipide sind die zweithäufigsten Lipide in natürlichen Membranen. Ihre Fettsäurekette ist über eine Aminogruppe an das Sphingosin geknüpft (**Abbildung 2**). An dieses Ende des Sphingosins ist die variable Kopfgruppe gebunden. Die Kopfstruktur von Lipiden bestehen aus dem Kopfgruppenmolekül und der Verbindungsgruppe zwischen ihr und den Fettsäureketten. Sie geben durch ihre Größe, Ladung und chemische Eigenschaften die Oberflächenstruktur, sowie die Oberflächeneigenschaften einer Membran vor.

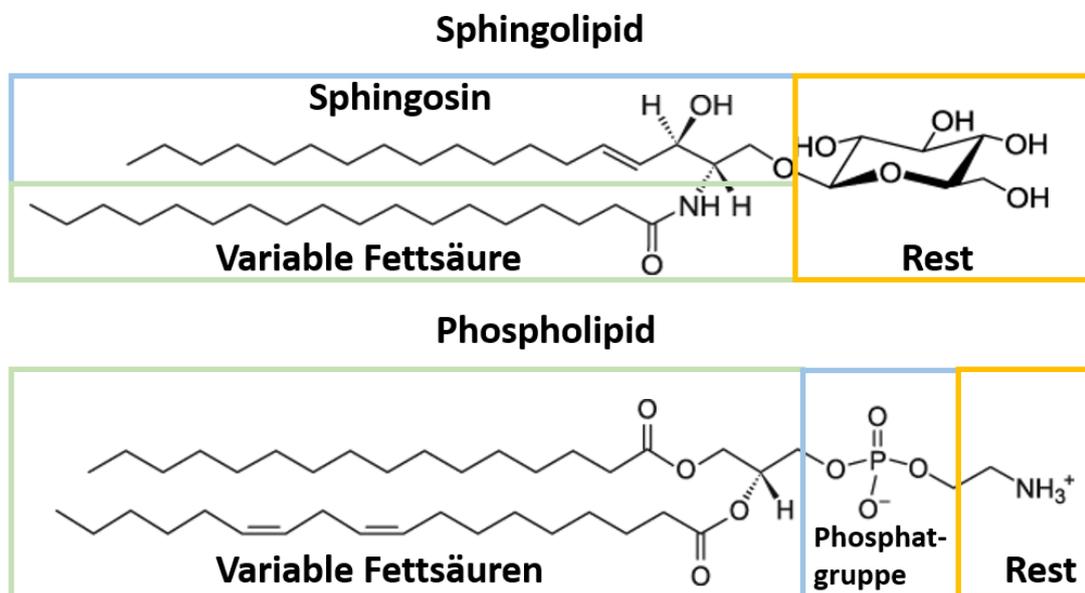


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Sphingolipids und eines Phospholipids; die zwei häufigsten Lipidarten einer natürlichen Doppellipidmembran. Als Beispiele sind hier ein Glycosphingolipid (Cerebrosid; oben) und ein zwitterionisches Phospholipid (1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin; unten) gezeigt.

Neben Phospholipiden und Sphingolipiden enthalten natürliche Membranen ebenso Glycolipide und Sterole. Glycolipide sind phosphatfreie Membranlipide bei denen Zuckerreste glycosidisch an ein Lipid - Molekül gebunden sind. Sie kommen in allen natürlichen (tierischen) Membranen vor, befinden sich jedoch ausschließlich im äußeren *Leaflet* einer Doppelmembran. Dies ist von großer Bedeutung, da die Zusammensetzung der beiden *Leaflets* einer natürlichen Membran nicht immer identisch ist. Betrachtet man eine Zellmembran als Beispiel für eine natürliche Membran, besitzt diese im inneren *Leaflet* (intrazellulär) andere Lipide als im extrazellulären *Leaflet*. PIP₂ beispielsweise kommt nur in geringen Konzentrationen im inneren *Leaflet* einer Membran vor, da es für die Weiterleitung intrazellulärer Signale zuständig ist (Kapitel 1.1.2.1.1). Auch andere anionische, vor allem monovalent anionische Lipide finden sich meist im intrazellulären *Leaflet* einer Plasmamembran wieder. Dies führt zu einem Anteil von ca. 20% negativ geladenen Lipiden im inneren *Leaflet*, was die Plasmamembran zur anionischsten Membran einer Zelle macht (Platre & Jaillais, 2017). Durch diese negative Ladung werden kationische intrazelluläre Moleküle und vor allem periphere Membranproteine angezogen, die an der Plasmemembran ihren spezifischen Aufgaben nachkommen können (Lemmon, 2008).

1.1.2 Phospholipide

Wie bereits beschrieben sind Phospholipide die häufigsten Lipide einer biologischen Membran. Typische Phospholipid - Kopfgruppen sind Choline (Phosphatidylcholin (PC)), Serin (Phosphatidylserin (PS)), Ethanolamin (Phosphatidylethanolamin (PE)) oder Inositol (Phosphatidylinositol (PI)) (van Meer, Voelker, & Feigenson, 2008).

Den Hauptanteil an Lipiden in einer Membran machen mit ca. 50 % Phosphatidylcholine oder anders bezeichnet Lecithine aus (Ashrafuzzaman, Tseng, Kapty, Mercer, & Tuszynski, 2013). Sie tragen alle die ungeladene Cholinkopfgruppe. Je nach ihrer Fettsäurezusammensetzung werden sie namentlich unterschieden. Beispielsweise existieren kurze bis mittellange gesättigte Lipide wie DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) oder DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) mit jeweils identischen Fettsäureketten. POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholin) hingegen besitzt zwei unterschiedliche Fettsäureketten, von denen die zweite zwei C-Atome länger und einfach ungesättigt ist.

1.1.2.1 Geladene Phospholipide

Neben den beschriebenen Phosphatidylcholinen existieren weitere Phospholipide mit diversen Kopfgruppen. Einige dieser Kopfgruppen tragen eine (monovalent), zwei (bivalent oder zwitterionisch) oder mehrere Ladungen (multivalent). Phosphatidylethanolamine (PE) sind ein Beispiel für einfach zwitterionische Lipide, die bei neutralem pH keine Ladung tragen. O-alkyl - phosphatidylcholine, bspw. Ethylphosphatidylcholin (EPC), sind aufgrund der neutralisierten Phosphatgruppe positiv geladen, während Phosphatidylserine (PS) oder Phosphatidylglycerole (PG) einfach negativ geladen sind. Phosphatidylinositole (PIs) hingegen können diverse Ladungen tragen und werden in Kapitel 1.1.2.1.1 näher beschrieben.

Aufgrund ihrer elektrostatischen Eigenschaften, verändern oder definieren geladene Lipide die physikalischen Eigenschaften einer Membran. Jedoch sind die Auswirkungen je nach Ladungsdichte divers. Beispielsweise wird der Oberflächendruck einer monovalenten oder bivalent geladenen Membran eher von der Länge und der Sättigung der Fettsäureketten, sowie der Kopfgruppengröße bestimmt (Brockman, Applegate, Momsen, King, & Glomset, 2003). Höher geladene Lipide führen aufgrund ihrer elektrostatischen Abstoßung zu einem signifikant höheren Oberflächendruck (Levental, Janmey, & Cebers, 2008).

Des Weiteren nähern sich monovalent geladene Lipide in einer Membran nicht weiter an als ihre spezifische *Bjerrum* - Länge. Die *Bjerrum* - Länge ist eine Distanz, bei der die elektrostatischen Energien gleich der thermischen Energie sind. Sie beträgt für Wasser bei Raumtemperatur 0,7 nm. Daraus ergibt sich, dass jede Ladung unabhängig voneinander als Punktladung angesehen werden kann. Die Lipide bilden zusammen zwar ein elektrisches Feld orthogonal zur Membranoberfläche aus, innerhalb der Membran existieren jedoch nur schwache Abstoßungsreaktionen zwischen den Lipiden (Levental, Janmey, & Cebers, 2008). Bei höher geladenen Lipiden kommt es zu einem mittleren Abstand zwischen den Ladungen, der geringer ist als deren *Bjerrum* - Länge, wodurch die elektrostatischen Interaktionen in der Membranebene von Bedeutung werden.

Aufgrund ihrer elektrischen Ladung sind kationische oder anionisch Lipide prädestiniert für elektrostatische Bindungen an andere Membrankomponenten wie beispielsweise Membranproteine (Kapitel 1.3).

1.1.2.1.1 Phosphatidylinositole

Ein weiterer wichtiger anionischer Bestandteil von Zellmembranen sind Phosphatidylinositole (PI), Phosphatsäuren des Inositols, die zu den Phosphoglyceriden gehören. Das Grundgerüst eines Phosphatidylinositols ist Diacylglycerin (DAG), welches eine Verbindung aus Glycerin und veresterten Fettsäuren wie Capronsäure, Ölsäure, Palmitinsäure, Arachidonsäure oder Stearinsäure ist. DAG liegt in hoher Konzentration in der inneren Zellmembran vor. Durch die Bindung von Inositolphosphat über einen Phosphatrest wird das funktionelle Molekül PIP gebildet, welches durch eine enzymatisch vermittelte Bindung weiterer Phosphatreste am Inositolring zu PIP₂ oder PIP₃ umgewandelt werden kann. Die Phosphatgruppen besitzen negative Ladungen und verleihen PIPs somit seine anionischen Eigenschaften (Hansen, 2015). Je nachdem an welcher Position der oder die Phosphatreste gebunden werden, entstehen verschiedene PIP Varianten mit unterschiedlichen Ladungsdichten.

Eine doppelte Phosphatbindung an Position 4 und 5 führt zur Bildung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (**Abbildung 3**) und ist das am häufigsten auftretende PIP₂. PIP₂ besitzt als Fettsäureketten die 4 - fach gesättigte Stearinsäure (Omega - 6 Fettsäure) (**Abbildung 3** obere) und die ungesättigte Arachidonsäure (**Abbildung 3** untere).

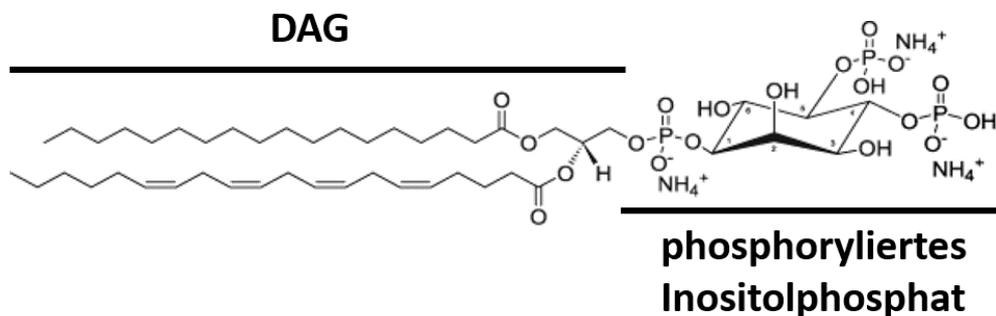


Abbildung 3: Struktur von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂). DAG, bestehend aus Glycerin, welches an eine Arachidonsäure (oben) und eine vierfach gesättigte Stearinsäure (unten) gebunden ist, ist über eine Phosphatgruppe an den Inositolring geknüpft, der wiederum zweifach an Position vier und fünf phosphoryliert ist. (Avanti Lipids)

Aufgrund der zwei freien Phosphatgruppen am Inositolring besitzt PIP₂ unter physiologischen Bedingungen eine Nettoladung von -4 und ist somit multivalent negativ geladen (Hilgemann, 2007; McLaughlin, Wang, Gambhir, & Murray, 2002) Diese innermolekulare Ladungsdichte hat zur Folge, dass sich, wie schon im vorherigen Kapitel beschrieben, die anionischen Ladungen näher aneinander befinden als deren Bjerrum - Länge (Levental, Janmey, & Cebers, 2008). Dies führt im Gegensatz zu monovalenten Ladungen zu erheblichen elektrostatischen Effekten in der

Membranebene. Zusätzlich vergrößert sich durch die Ladungsdichte die einnehmende Oberfläche eines PIP₂ Moleküls von ca. 40 Å² - 80 Å² (bei normalen Kopfgruppen) (Demel, Geurts van Kessel, Zwaal, Roelofsen, & van Deenen, 1975) auf bis zu 160 Å², wodurch sich der Oberflächendruck signifikant erhöht (Levental, Janmey, & Gebers, 2008). Dies kommt zutragen obwohl PIP₂ im Vergleich zu anderen Lipiden eher selten ist. Es liegt mit nur ca. 1 mol% ausschließlich im inneren *Leaflet* einer natürlichen Membran vor. (Lemmon, 2003; McLaughlin et al., 2002; Suh & Hille, 2008). Das entspricht je nach Membranabschnitt, Molekülanzahlen von 5000 bis 60000 Molekülen pro μm² Membran (natürliche Zellmembran = 1,6 Millionen Phospholipide pro μm²) (Hilgemann, 2007; McLaughlin et al., 2002).

Als wichtigste Aufgabe von PIP₂ zählt die Vermittlung des intrazellulären Calciumanstiegs. Hierfür wird das Enzym Phospholipase C aktiviert, welches anschließend das Membranphospholipid PIP₂ in DAG und IP₃ (Inositol-1,4,5-triphosphat) spaltet. IP₃ und DAG wiederum dienen als sekundärer Botenstoff wobei IP₃ für die Ca²⁺ - Entlassung aus dem Endoplasmatischen Retikulum verantwortlich ist und DAG zur Rekrutierung sowie Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) führt (Berridge, 1993). Ein intrazellulärer Calciumanstieg führt wiederum zu diversen zellulären Vorgängen. Somit sind beide Abbauprodukte von PIP₂ Bestandteile zweier Hauptsignalwege in einer Zelle, während das intakte PIP₂ eher für die Funktion diverser Proteine oder Transporter in der Plasmamembran benötigt wird (Kapitel 1.3). PIP₂ ist beispielsweise dafür bekannt die Funktion von Kir - Kanälen (*Inward rectifying K⁺*), KCNQ Kanälen, TRP Kanälen (*transient receptor potential*) oder Iontentransportern wie die Na⁺ - Ca⁺ - Tauscher zu regulieren (Hilgemann & Ball, 1996; Suh & Hille, 2008). Ebenso ist PIP₂ als Ankerlipid für Proteine bekannt, die die Endo- sowie Exozytose katalysieren (Suh & Hille, 2008).

1.1.3 Sterole

Sterole sind eine weitere Gruppe von Membranlipiden und kommen in Tieren (Zoosterine), Pflanzen (Phytosterine) und Pilzen (Mycosterine) vor. Ihr Grundgerüst Sterin ist ein hydrophober Steroidkörper (Steran), ein Kohlenstoffgerüst aus vier kondensierten Ringen mit einer hydrophilen 3β - Hydroxygruppe (**Abbildung 4 B**). Gemäß dieser amphipathischen Eigenschaften lagern sich Sterole mit ihrer polaren hydrophilen Kopfgruppe zwischen die Kopfgruppen der anderen Lipide, während der Steroidkörper in den hydrophoben Membranbereich ragt.

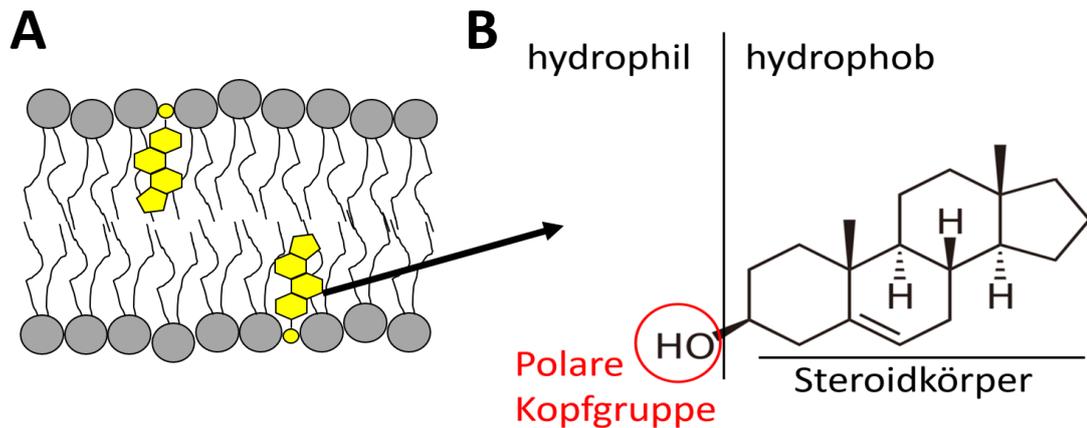


Abbildung 4: Schematische Einlagerung von Sterolen in eine Doppellipidmembran (A) aufgrund ihrer polaren chemischen Eigenschaften (B).

Sterole können an ihren Steroidkörper diverse funktionelle Gruppen oder Alkylketten besitzen. Zu den wichtigsten pflanzlichen Sterolen gehören Stigmasterol und Sitosterol. Ergosterol ist ein Beispiel für ein Mycosterol. Derivate des Sterols sind Steroide, welche ebenso die Vorstufen diverser Steroidhormone sind. Das bekannteste und für uns wichtigste Sterol bzw. Steroid ist Cholesterol, welches diverse Funktionen im menschlichen Körper besitzt.

1.1.3.1 Cholesterol als Membranlipid

Cholesterol ist ein Steroid und einer der wichtigsten Bestandteile von natürlichen Membranen. Chemisch gesehen ist Cholesterol kein Lipid, sondern ein polyzyklischer Alkohol, der zur Gruppe der Isoprenoide gehört. Es wird ausgehend von Acetyl CoA über Mevalonsäure durch einige enzymatische Reaktionen gebildet.

Cholesterol besteht, wie auch die Sterole, aus einer polaren Kopfgruppe, dem angesprochenen Steroidkörper und einer Alkylseitenkette (**Abbildung 5** rechts). Es ist daher größtenteils hydrophob und kann sich somit in Zellmembranen einlagern (Dopico, Bukiya, & Singh, 2012) (**Abbildung 5** links). Dabei bilden die hydrophilen Kopfgruppen Wasserstoffbrückenbindungen zu anderen Phospholipidkopfgruppen aus (Berg, Tymoczko, Stryer, 2012).

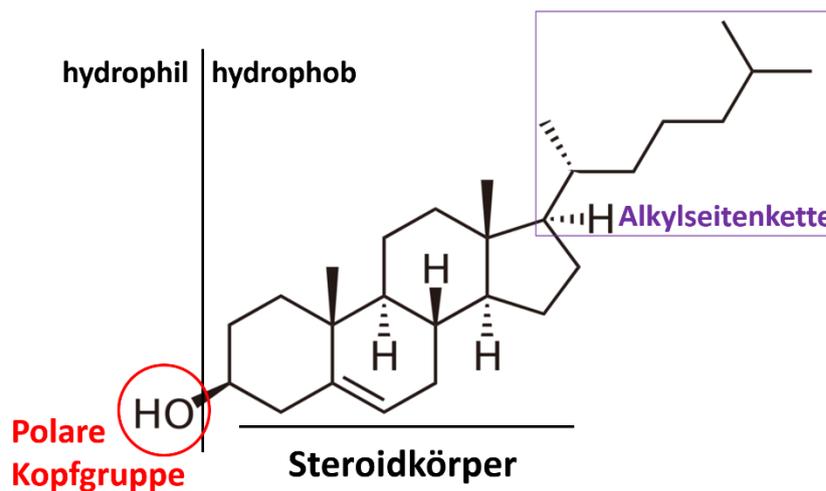


Abbildung 5: Schematischer Aufbau von Cholesterol und dessen Einlagerung in Doppellipidmembranen. Die hydrophile polare Kopfgruppe lagert sich zwischen die Kopfgruppen der Lipide, während der hydrophobe Teil des Cholesterols in die Membran eingebettet ist.

Generell befinden sich 95 % des Cholesterolgehalts eines Körpers in dessen Zellmembranen. In tierischen Zellen kann Cholesterol mit bis zu 30 % in beiden *Leaflets* der Membran vorliegen, wobei die Konzentration in der inneren Membranhälfte meist höher ist als die der äußeren (Wood, Igbavboa, Muller, & Eckert, 2011).

In einer Membran verändert Cholesterol verschiedene Membraneigenschaften. Zum einen vermindert es die Fluidität einer Membran bei hohen Temperaturen (ca. 37 °C) und schränkt somit die Lipidbewegung ein. Bei niedrigeren Temperaturen verhindert es durch das Ringsystem eine dichte Lipidpackung und senkt somit die Erstarrungstemperatur der Membran (Dufourc, 2008). Dadurch korreliert die Temperaturspanne, in der Phosphocholinmembranen fluide sind, proportional mit der Cholesterolkonzentration (Bernsdorff & Winter, 2003; J. Gallová, Uhríková, Kučerka, Teixeira, & Balgavý, 2008; McKersie & Thompson, 1979).

Cholesterol induziert zudem eine erhöhte Ordnung (Kondensation) der Lipide, was in einer Veränderung der Membrandicke resultiert (Jana Gallová, Uhríková, Hanulová, Teixeira, & Balgavý, 2004; Pasenkiewicz-Gierula, Subczynski, & Kusumi, 1991; Stockton & Smith, 1976). Diese Änderung kann je nach Lipidzusammensetzung und dessen Eigenschaften (Sättigungsgrade, Fettsäurekettenlänge, thermodynamische Phase) eine Erhöhung oder eine Verringerung der Membrandicke bedeuten (McIntosh, 1978). Beispielsweise ist bekannt, dass Cholesterol auf Lipide mit gesättigten Fettsäureketten einer Länge zwischen 12 und 18 C - Atomen membranverdickend wirkt (McIntosh, 1978). Ein weiterer Grund warum eine Membran durch Cholesterol physikalisch verändert wird, ist die cholesterolbedingte zusätzliche Einlagerung von Wassermolekülen in die Kopfgruppenregion. Dies hat nicht nur eine

veränderte Membrandicke, sondern auch eine erhöhte Oberflächendichte der Lipide zur Folge (J. Gallová et al., 2008).

Des Weiteren ist Cholesterol bekannt für die Ausbildung von *Lipid - Rafts* (J. Gallová et al., 2008); kleine Microdomänen in einer Membran mit bestimmten Zusammensetzungen und chemisch - physikalischen Eigenschaften.

Da die Konzentration von Cholesterol und dessen Anordnung in einer Lipidmembran wichtig für die Funktion von Membranproteinen sein kann, definiert es die Funktion von Zellmembranen, sowie ein Stück weit die Funktion der ganzen Zelle (Kapitel 1.3).

1.1.4 Fettsäureketten und ihre Eigenschaften

Während die Kopfgruppen die Eigenschaften der Membranoberfläche bestimmen, geben die Fettsäureketten die Eigenschaften des hydrophoben Membranbereiches vor (**Abbildung 1 B**). Dieser Bereich ist zwischen 3 -5 nm dick (Jana Gallová et al., 2004). Die unterschiedliche Dicke resultiert aus der Länge und Sättigung der Fettsäureketten. Gesättigte Fettsäureketten (Alkansäuren) besitzen keine Doppelbindung und ragen somit weitgehend gerade in den inneren Bereich der Membran; sie bilden daher dicke Membranen (**Abbildung 1 A und C obere Fettsäure**). Ungesättigte Fettsäureketten (Alkensäuren) besitzen eine oder mehrere Doppelbindungen (**Abbildung 1 A und C**). Durch die ungeordnete Ausrichtung der Fettsäureketten ist die resultierende Membran daher dünner.

In natürlichen Fettsäuren kommt die Doppelbindung meistens in der *cis* - Konfiguration vor, wodurch ein Knick in der Kohlenwasserstoffkette von ungefähr 30° entsteht. Dadurch wird deren Schmelzpunkt verringert, die Van - der - Waals Wechselwirkungen zu anderen Molekülen werden abgeschwächt und sie brauchen sterisch mehr Platz als gesättigte Fettsäureketten. Fettsäuren werden ferner aufgrund ihrer Länge in niedere kurzkettige (bis 8 C - Atome), mittlere mittelkettige (8 - 12 C - Atome), höhere langkettige (13 - 21 C - Atome) oder sehr langkettige (mehr als 22 C - Atome) Fettsäuren unterteilt. Neben der Sättigung der Fettsäuren ist die Kettenlänge der Fettsäuren ein weiterer Parameter, der die Dicke einer Membran bestimmt.

Wie bereits erwähnt herrschen zwischen den Fettsäureketten geringe Anziehungskräfte in Form von Van - der - Waals Wechselwirkungen. Diese Wechselwirkungen entstehen in lateraler Richtung zwischen den nebeneinander liegenden Lipiden wie auch zwischen den beiden Membranhälften (*Monolayer* oder *Leaflets*).

1.1.5 Chemisch - physikalische Eigenschaften einer reinen Doppellipidmembran

Natürliche Membranen sind fluide; die Lipide befinden sich also nicht in einer festen Anordnung, sondern können lateral diffundieren. Die Diffusion wird durch die unterschiedlichen Kopfgruppen beeinflusst, die sich durch eventuelle Ladungen anziehen oder abstoßen, sowie durch die Anziehung der Fettsäureketten durch Van - der - Waals Kräfte. Das Zusammenspiel von abstoßenden und anziehenden sterischen oder elektrostatischen Kräften und den anziehenden Van - der - Waals Kräften definieren somit die Packung der Moleküle innerhalb einer Membran und auch die Struktur der Membran resultiert aus dieser Balance.

Gemäß der Brown'schen Molekularbewegung diffundieren die einzelnen Lipide im Schnitt in lateraler Richtung mit einer Geschwindigkeit von 10^7 Molekülen pro Sekunde (Platzwechsel von Lipidmolekülen) (Adam, Läuger, Stark, 2009). Der zufällige oder spontane Wechsel von Lipidmolekülen (*flip - flop*) von einem in das andere *Leaflet* ist prinzipiell möglich aber im Vergleich zur lateralen Diffusion von Lipiden sehr selten, da er nur alle 5 - 10 Stunden auftritt (Nakano, Fukuda, Kudo, Endo, & Handa, 2007; Wimley & Thompson, 1990).

Jedes Lipid hat eine spezifische Temperatur für den Phasenübergang zwischen seinem flüssigen und semikristallinen Zustand. Bei abnehmenden Temperaturen bleibt eine Membran solange fluide bis sich die Lipide bei ihrer jeweiligen Erstarrungstemperatur dicht aneinander packen (Phasenübergang) und sich dadurch die Membran verfestigt also semikristallin wird. Ungesättigte Lipide setzen die Erstarrungstemperatur einer Membran herab, da sie aufgrund ihrer sterischen Dimensionen nicht so eng gepackt werden können wie gesättigte Lipide.

Jedes Lipid nimmt aufgrund seiner sterischen und elektrostatischen Eigenschaften eine andere Fläche der Membranoberfläche ein. Diese liegt in ungeladenen Membranen bei ca. $40 \text{ \AA}^2 - 80 \text{ \AA}^2$ (Demel et al., 1975).

Während die Kopfgruppen zur Abschirmung des hydrophoben Bereiches sehr eng gepackt sind, halten die Fettsäureketten durch ihre sterischen Eigenschaften ein bestimmtes Membranvolumen aufrecht. Daher ist der Druck im Kopfgruppenbereich deutlich höher als im inneren der Membran. Sofern der Druck innerhalb der hydrophoben Membranregion (ca. 30 \AA dick) gleichverteilt ist, beträgt der laterale Druck im Membrankern ungefähr 350 atm. Da die zusammenziehende Oberflächenspannung jedes *Monolayers* in einem 5 \AA Bereich um die Grenze zwischen hydrophoben und hydrophilen Gruppen lokalisiert ist, ist hier ein Druck in einer Größenordnung von 1000 atm zu erwarten (Gullingsrud & Schulten, 2004). Aufgrund dessen besitzt jede Membran, je nach ihrer Zusammensetzung, ein bestimmtes Druckprofil. Druckverteilungen innerhalb einer Doppellipidmembran (*Bilayer*) sind dennoch schwer zu untersuchen und zu messen, obwohl es prinzipiell möglich ist (Templer, Castle, Curran,

Rumbles, & Klug, 1998). Die zugehörigen Berechnungen können auf verschiedenen Wegen durch beispielsweise die Molekularfeldtheorie (Xiang & Anderson, 1994), Modellierungen (Monte Carlo) vereinfachter Lipide (Cantor, 1997) oder mithilfe verschiedener Arten der MD - Simulationen (Goetz & Lipowsky, 1998; Lindahl & Edholm, 2000) durchgeführt werden (Gullingsrud & Schulten, 2004).

Verschiedene Lipide und deren Kopfgruppen können die Druckverteilung und die hier genannten Werte verschieben. Beispielsweise konnte mit MD Simulationen gezeigt werden, dass PC Kopfgruppen den lateralen Druck aus dem hydrophoben Kernbereich eher in die Region der Kopfgruppen verschieben. Lipide wie POPE und POPC verursachen einen deutlich höheren Druck im Grenzbereich zwischen dem hydrophilen und hydrophoben Bereich einer Membran (Gullingsrud & Schulten, 2004).

Neben der Druckverteilung innerhalb einer Membran ist auch die Membrandicke eine wichtige physikalische Eigenschaft von Membranen. Diese hängt in reinen Lipidmembranen, wie bereits erwähnt, von der Länge und Sättigung der Fettsäureketten ab. Um die Dicke einer Membran zu messen oder sie zu beschreiben muss die Dicke der Membran definiert werden. In der Literatur finden sich diverse Beschreibungen der Membrandicke, die mithilfe unterschiedlicher Messmethoden definiert wurden. Dabei existiert die Membrandicke D_C welche ohne eingelagerte Wassermoleküle in der Kopfgruppenregion meist über die Kettenlänge definiert und bestimmt wird. Sie wird genutzt, um beispielsweise den Effekt eines hydrophoben *Mismatch* zu beschreiben (Harroun, Heller, Weiss, Yang, & Huang, 1999). Die Membrandicke D_H wird wiederum mit Wassermolekülen in der Kopfgruppenregion bestimmt und ist somit abhängig von der Kopfgruppen Konformation, den thermodynamischen Eigenschaften der Membran und anderen sterischen Faktoren (Norbert Kucerka et al., 2008; Worcester & Franks, 1976). Des Weiteren kann die Membrandicke über Kleinwinkelstreuexperimente (*X-ray scattering*) und Neutronen - Reflektrometrie bestimmt werden. Während die Neutronen - Reflektrometrie die gesamte Dicke der Membran (D_B ; Luzzati - Dicke) misst, indem sie zwischen den protonierten Lipiden und deuterierten Wassermolekülen differenzieren kann (Luzzati & Husson, 1962), kann man mittels Röntgen - Kleinwinkelstreuung den Abstand der Phosphatgruppen der Kopfgruppen jedes *Monolayers* messen (D_{HH}) (Kučerka et al., 2008). Da diese Membrandickenbeschreibung die verbreitetste ist, wird sie im Folgenden verwendet.

1.2 Membranproteine

Doppellipidmembranen existieren in allen Lebensformen. Während sie auf der einen Seite jede Zelle umgeben und somit Zellmembranen genannt werden, umschließen sie, im Falle von eukaryotischen Zellen, auch diverse intrazelluläre Organellen. Dies hat zur Folge, dass intrazelluläre Reaktionsräume geschaffen werden und inkompatible Reaktionen parallel ablaufen können. Des Weiteren dienen Membranen als Umgebung und / oder als Verankerungsmöglichkeit diverser Proteine.

Üben Proteine ihre Funktion an oder in einer Membran aus, werden sie als Membranproteine bezeichnet und bestimmen ein Stück weit die Funktion der Membran oder des Membranabschnittes, in dem sie sich befinden. Es gibt verschiedene Arten an Membranproteinen, die in zwei verschiedene Kategorien eingeteilt werden können; periphere und integrale Membranproteine (**Abbildung 6**).

Periphere Membranproteine liegen entweder nur an den Kopfgruppen der Membranlipide an, interagieren mit integralen Membranproteinen oder sind durch sogenannte Lipidanker an der Membran befestigt (**Abbildung 6 links**). Integrale Membranproteine hingegen sind in der Membran eingebettet. Sie können komplett in die Membran integriert sein, der Großteil von ihnen durchspannt jedoch die Membran und werden somit auch als Transmembranproteine bezeichnet (**Abbildung 6 rechts**).

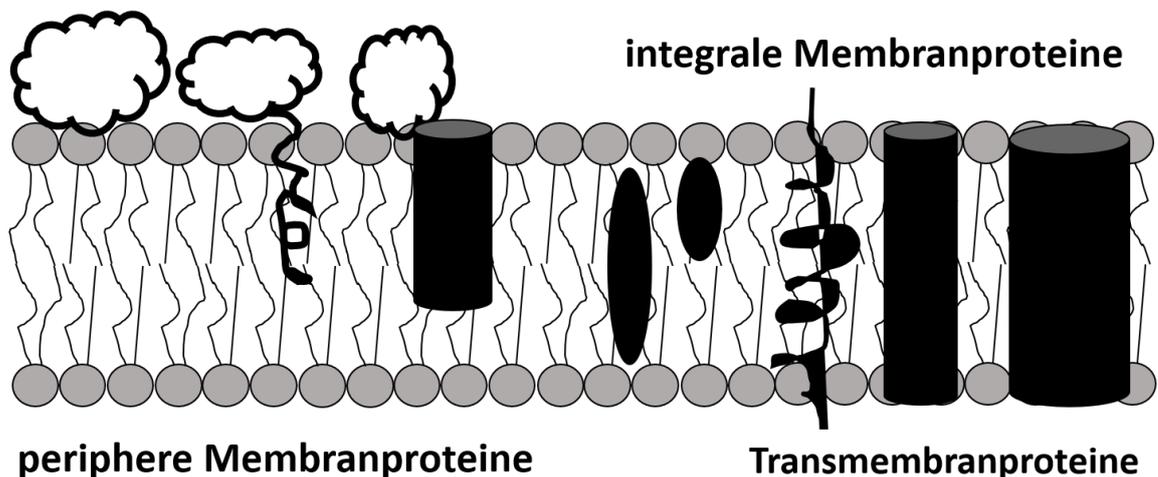


Abbildung 6: Schematische Darstellung diverser Membranproteine. Während sich periphere Membranproteine außerhalb der Membran befinden, aber auf diverse Arten mit ihr interagieren, liegen integrale und im speziellen integrale Transmembranproteine in der Membran vor und durchspannen diese.

Ist ein Protein in die Membran integriert muss es aufgrund der Membraneigenschaften einen hydrophoben Teil besitzen, der sich in den hydrophoben Kern der Membran einlagern kann. Dieser hydrophobe Teil (Transmembrandomäne) wird meistens aus einer oder mehreren hydrophoben α -Helices gebildet, während die aus der Membran ragenden Proteinanteile hydrophile Eigenschaften besitzen müssen. Einige integrale Membranproteine durchspannen aufgrund ihrer geringen Größe gerade so die Membran; andere wiederum besitzen große hydrophile Domänen, die in den Intra- oder Extrazellularraum ragen.

1.2.1 Transportproteine

Es gibt eine hohe Anzahl an verschiedenen transmembranen Transportproteinen (Singer & Nicolson, 1972). Transportproteine bestimmen in ihrer näheren Membranumgebung den Informations- sowie den Stoffaustausch über die Membran. Lässt man den Aspekt des Informationstransportes außer Acht, sind Transportproteine für die Permeabilität und Selektivität ihrer Membranumgebung zuständig.

Natürliche Membranen sind, wie bereits erwähnt, nicht vollständig undurchlässig, sondern stellen eine semipermeable Abgrenzung zur jeweiligen Umgebung dar (Hunte & Richers, 2008). Für Wasser und kleine ungeladene Moleküle und Substanzen sind Membranen permeabel, während für den Austausch von größeren Molekülen oder geladenen Teilchen alternative Wege über die Membran in Form von Transportproteinen benötigt werden (Ashcroft, 2000). Diese Semipermeabilität ist für die Signalübermittlung zwischen inneren und äußeren Kompartimenten und einem definierten Stoffaustausch zwischen ihnen unabdingbar.

Transportproteine können je nach ihrer Funktionsweise ihr spezifisches Substrat aktiv oder passiv über die Membran schleusen (Adam, Läger, Stark, 2009).

Als Beispiel für einen primär aktiven Transporter kann die Natrium- / Kaliumpumpe oder genauer Natrium-Kalium-ATPase in tierischen Zellen angesehen werden, die zur gleichen Zeit drei Na^+ Ionen aus der Zelle, sowie zwei K^+ - Ionen in die Zelle transportiert und somit netto eine positive Überschussladung aus dem Cytoplasma in den Extrazellularraum verschiebt. Sie besitzt somit die Eigenschaft unter Energieverbrauch gelöste Stoffe auch entgegen ihres Konzentrationsgefälles über die Membran zu transportieren. Durch solche Ladungsverschiebungen und elektrochemischen Gradienten können weitere Transportproteine in Form des sekundär aktiven Transports als Uniporter, Symporter und Antiporter ihr spezifisches Substrat über die Membran transportieren. Kanalproteine hingegen transportieren ihr Substrat ausschließlich passiv entlang dessen elektrochemischen Gradienten über die Membran.

Da Zellmembranen nicht nur durch Osmose und Membranproteine, sondern ebenso durch Endo- und Exozytose Stoffe über die Membran transportieren, entstehen Ungleichverteilungen von Molekülen, Stoffen und Ionen zwischen den inneren und äußeren Kompartimenten. Diese Ungleichverteilung führt zu einem elektrochemischen Gradienten. Neben dem chemischen Gradienten beeinflusst die elektrische Potentialdifferenz, bei der das extrazelluläre Potential als Bezugspunkt gewählt ist, den Transport aller elektrisch geladenen Substanzen. Die aus der Potentialdifferenz resultierende elektrische Spannung U (auch Membranpotential oder Transmembranspannung genannt) ist meist negativ und liegt in tierischen Zellen zwischen -50 mV und -70 mV und wird im Wesentlichen durch den K^+ Gradienten und die kaliumselektiven Kanäle bestimmt. Bei Pflanzen kann die Membranspannung wesentlich negativer sein und Werte von bis zu -300 mV aufweisen.

Diese Potentialgenerierungen entsprechen dem Aufladen eines Kondensators, wonach eine Plasmamembran näherungsweise als elektrischer Plattenkondensator modelliert werden kann (Adam, Läuger, Stark, 2009).

1.2.1.1 Ionenkanäle

Jedes Transportprotein ist mehr oder weniger substratspezifisch. Daher sind geladene Teilchen wie Ionen auf für sie ausgelegte Ionenkanäle angewiesen, um eine natürliche Doppelmembran zu überqueren.

Dabei können Ionenkanäle unspezifisch geladene Teilchen über die Membran schleusen oder aber zwischen verschiedenen Ionen diskriminieren. Ionenkanäle werden anhand ihrer Selektivität benannt. Daher gibt es neben unselektiven Kationenkanälen vor allem selektive Kanäle wie bspw. Calciumkanäle oder Kaliumkanäle.

Wie anhand **Abbildung 7** zu erkennen, können Ionen durch für sie ausgelegte Ionenkanäle mit einer Geschwindigkeit überwinden, die annähernd ihrer Diffusionsgeschwindigkeit in Wasser entspricht, da die Übergangsenergie durch das Kanalprotein stark verringert wird und nur noch 2-3 kcal/mol entspricht (**Abbildung 7 B**). Sie können somit eine Durchtrittsgeschwindigkeit von ca. 10^7 Ionen pro Sekunde erreichen (Sansom et al., 2002). Der Ionenfluss eines geöffneten Kanals folgt dabei dem elektrochemischen Konzentrationsgefälle des jeweilig transportierten Ions. Würde ein Ion ohne Ionenkanal die Membran überqueren müssten ca. 50 kcal/mol aufgebracht werden und der Übertritt würde nur alle 10^{16} Jahre vonstattengehen.

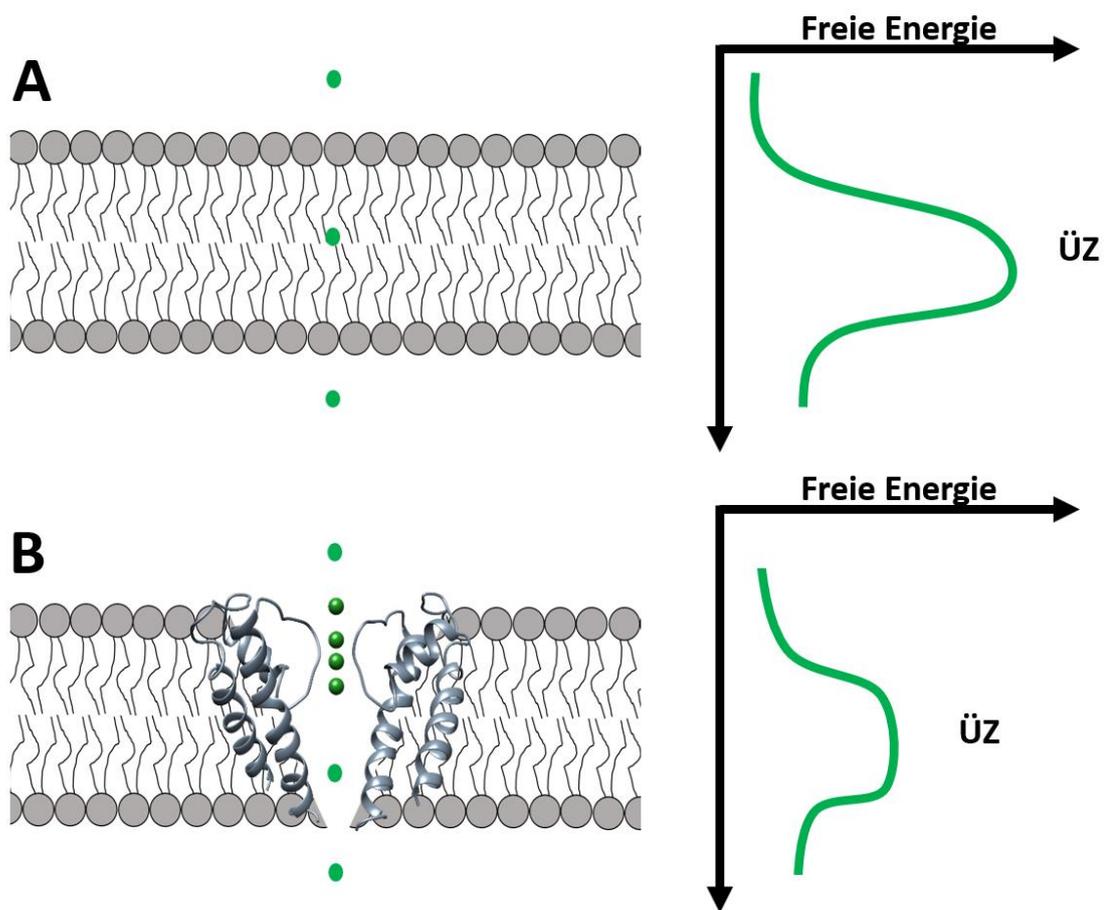


Abbildung 7: Ionenkanäle verringern die freie Energie, die für den Übertritt eines Ions über eine biologische Membran nötig ist und können somit als Katalysatoren angesehen werden. A Der Durchgang eines geladenen Teilchens durch einen *Bilayer* benötigt einen hohen Energieaufwand. **B** Ein Ionenkanal, der für das geladene Teilchen passierbar ist, katalysiert den Übertritt und senkt den benötigten Energieaufwand.

Für die notwendige Steuerung des Ionenflusses über die Membran ist es unabdingbar, dass Ionenkanäle den Ionenstrom durch ihre Pore unterbrechen können. Dieses Öffnen und Schließen der Pore ist durch eine Konformationsänderung des Proteins bedingt und wird als *Gating* bezeichnet. Das *Gating* ist ein stochastischer Prozess und kann von äußeren chemischen oder physikalischen Einflüssen wie Liganden, pH-Änderungen, Temperatur, Spannung oder sogar durch mechanische Konformationsänderungen moduliert werden (Hille, 2001).

Aufgrund ihrer Vielfältigkeit und Häufigkeit ist es nicht verwunderlich, dass Ionenkanäle für einen funktionierenden Organismus notwendig sind und einige Krankheiten und Fehlfunktionen des Körpers auf sie zurückgeführt werden. Beispiele hierfür sind neonataler Diabetes oder Herzrhythmusstörungen, welche daher auch Channelopathien genannt werden (Ashcroft, 2006).

1.3 Protein-Lipid-Interaktionen

Anhand der vorangegangenen Kapitel wird deutlich das die Funktion einer Membran von den Eigenschaften der einzelnen Komponenten wie Lipiden und Proteinen und somit auch ihrer Selektivität durch Transportproteine abhängig ist. Hierbei spielen die Lipidzusammensetzung, die Einlagerung von Sterolen und die Art von Membranproteinen ausschlaggebende Rollen.

Da verschiedene Membranen und Membranbereiche für verschiedene zelluläre Aufgaben zuständig sind, sind Lipide und auch Membranproteine nicht homogen über eine Membran verteilt, sondern lagern sich in bestimmten Membranbereichen zusammen, um gemeinsam einer definierten Funktion nachzukommen.

Diese Mikrodomänen werden *Lipid - Rafts* genannt und sind heterogene sowie durch freie Diffusion von Lipiden und Sterolen in einer Membran bedingte hoch dynamische Domänen einer Lipidmembran (Pike, 2006). Sie können beispielsweise höhere Konzentrationen an Cholesterol oder Sphingolipiden sowie bestimmte Signallipide beinhalten. Ebenso definieren die teilhabenden Lipide durch ihre Eigenschaften die Membrandicke, sowie den lateralen Druck, den wiederum andere Proteine für ihre korrekte Funktion benötigen (Brown & London, 2000; Q. X. Jiang & Gonen, 2012; Korade & Kenworthy, 2008; Rietveld & Simons, 1998; Simons & Ikonen, 1997). *Lipid - Rafts* definieren somit lokal die physikalischen Eigenschaften eines Membranabschnittes (Brown & London, 2000) und können daher distinkte Membranbereiche für Vorgänge wie beispielsweise Signaltransduktion oder Stofftransport bilden (Brown & London, 1998; Rietveld & Simons, 1998; Simons & Toomre, 2000).

Es gibt Studien, dass Cholesterol maßgeblich an der Bildung von *Lipid - Rafts* beteiligt ist (Pike, 2009; Silvius, 2003; Simons & Ikonen, 1997). Jedoch ist immer noch unklar ob Proteine sich in für sie geeignete Membranumgebungen einbauen, oder in welchem Maße sie ebenso für die Bildung dieser Domänen mit verantwortlich sind.

Die Funktion eines Membranabschnitts ist somit die Folge eines engen Zusammenspiels von Lipiden und Proteinen. Dieses Zusammenspiel kommt durch direkte Bindungsvorgänge zwischen Lipiden und Proteinen, Protein - Proteinbindungen und den physikalischen Eigenschaften dieser Membranbereiche zustande. Beispielsweise ist die Membrandicke ein bestimmender physikalischer Faktor (Tillman & Cascio, 2003; Yuan, O'Connell, Feinberg-Zadek, Johnston, & Treistman, 2004). Diese kann in Zusammenhang mit Membranproteinen zu einem positiven oder negativen *hydrophobic Mismatch* führen, welcher in den meisten Fällen jedoch durch Protein-Lipid-Interaktionen verhindert wird (**Abbildung 8**) (Hertel et al., 2006; Killian, 1998, 2003; Kim et al., 2012). Ein positiver *Mismatch* bedeutet, dass die Membran um die Proteine herum dicker ist (**Abbildung 8 B**), während ein negativer *Mismatch* bedeutet, dass

Proteine länger sind als der Membrandurchmesser (**Abbildung 8 B**). Proteine können sich auf verschiedene Arten vor einem solchen *Mismatch* schützen. Zum Beispiel können sie die Membran oder ihr eigenes Proteinrückgrad deformieren, was in Funktionsänderungen des Proteins resultieren kann. Eine Aggregation mehrerer Proteine kann diesen Effekt abschwächen. In extremen Fällen kann die Dicke der Membran auch den Einbau der Proteine verhindern (de Planque & Killian, 2003; Killian, 1998).

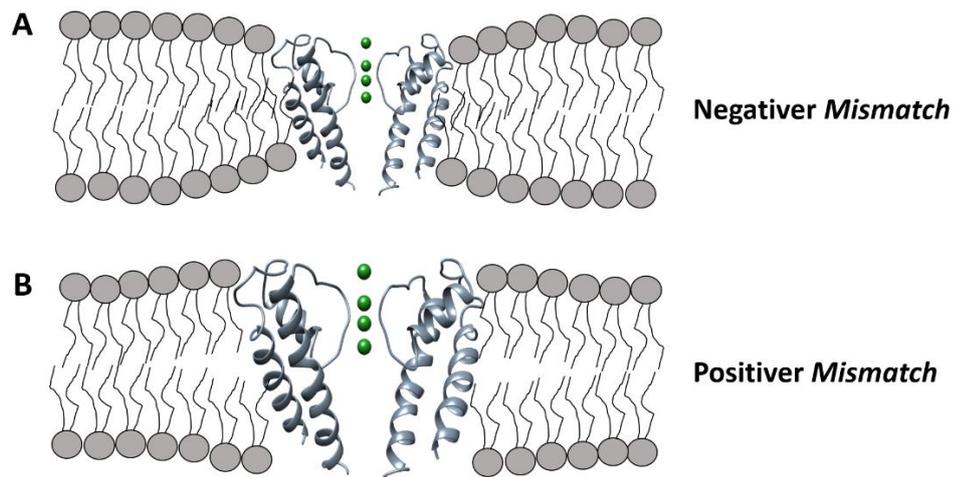


Abbildung 8: Ionenkanäle können durch ihren Einbau in eine Membran einen negativen (A) oder positiven *Mismatch* (B) bedingen.

Das angesprochene Zusammenspiel von Proteinen und Lipiden ist nicht nur von den physikalischen Eigenschaften einer Membran abhängig, sondern kann auch ganz spezifisch über direkte Interaktionen oder sogar Bindungen zwischen Proteinen und Lipiden zurückzuführen sein.

Beispielsweise können anionische Lipide wie PIP_2 die Funktion von Ionenkanälen und anderen Proteinen direkt beeinflussen. Durch die Bindung von PIP_2 an zum Beispiel Ionenkanäle, kann es zu Ladungsverschiebungen an der Proteinoberfläche kommen. Des Weiteren kann PIP_2 als Ligand fungieren und direkt an spezifischen Bindestellen von Kanaluntereinheiten binden (Hansen, 2015). In jedem Fall kann die Aktivität von Ionenkanälen durch PIP_2 , maßgeblich verändert werden (Huang, Feng, & Hilgemann, 1998).

Auch der bakterielle Modellkanal KcsA interagiert mit den Lipiden seiner umgebenden Membran. Anhand der Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass sich ein Lipid pro Monomer in eine Lücke zwischen zwei Monomeren an das tetramere Protein anlagert. Diese Bindung zwischen den transmembranen α - Helices scheint wichtig für das *Gating* des Kanals sein, da die Bewegung dieser Transmembrandomäne in den *Gating* - Vorgang involviert ist (Valiyaveetil, Zhou, & MacKinnon, 2002). Es wird dennoch stark diskutiert ob dieses gebundene

Lipid wie bisher angenommen eine negative Ladung tragen muss oder nicht. Während diverse Studien zeigen, dass anionische Lipide essentiell für die Öffnung des Kanals sind (Heginbotham, Kolmakova-Partensky, & Miller, 1998; Valiyaveetil et al., 2002), zeigten andere wiederum dass anionische Lipide dafür nicht ausschlaggebend sind, sondern vielmehr die physikalischen Eigenschaften der Membran in Form des lateralen Drucks und der Membrankrümmung (McGuire & Blunck, 2015). Durch eigene Messungen und Erfahrungen (Kapitel 3.2.1.2) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass KcsA in neutralen Membranen funktionsfähig ist, jedoch scheint die Anwesenheit von anionischen Lipiden den Kanal zu stabilisieren, sodass das *Gating* des Kanals konsistenter ist (Winterstein et al., 2018).

Einige weitere wichtige Kanalproteine wie beispielsweise die Kir-Kanäle (*inward rectifying*) sind für ihre Funktion auf multivalent anionische Lipide wie PIP₂ angewiesen, da sie spezifische PIP₂ Bindestellen besitzen (Kir_{2.2}). Dabei bedeckt das Glycerol Rückgrat und das 1' - Phosphat die erste Transmembrandomäne. Ebenso kommt es zur Anlagerung des 5' - Phosphates am entfernten Ende der zweiten Transmembranhelix. Daraus resultiert eine Konformationsänderung im Kanal (Hansen, 2015).

Nicht nur Lipide wie PIP₂, sondern auch Sterole wie Cholesterol können direkte Auswirkungen auf Ionenkanäle haben (Singh, Shentu, Enkvetchakul, & Levitan, 2011), dessen Funktion konzentrationsabhängig beeinflussen oder gar erst ermöglichen (Levitan, Singh, & Rosenhouse-Dantsker, 2014). Diverse Studien zeigen, dass manche Ionenkanäle Cholesterol - Bindestellen besitzen (Levitan et al., 2014; Singh et al., 2011). Dabei kann Cholesterol zu einer erhöhten Aktivität (Bukiya, Durdagi, Noskov, & Rosenhouse-Dantsker, 2017; Bukiya et al., 2015) aber auch zu einer Beeinträchtigung der Funktion führen (Dart, 2010; Levitan, Fang, Rosenhouse-Dantsker, & Romanenko, 2010). Während es zu spezifischen direkten Interaktionen zwischen Proteinen und Cholesterol kommen kann (Marsh & Barrantes, 1978) ist Cholesterol ebenso in der Lage Protein-Protein-Interaktionen zu induzieren (Levitan et al., 2010), beispielsweise Dephosphorylierungen durch Phosphatasen oder enzymatische Vorgänge. Sie können nicht nur durch Sterole, sondern auch durch anderen Lipide vermittelt oder induziert werden. Ein Beispiel hierfür ist die Proteinkinase C, welche durch die Bindung der Hydroxylgruppe des Lipids DAG und intrazellulärem Calcium aktiviert wird und somit Proteine unter Energieverbrauch phosphoryliert (Steinberg, 2008).

Um die Funktion von Membranen und die zugrundeliegenden Protein-Lipid-Interaktionen untersuchen zu können eignen sich Transportproteine hervorragend, da ihre Funktion sehr leicht an ihrer Transportrate gemessen werden kann. Besonders geeignet sind dafür

Ionenkanäle, da der Ionenfluss als Strom mit einfachen Mitteln im Labor gemessen werden kann. Da Kaliumkanäle bisher die mit am gründlichsten studierten Ionenkanäle mit hoher Selektivität und verschiedenen *Gating* - Mechanismen sind, bieten sie sich an, um anhand ihrer Funktionsveränderungen eventuelle Protein-Lipid-Interaktionen zu analysieren. Des Weiteren kommen sie in allen bekannten Lebensformen vor und bieten daher eine große Auswahl an zu untersuchenden Proteinen (MacKinnon, 2003).

1.4 Kaliumkanäle

Die einfachste und grundlegende Struktur jedes Kaliumkanals ist das sogenannte Porenmodul (**Abbildung 9 A** links oben) (Choe, 2002). Es besteht aus zwei Transmembrandomänen (TM1 und TM2) und dem Porenloop, welcher die Porenhelix (blau) sowie die Filterregion (orange) enthält (**Abbildung 9 A**). Beide Transmembrandomänen sind α -helikale hydrophobe Strukturen und sind daher komplett in die Membran eingebettet. Die Filterregion besitzt ein hoch konserviertes Aminosäure-Motiv TXXTXGY/FG (X steht für jede beliebige Aminosäure), die Signatursequenz eines Kaliumkanals (Heginbotham, Lu, Abramson, & MacKinnon, 1994). Durch Zusammenlagerung von vier solcher Porenmodule entsteht eine wassergefüllte Pore (Morais-Cabral, Zhou, & MacKinnon, 2001). Die Pore enthält die *Cavity* und den Selektivitätsfilter (Filter) (**Abbildung 9 B**), letzterer wird durch die jeweiligen Filterregionen der Porendomänen gebildet (Roux & MacKinnon, 1999; Sansom et al., 2002). Hierbei selektiert der entstandene Selektivitätsfilter den Ionenfluss und ist in der Lage zwischen verschiedenen Ionensorten zu diskriminieren. Funktionale Kaliumkanäle entstehen durch das Zusammenlagern von vier (Tetramer) Porenmodulen (Untereinheiten), welche meistens identisch sind. Die zur Pore zeigende Transmembrandomäne (TM) wird innere, die in die Lipidumgebung ragende, wird äußere Transmembrandomäne genannt. Hierbei stabilisiert die äußere TM das gesamte Protein.

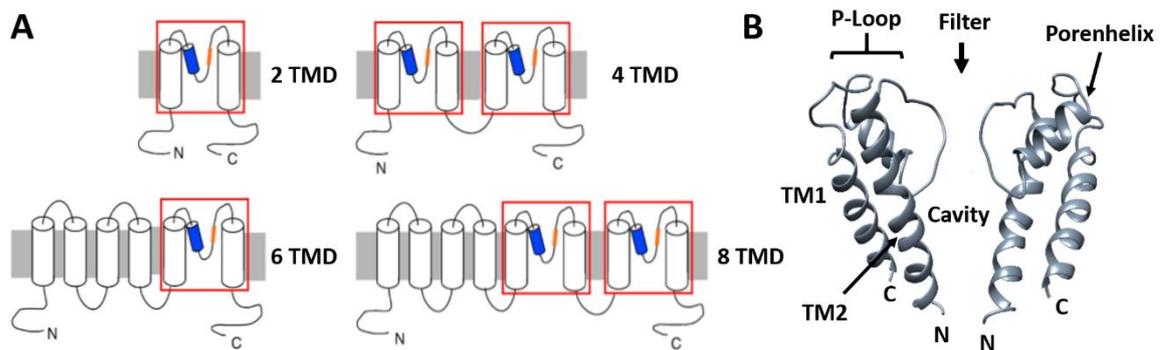


Abbildung 9: Aufbau verschiedener Kaliumkanäle. A Vier verschiedene Hauptklassen von Kaliumkanal - Untereinheiten mit einem oder mehreren Porendomänen (Thiel et al. Baumeister 2011). B Schematische Darstellung des Porenmoduls am Homologiemodell zweier Untereinheiten (Porendomänen) des KcV_{NTS} . Zur Erstellung des Modells wurde das Programm Swissmodel (Arnold, Bordoli, Kopp, & Schwede, 2006) unter der Verwendung der strukturellen Daten von $KirBac_{1.1}$ genutzt (Kuo et al., 2003).

Je nach dem Aufbau ihrer Porendomänen oder Untereinheiten unterteilt man Kaliumkanäle, wie in **Abbildung 9 A** abgebildet, in vier unterschiedliche Hauptklassen (Sansom et al., 2002).

Während die einfachsten Untereinheiten eines Kaliumkanals nur aus einer Porendomäne bestehen und Tetramere bilden, existieren auch Untereinheiten die zwei Porendomänen pro Untereinheit besitzen und durch eine Dimerisierung eine pseudotetramere Porenstruktur erzeugen. Des Weiteren können an die äußere TM vier zusätzliche Transmembrandomänen gebunden sein (**Abbildung 9 A**).

Beispielsweise dient die vierte Transmembrandomäne (aus vielen positiv geladenen Aminosäuren) in der Familie von spannungsabhängigen Kanälen (Kv - Kanälen) wie beispielsweise beim sogenannten *Shaker* - Kanal als Spannungssensor (Long, Campbell, & Mackinnon, 2005). Hierbei kommt es durch die Änderung der Membranspannung zu einer Konformationsänderung des Proteins und als Folge dessen zu einem Öffnen oder Schließen (*Gating*) der Pore (Yellen, 2002). Das *Gating* kann durch diverse Strukturen (*Gates*) in einer Kanalpore ermöglicht und beeinflusst werden und wird daher im folgenden Kapitel näher beschrieben.

Ebenso ist es möglich den Stromfluss durch einen Kaliumkanal zu blockieren. Ein typischer und sehr effektiver Kaliumkanalblocker ist Barium, welches den Ionenfluss von beiden Seiten aus blockieren kann (Armstrong & Taylor, 1980). Bariumionen ($1,35 \text{ \AA}$) haben zwar einen sehr ähnlichen Ionenradius wie Kaliumionen ($1,33 \text{ \AA}$), sind jedoch zweifach geladen (Ba^{2+}). Sie sind

demnach in der Lage in den Selektivitätsfilter zu gelangen, verweilen aufgrund stärkerer Bindung dort jedoch länger als Kaliumionen, was zu einer Unterbindung des Stromflusses führt (Y. Jiang & MacKinnon, 2000).

1.4.1 *Gating* - Mechanismen

Das Öffnen und Schließen bzw. der Wechsel zwischen leitfähigem und nicht - leitfähigem Zustand eines Kanals wird als *Gating* bezeichnet (Ashcroft, 2000) und kann auf Änderungen der Kanalkonformation zurückgeführt werden (Hille, 2001). Bisher sind drei *Gating* - Mechanismen bekannt, wovon der eine im intrazellulären *Gate* und der andere im Selektivitätsfilter - *Gate* lokalisiert ist (Yellen, 1998). Ferner existiert ein weiterer Mechanismus, der den Ionenstrom unterbrechen und somit regeln kann: die sogenannte N - Typ Inaktivierung. Das intrazelluläre *Gate* oder *bundlecrossing Gate* wird von den sich überkreuzenden inneren Transmembrandomänen (TM2) gebildet und liegt somit am cytosolischen Poreneingang (Sansom et al., 2002).

Das Selektivitätsfilter - *Gate* ist für verschiedene *Gating* - Mechanismen bekannt. Hierzu gehören die C - Typ Inaktivierung bei spannungsgesteuerten Kaliumkanälen, welche durch Konformationsänderungen am Filter und am extrazellulären Poreneingang bestimmt wird (Choi, Aldrich, & Yellen, 1991; Hoshi, Zagotta, & Aldrich, 1990; Kurata & Fedida, 2006). Ebenso wird das sogenannte *Flicker-Gating* auf den Selektivitätsfilter zurückgeführt (Schroeder & Hansen, 2007), was beispielsweise am $K_{CV_{PBCV-1}}$ gezeigt werden konnte (Gazzarrini, Abenavoli, Gradmann, Thiel, & Moroni, 2006). Beim *Flicker-Gating* handelt es sich um ein sehr schnelles *Gating* mit hoher Frequenz, im μs - Bereich (Abenavoli et al., 2009). Es ist wahrscheinlich auf eine K^+ - Verarmung in der Filterregion zurückzuführen (Schroeder & Hansen, 2007) (Rauh, 2018).

Die angesprochene N - Typ Inaktivierung ist ein schneller Inaktivierungsmechanismus, für den eine N - terminale Proteindomäne verantwortlich ist. Sie dringt in den cytosolischen Poreneingang ein und verhindert den Ionenstrom (nach Öffnung des intrazellulären *Gates*). Diese Proteindomäne besteht aus einer Ansammlung hydrophober und positiv geladener bzw. hydrophiler Aminosäuren und ist über eine flexible Aminosäure - Kette mit dem zytoplasmatischen Teil des Kanals verbunden (Gulbis, Zhou, Mann, & MacKinnon, 2000; Hoshi et al., 1990; Zagotta, Hoshi, & Aldrich, 1990). Diese Struktur gibt dieser Art von Inaktivierung einen weiteren Namen, die *ball and chain* - Inaktivierung.

1.5 Virale Kaliumkanäle

Ebenso wie Prokaryoten und Eukaryoten Kaliumkanäle besitzen, sind auch Sequenzen in der DNS von algenbefallenden dsDNA Viren enthalten, welche für Kaliumkanäle kodieren (Hille, 2001) (Tayefeh et al., 2009). Im Gegensatz zu bakteriellen oder humanen Kaliumkanälen sind diese viralen Kaliumkanäle sehr klein und bestehen meist nur aus weniger als 400 Aminosäuren, wobei jede der vier Untereinheiten (Homotetramere) für gewöhnlich weniger als 100 AS besitzt. Wie bei anderen Kaliumkanälen beinhaltet der Porenloop zwischen den zwei Transmembrandomänen die Porenhelix und die sogenannte Signatursequenz (TXXTXGY/FG, wobei X für jede beliebige Aminosäure stehen kann (Heginbotham et al., 1994), die für die Kaliumselektivität verantwortlich ist (Thiel et al., 2011).

Virale Kaliumkanäle repräsentieren aufgrund ihrer reduzierten Struktur ausschließlich das Porenmodul von komplexeren pro- oder eukaryotischen Kaliumkanälen und besitzen zudem keine cytosolischen Domänen am C - oder N - Terminus (**Abbildung 10**) (Plugge et al., 2000; Thiel et al., 2011). Trotz ihrer geringen Größe sind sie vollkommen funktionsfähige Kaliumkanäle, die eine hohe Selektivität für Kalium besitzen und ebenso wie andere Kaliumkanäle durch Barium blockierbar sind (Braun, Lachnit, et al., 2014; Gazzarrini et al., 2009; Rauh et al., 2017; Siotto et al., 2014).

Durch diesen minimalistischen Aufbau sind virale Kaliumkanäle nahezu vollkommen in die Lipidmembran eingebettet und eignen sich daher hervorragend für die Untersuchung von Protein-Lipid-Interaktionen (**Abbildung 10**) (Braun, Lachnit, et al., 2014).

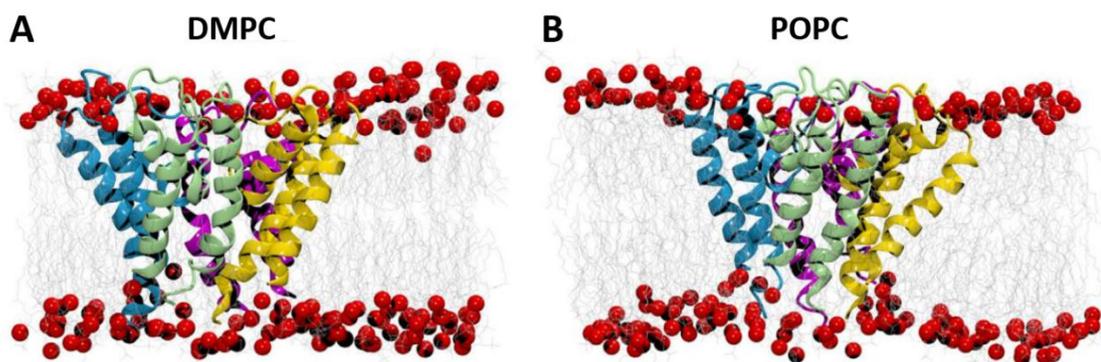


Abbildung 10: MD-Simulation des viralen Kaliumkanals Kcv_{ATCV-1} in DMPC (A) und POPC Membranen (B). Die Monomere des Kcv_{ATCV-1} sind aufgrund besserer Übersicht verschiedenfarbig dargestellt (Braun, Lachnit, et al., 2014).

In dieser Arbeit wurden drei virale Kaliumkanäle der Familie der Phycodnaviren verwendet (Plugge et al., 2000). Es wurden jedoch bereits mehr als 80 unterschiedliche Kaliumkanalsequenzen in Phycodnaviren ermittelt (Gazzarrini et al., 2009; Hamacher et al., 2012; Kang, Graves, et al., 2004; Kang, Moroni, et al., 2004) (**Abbildung 11**).

```

Kesv      MSRRLFATCGIAIALRGLVVS GGVEIVSFRPLIDTSLVGGILSNLILLVVF AELYWQLD 60
PBCV1     -----MLVFSKFLTR--TEPFMIHLFILAMFVMIYKFFP 32
KcvS      -----MLLLLIHVGIILVFFTTVYKMLP 22
ATCV1     -----MLLLIIHIIILIVFTAIYKMLP 22
KcvNTS    -----MLLLIIHLSILVIFTAIYKMLP 22
          :: :: :* .* :* :

Kesv      QGDDH--THFG---FSSAIDAYFS AVTSSSVGYGDLLPKTPKAKLLTIAHILAMFFVMLPVVAKALEK 124
PBCV1     GGFENNFVANPDKKASWIDCIYFGVTHTSTVGF GDILPKTTGAKLCTIAHIVTVFFIVLTL----- 94
KcvS      GGMFS---NT----DPSWVDCLYFSASTHTTVGYGD LTPKSPVAKLVATAHMMIVFAIVVSSFTFPW-- 82
ATCV1     GGMFS---NT----DPTWVDCLYFSASTHTTVGYGD LTPKSPVAKLTATAHMLIVFAIVISGFTFPW-- 82
KcvNTS    GGMFS---NT----DPTWVDCLYFSASTHTTVGYGD LTPKSPVAKLTATAHMLIVFAIVISGFTFPW-- 82
          *          : :* . **.. * : **:**: ** : *** : *** : * ::

```

Abbildung 11: Sequenzalignment diverser viraler Kaliumkanäle. Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW2Ω erstellt. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern, konservative Aminosäureunterschiede mit einem Doppelpunkt und semikonservative Aminosäureunterschiede mit einem Punkt kenntlich gemacht.

Einige Vertreter dieser Familie befallen Chlorellaalgen, die wiederum mit anderen Ein- oder Mehrzellern in Symbiose leben (Van Etten, Lane, & Dunigan, 2010). Aufgrund des Wirtes werden die zugehörigen Kaliumkanäle Kcv - Kanäle (K^+ channel *chlorella virus*) genannt (Kang, Graves, et al., 2004; Kang, Moroni, et al., 2004). Trotz ihrer geringen sequenziellen Unterschiede (**Abbildung 11**) weisen diese Kanäle unterschiedliche Funktionsweisen, sowie unterschiedliches Sortierungsverhalten auf (Balss et al., 2008).

Die viralen Kaliumkanäle Kcv_{Next-to-Smith} (Kcv_{NTS}) und Kcv_{Smith} (Kcv_S) gehören beide zur Familie der ATCV - ähnlichen Phycodnaviren die Chlorellaalgen befallen. Sie wurden aus dem Smith Lake (Kcv_S) und einem in der Nähe liegenden Gewässer (Kcv_{NTS}) isoliert, die für ihre Namensgebung verantwortlich waren (Greiner, 2011).

Beide Kanäle sind Homotetramere (**Abbildung 12 A**), bestehen aus nur 82 AS pro Monomer und unterscheiden sich in nur elf Aminosäuren voneinander, was eine Ähnlichkeit von fast 90% bedeutet (**Abbildung 12 C**).

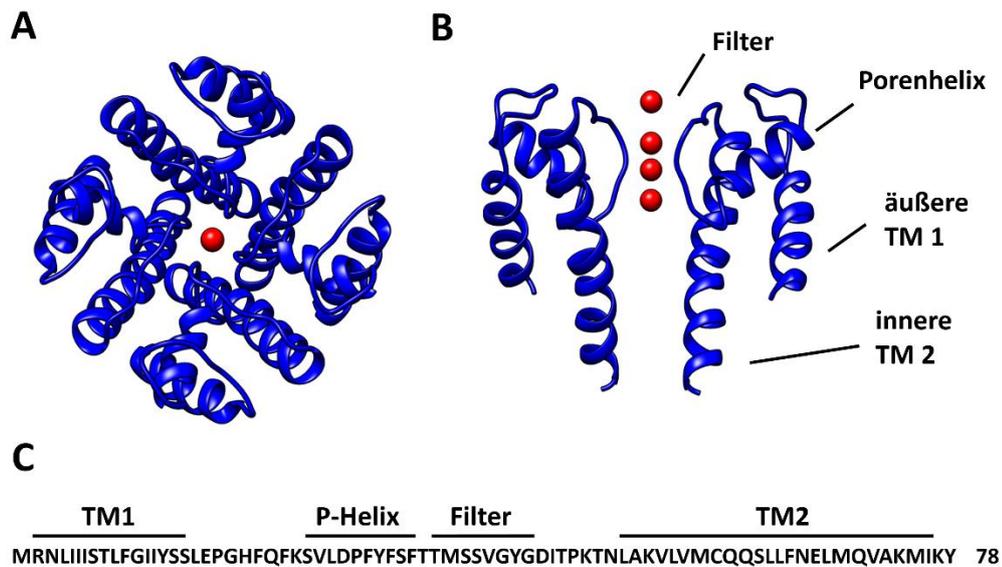


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Aufbaus des viralen Kaliumkanals Kmpv_{12T} sowie seine Aminosäuresequenz. **A** Abbildung eines Homotetramers mit Kaliumion in der Pore (rot). **B** Seitenansicht auf zwei der vier Untereinheiten mit Kaliumionen in der Pore. Zu erkennen ist hier der Porenloop (Turretloop) mit dem Selektivitätsfilter. Die Bilder wurden mithilfe der Aminosäuresequenz und dem Programm Swissmodel (Arnold et al., 2006) unter der Verwendung der Strukturdaten von KirBac_{1.1} (Kuo et al., 2003) erstellt. **C** Aminosäuresequenz des Kmpv_{12T}. Über der Sequenz ist die Lokalisierung der äußeren Transmembrandomäne (TM1), der inneren Transmembrandomäne (TM2), der Poren - Helix (Poren-Helix) und des Selektivitätsfilters (Filter) markiert. Die Vorhersage der Sekundärstruktur wurde mit dem Vorhersage - Algorithmus Jpred4 durchgeführt.

In dieser Arbeit werden die Auswirkungen diverser Phosphocholine, Cholesterol und anionischer Lipide auf diese drei viralen Kaliumkanäle untersucht. Dabei hat sich unter anderem gezeigt, dass Ionenkanäle prinzipiell in der Lage sind sich ihre Lipidumgebung selbst zu schaffen und dass Membranveränderungen auf Kanäle die gleichen Auswirkungen haben können wie Punktmutationen. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit die Auswirkungen bestimmter Kanalmutationen mithilfe ausgewählter Lipidumgebungen rückgängig zu machen und somit die korrekte Kanalfunktion wiederherzustellen.

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* DH5 α - Zellen sowie Plasmid - Isolierung

Für eine Transformation der *E. coli* Zellen wurden 50 μ l *E. coli* DH5 α - Zellen mit der gewünschten Plasmid - DNA versetzt. Nach 20 min Inkubation wurden die Proben einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Im Anschluss wurden die Proben mit 250 μ l SOC - Medium (20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 8,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 100 mM MgCl₂, 20 mM Glucose, pH 7) versetzt und ca. 60 min bei 220 rpm (37°C) geschüttelt. Die Proben wurden danach auf LB-Amp - Agarplatten (10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 50 mg/L Ampicillin, 20 g/L Agar, pH7) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am Folgetag wurden Kolonien gepickt und mit jeweils 4 ml LB-Amp - Medium (10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 50 mg/L Ampicillin, pH 7) versetzt. Die Kulturen wurden abermals über Nacht bei 200 rpm (37°C) inkubiert und anschließend für die Plasmid-Isolierung verwendet.

Die Isolierung der Plasmid - DNA aus den *E. coli* - Übernachtskulturen wurde nach Herstelleranweisungen mit dem ZR Plasmid Miniprep™ - Classic Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die DNA Konzentration wurde mithilfe des *Nano-Drop*[®] (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

Die Sequenzierung der DNA wurde von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) unter Verwendung des T7 - forward Primers (5'-TAA TACGAC TCA CTA TAG GG-3'; 20 pmol) und ca. 750 ng Plasmid - DNA durchgeführt.

2.1.2 Proteinexpression mit Nanodiscs und Proteinaufreinigung

Die *in vitro* Expression der Kanalproteine wurde mit dem *MembraneMax™ HN Protein Expression Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) nach Herstelleranweisungen mit halbiertem Volumen durchgeführt.

Die *in vitro* Protein - Synthese erfolgte in Anwesenheit von Nanolipoproteinen (NLPs). Dies sind ringförmige Gerüstproteine (*scaffold proteins*; ca. 10 - 13 nm Durchmesser), welche eine

Lipidmembran aus DMPC (1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphcholin) umschließen (Nanodisks) (Bayburt, Carlson, & Sligar, 1998).

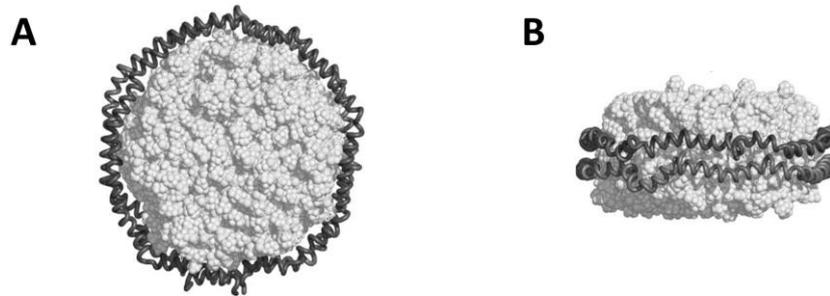


Abbildung 14: Schematische Darstellung einer Nanodisk. A Aufsicht auf eine Nanodisk. B Seitenansicht einer Nanodisk. Die *scaffold* Proteine als Mantel sind in dunkelgrau dargestellt und die Lipide in hellgrau (Ritchie et al., 2009).

Nanodisks entstehen durch eine Zusammenlagerung zweier Proteingerüste, welche jeweils einen Lipid - *Monolayer* umschließen (Ritchie et al., 2009). In diesen *Bilayer* können sich Membranproteine während ihrer Expression einlagern, wodurch eine korrekte Faltung unterstützt und eine Aggregation von Proteinen verhindert wird. Als DNA - Template für die Expression wurde das Protein von Interesse in pEXP5CT/TOPO - Vektoren verwendet.

Es wurden Versuche zur Eignung und Etablierung dieser Expressionsmethode durchgeführt (Winterstein et al., 2018). Für diese Versuche wurde das MembraneMax Reagenz, welches die Nanodisks mit dem Lipid DMPC enthält, durch andere kommerziell erhältliche Disks (Cube Biotech, Monheim, Deutschland) mit verschiedenen Lipiden (DMPC, POPC und DMPG) in einer Konzentration von 30 μmol ersetzt.

Die *scaffold* Proteine der Nanodisks tragen mehrere His - Tags. Dies ermöglichte die Aufreinigung der Kanal / Nanodisk - Konjugate mithilfe Polypropylen - Säulen (HisPur Ni-NTA spin column, ThermoScientific, Rockford, IL, USA). Die Säulen wurden mit einem Equilibrierungspuffer (10 mM Imidazol, 300 mM KCl, 20 mM NaH_2PO_4 , pH7,4 mit KOH) equilibriert und anschließend mit dem Expressionsansatz unter schütteln inkubiert. Danach erfolgten drei Waschschrte mit jeweils 20 mM Imidazol (in ddH₂O) und die anschließende Elution in drei Fraktionen mit einer 250 mM Imidazol Lösung (in ddH₂O).

2.2 Elektrophysiologische Messmethoden

Um die *in vitro* synthetisierten Ionenkanäle in zellfreien Systemen zu untersuchen wurden diese elektrophysiologisch auf Einzelkanalebene vermessen. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet.

2.2.1 Planare Lipid *Bilayer* Technik

Die Planare Lipid *Bilayer* Methode (PLB), wurde erstmals von (Montal & Mueller, 1972) beschrieben. Mit Hilfe dieser Methode können Membranproteine in artifiziellen Membranen untersucht werden. Zusätzlich können die Ionenkonzentrationen, die Temperatur, der pH-Wert sowie die Lipidzusammensetzung der Membran frei bestimmt werden (Hanke und Schlue, 1993). Die Methode wurde nach (Braun, Baer, Moroni, & Thiel, 2014) angewendet (**Abbildung 15 A**) und Membranen mit der beschriebenen *Pseudo - Painting* Technik mithilfe einer Hamiltonspritze (Hamilton Company, Reno, NV, USA) aufgespannt (**Abbildung 15 B**) (Braun, Baer, Moroni, & Thiel, 2014).

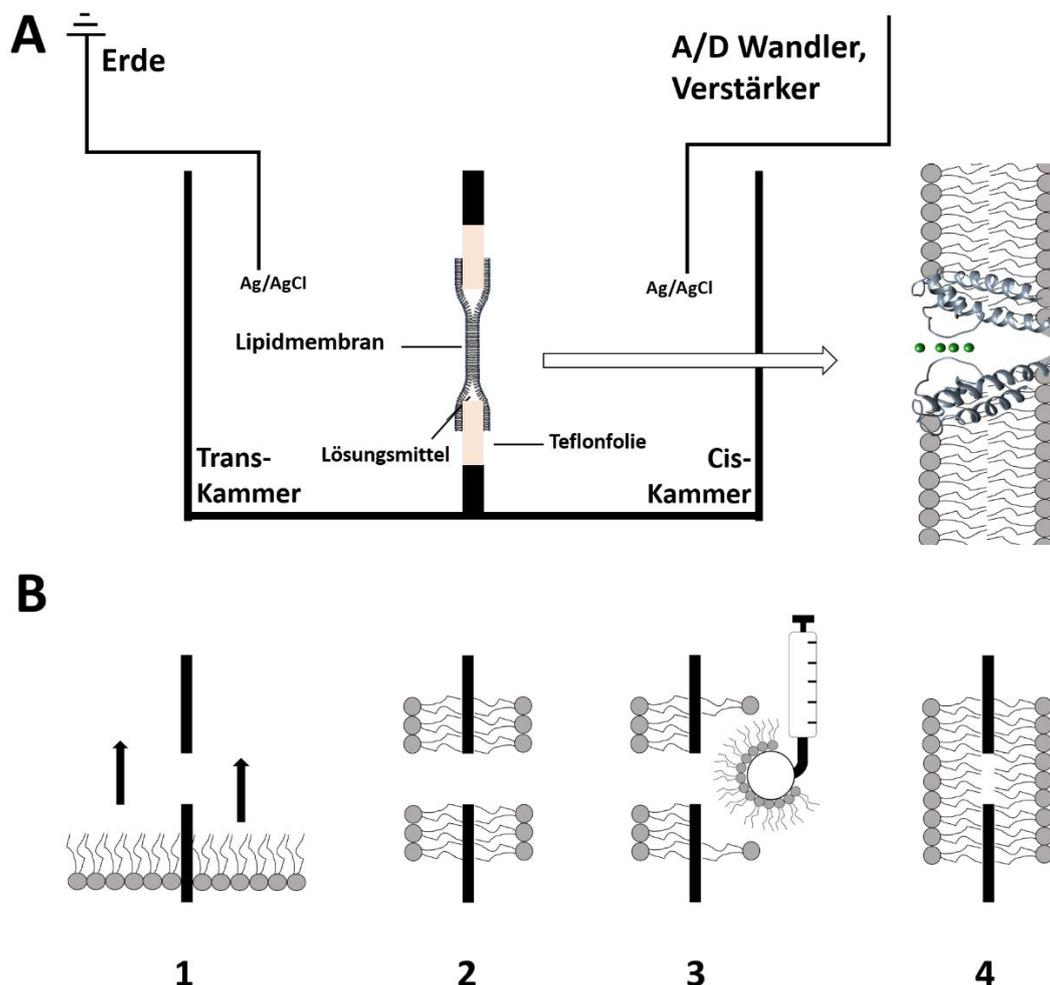


Abbildung 15: Schematische Darstellung einer Messkammer der planaren Lipid *Bilayer* Methode (A), sowie der Pseudo - Painting Technik (B). A Aufbau der Planaren Lipid *Bilayer* Methode. Zwei mit Messlösung gefüllte Kammern sind durch ein Teflonseptum (Goodfellow GmbH, Hamburg, Deutschland) getrennt, welches ein eingebranntes Loch ($100\ \mu\text{m}\ \varnothing$) besitzt. Über dieses wird mit der Pseudo - *Painting* Technik in B (Braun, Baer, et al., 2014) eine Doppellipidmembran gespannt in welche Kanalproteine inserieren können (Detailausschnitt). B 1 Befüllen der Kompartimente. 2 Lipid an der Folie ohne bestehenden *Bilayer*. 3 Aufspannen des *Bilayers* mithilfe einer Luftblase. 4 vollständig aufgespannter *Bilayer*.

Hierbei ist es möglich *Bilayer* mit einer Auswahl von methylierten synthetischen Lipiden (Avanti Polar Lipids Inc, Alabaster, AL, USA) aufzuspannen, die zusätzlich andere Lipide, Cholesterol (Avanti Polar Lipids Inc, Alabaster, AL, USA) oder Signalmoleküle beinhalten können.

Zu beachten ist die Einhaltung der Evaporationsszeit des Lösungsmittels n - Pentan (MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland) der Lipidlösung (15 mg Lipid in n - Pentan) von 5 - 7 Minuten, um eine Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten (Rauh, 2014).

Ist die Evaporationszeit des Pentans zu kurz (< 5 min), befindet sich zu viel Lösungsmittel in der aufgespannten Membran. Andererseits wird ein geringer Anteil an Lösungsmittel zwischen Folie und *Bilayer* (Annulus) benötigt, um stabile *Bilayer* aufzuspannen. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass Lösungsmittel aus dem Annulus in den *Bilayer* (zwischen die *leaflets*) fließt und diese Membranen somit nicht vollkommen lösungsmittelfrei sind (White, 1976) (**Abbildung 15 A**).

Zu untersuchende Ionenkanäle wurden nach ihrer Expression in Nanodisks in die unmittelbare Nähe des *Bilayers* gegeben und nach ihrer Inkorporation mit Hilfe verschiedener angelegter Spannungsprotokolle untersucht. In beiden Kammern befinden sich Ag/AgCl-Elektroden. Während die Elektrode der *trans* - Kammer mit dem Erdleiter in Verbindung steht, ist die Elektrode der *cis* - Kammer direkt mit dem Vorverstärker eines *Patch - Clamp* Verstärkers (L/M-EPC7, List-Medical, Darmstadt, Deutschland) verbunden. Die Stromantworten der Kanäle wurden bei 1 kHz gefiltert und mit einer Sampling - Frequenz von 5 kHz digitalisiert (LIH 1600, HEKA Elektronik Lambrecht, Deutschland). Die Kanalströme wurden über das Programm *PatchMaster* (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) aufgezeichnet und gespeichert.

2.2.2 *Contact Bubble Bilayer* Technik

Die *Contact Bubble Bilayer* Methode (CBB) (Iwamoto & Oiki, 2015) ist eine Variante der *Droplet Interface Bilayer* Methode (DIB) (Bayley et al., 2008).

Für die CBB Methode werden zwei Ag/AgCl - Elektroden in mit Messlösung (100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7; Liposomen und Kanalprotein in Nanodisks) gefüllte Glaspipetten mit etwa 30 μm Öffnungsdurchmesser (Tube, Capillary, melting point, 1.5 - 1.8 $\times 100$ mm, Kimble Chase, Gerresheimer, Vineland, USA) gebracht. Die Pipetten werden anschließend in eine mit Hexadecan gefüllte Petrischale getaucht. Aus den Öffnungen der Glaspipetten werden zwei kleine Bläschen (50 - 60 μm \varnothing) gepustet um die sich das Lipid gemäß seiner amphiphilen Eigenschaft an der Grenze zwischen wässriger Elektrolytlösung und dem Ölbad als *Monolayer* um die Bläschen anlagert (**Abbildung 16 A**). Werden die zwei Bläschen in Kontakt gebracht, entsteht an der Kontaktstelle beider *Monolayer* ein *Bilayer* (**Abbildung 16 B**), in den die zu untersuchenden Kanalproteine inserieren und über die Elektroden vermessen werden (**Abbildung 16 C**).

Für die Bildung der Bläschen (*Bubbles*) wurde eine Schlauchvorrichtung verwendet, mittels derer der Druck innerhalb der Bläschen mit dem Mund verändert und mit einem Dreiwegehahn fixiert werden kann.

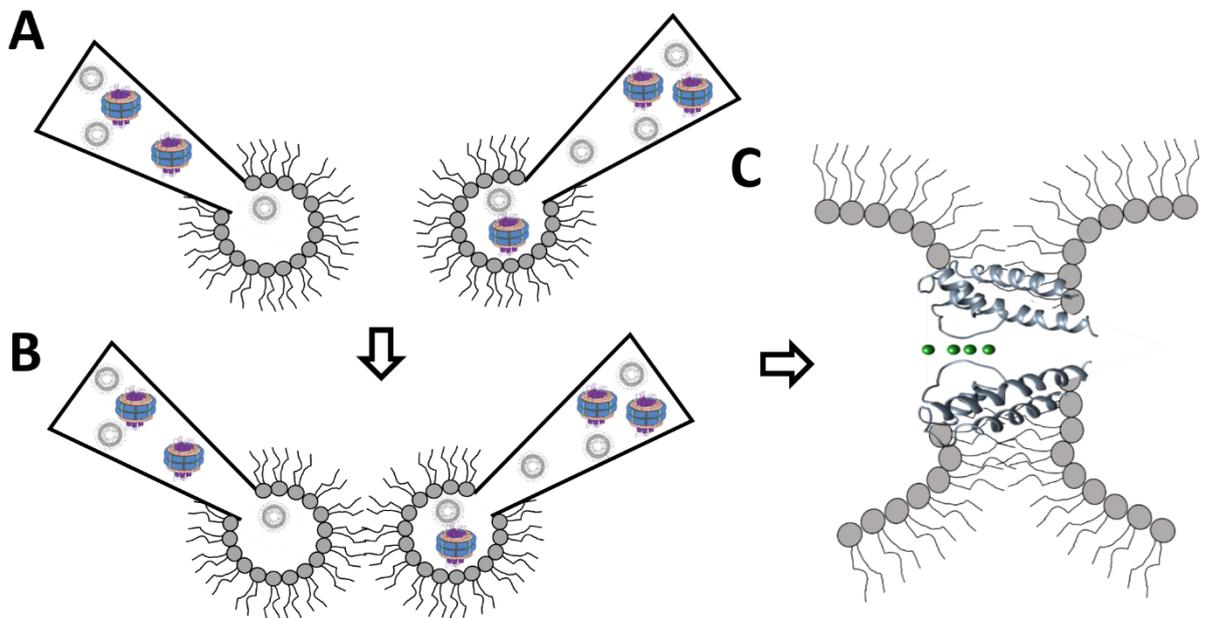


Abbildung 16: Prinzip der *Contact Bubble Bilayer* Methode. **A** getrennte *Bubbles* von einem *Monolayer* umgeben. **B** *Bilayer* - Ausbildung nach Zusammenführung der *Monolayer*. **C** Kanaleinbau in einen bestehenden *Bilayer*. Die Abbildungen sind schematisch und entsprechen nicht den wahren Größenverhältnissen.

Nach dem Einbau eines Kanals werden dessen Stromantworten auf angelegte Spannungsprotokolle aufgezeichnet. Eine Elektrode ist mit dem Erdleiter verbunden, während die Kommandoelektrode mit dem Vorverstärker des Verstärkers (3900A *Integrating Patch Clamp*, Dagan, Minneapolis, MN, USA) in Verbindung steht. Die Stromantworten der Kanäle wurden mit 1 kHz gefiltert und mit einer Sampling - Frequenz von 5 kHz digitalisiert (LIH 8+8, HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland). Die Kanalströme wurden über das Programm *PatchMaster* (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) aufgezeichnet und gespeichert.

Die *Contact Bubble Bilayer* Methode bietet ebenso wie die *Planare Lipid Bilayer* Methode (Kapitel 2.2.1) eine Möglichkeit, Kanalproteine auf Einzelkanalebene zu untersuchen. Sie bietet ihr gegenüber einige Vorteile, wie beispielsweise ein verbessertes Signal - Rauschverhältnis durch die geringe *Bilayer* - Fläche und eine damit einhergehende bessere Auflösung schneller Schaltvorgänge. Die mit dieser Methode generierten Membranen befinden sich zwar in einem Bad aus Hexadekan, besitzen dennoch höchstwahrscheinlich kein Lösungsmittel zwischen den *leaflets* oder in der Membran. Ebenso ist es mit dieser Methode im Gegensatz zu PLBs möglich reine Membranen aus unmethylierten Lipiden zu generieren.

Der wahrscheinlich größte Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, asymmetrische *Bilayer* zu kreieren, indem in jeder Glaspipette Liposomen eines unterschiedlichen Lipids enthalten sind.

Zwei unterschiedliche *Monolayer* können sich bei Kontakt zu einem asymmetrischen *Bilayer* zusammenlagern (Iwamoto & Oiki, 2015).

Ein Nachteil dieser Methode ist die Variabilität der *Bilayer* in Größe, Krümmung und dessen interner Spannung auch während einer laufenden Messung. Des Weiteren sind die *Bilayer* nicht sehr stabil, wodurch lange Messungen nahezu unmöglich sind. Ebenso kann es wegen der im Vergleich zu den planaren Lipid *Bilayern* geringen Membranfläche mitunter sehr lange dauern, bis sich ein einzelner Kanal in die Membran einbaut, wenn man nicht durch sehr hohe Proteinkonzentrationen einen Einbau von mehreren Kanälen gleichzeitig provozieren möchte.

2.2.2.1 Technische Aspekte

Aufgrund ihrer elektrischen Eigenschaften kann eine Membran als Plattenkondensator angesehen werden. Die Elektrolytlösungen nahe des *Bilayers* entsprechen zwei elektrisch leitfähigen Flächen während der *Bilayer* einem isolierenden Dielektrikum entspricht. Die Kapazität C des *Bilayers* entspricht daher der gespeicherten Ladung Q pro angelegte Spannung U ($C = Q/U$). Hierbei ist die Kapazität von der *Bilayer*-Fläche A , der Dicke des *Bilayers* d (Abstand der Platten) und den Eigenschaften des Dielektrikums (ϵ_0 für die elektrische Feldkonstante und ϵ_r für die relative Permittivität des Dielektrikums), also dem *Bilayer* selbst abhängig (Formel 1).

$$C = \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \frac{A}{d} \quad (1)$$

Für die Überprüfung einer erfolgreichen *Bilayer*-Bildung der CBB Methode wurde ein periodisches Spannungsprotokoll einer Rampenfunktion (0 mV Haltespannung, Anstieg von 0 mV auf 10 mV, 0 mV Haltespannung) (**Abbildung 17 A** und **B** oben) angelegt und die Strom - Spannungsbeziehung an einer Kapazität genutzt (Formel 2).

$$i = C \frac{du}{dt} \quad (2)$$

Dabei steigt die Spannung U der Rampe konstant mit 1 mV / ms, worauf sich ein konstanter Strom einstellt, dessen Betrag von der Kapazität selbst abhängt (Je größer die Kapazität, desto größer der Strom).

Die Kapazität kann mit dem Abstand der Bläschen zueinander verändert werden (Formel 1) Stehen sich die Bläschen kontaktlos gegenüber, so ist die Kapazität aufgrund des großen Abstands klein. Ein konstanter Stromfluss infolge der Rampenfunktion geht im Messrauschen



unter, während der abrupte Abfall der Spannung von 10 mV auf 0 mV dennoch in einem messbaren transientem Strom mit negativem Vorzeichen führt (**Abbildung 17 A und C**).

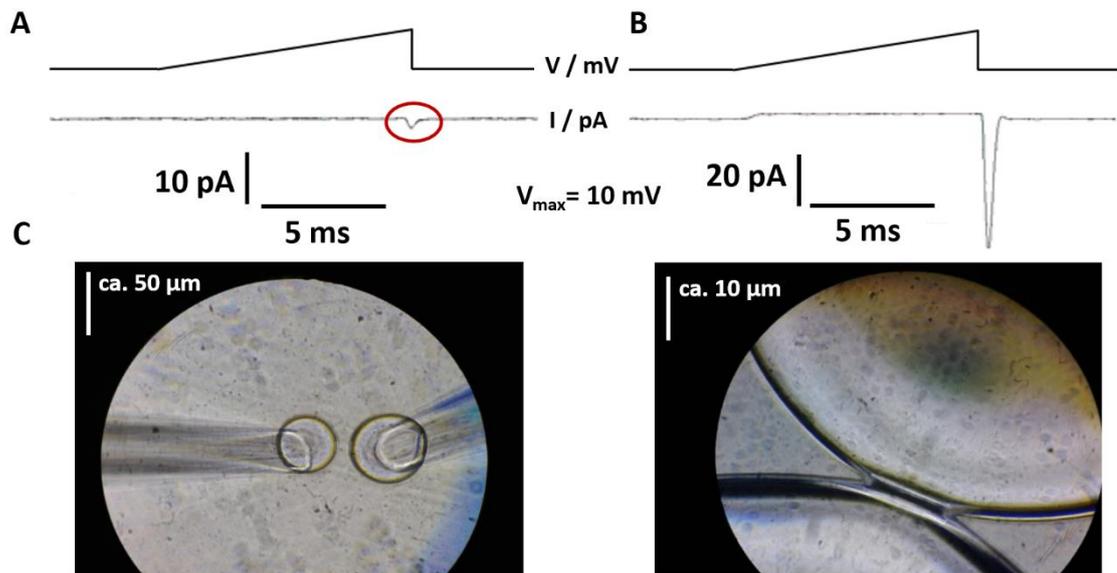


Abbildung 17: Die Bildung eines *Bilayers* ist am angelegten Spannungsprotokoll erkennbar. **A** Angelegtes Spannungsprotokoll mit zugehöriger Stromantwort bei getrennten *Bubbles*. **B** Angelegtes Spannungsprotokoll mit zugehöriger Stromantwort eines *Bilayers*. **C** Abbildungen der in **A** (links) und **B** (rechts) gezeigten Situationen (verändert nach Schlee, 2014).

Bei Kontakt der Bläschen entspricht der Abstand der leitfähigen Flächen der Dicke des *Bilayers* (5 - 10 nm). Dadurch wird die Kapazität deutlich größer und der konstante Spannungsanstieg resultiert in einem sichtbaren konstanten Strom. Ebenso ist auch der transiente Strom bei der Rückkehr der Spannung auf 0 mV erhöht. Durch Veränderung der Fläche des Kondensators kann die Kapazität zusätzlich verändert werden (**Abbildung 17 B und C**). Eine Erhöhung kann durch besonders große Bläschen oder durch ein mechanisches Zusammendrücken derselben erreicht werden, eine Verringerung der Kapazität durch kleine Bläschen bzw. eine kleinere Kontaktfläche. Die *Bilayer* - Größe und Kapazität kann somit an einem erhöhten bzw. einem geringen Stromfluss aufgrund des Rampenprotokolls berechnet werden.

Bei einem Kanaleinbau in den *Bilayer* steigt der Stromfluss proportional zur Spannung und ist zusätzlich zum konstanten Stromfluss als ansteigender Strom an einem ohmschen Widerstand zu erkennen (**Abbildung 18**) (Iwamoto & Oiki, 2015).

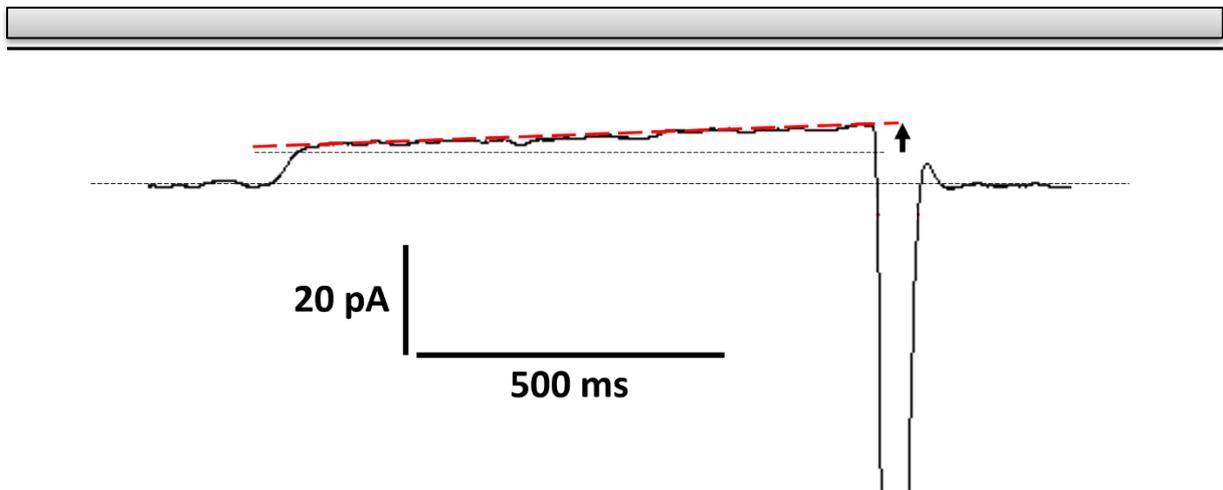


Abbildung 18: Stromantwort des Testprotokolls auf einen *Bilayer* mit inseriertem Kanalprotein.

Die gestrichelten Linien in schwarz markieren das Grundniveau von 0 mV und das Niveau eines *Bilayers* ohne Kanal aufgrund der Kapazität der Membran. Die rote Linie markiert den Stromfluss eines inserierten, leitenden Kanalproteins, das wie ein ohmscher Widerstand wirkt. Der Abstand (kapazitiver Strom) der beiden gestrichelten Linien entspricht gemäß Formel 2 einer Kapazität von ungefähr 6,5 pF. Zum Vergleich: Die Kapazität eines *Bilayers* der Planaren Lipid *Bilayer* Methode beträgt ungefähr 300 pF (verändert nach Schlee, 2014).

2.2.2.2 Herstellung der Liposomen

Für die Herstellung der Liposomen wurden 15 mg Lipid in 1 ml Chloroform (AppliChem, Darmstadt, Germany) in einem Glasgefäß gelöst. Das Chloroform verdampfte unter stetigem Rotieren des Glasgefäßes, wodurch sich ein dünner Lipidfilm an der Glaswand absetzen konnte. Nach vollständiger Trocknung des Lipids wurde es in 10 ml 100 mmol KCl - Lösung aufgenommen, für mind. 30 min in einem Ultraschallbad sonifiziert und anschließend in Aliquotes von 50 - 100 μ l bei -20 °C eingefroren.

Lipidgemische wurden zuvor in Konzentrationen von mol% berechnet und in einer Gesamtmenge von 15 mg wie beschrieben für die Herstellung von Liposomen benutzt. Alle verwendeten Lipide stammen von Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA).

2.2.2.3 Herstellung der Glaspipettenspitzen

Für die *Contact Bubble Bilayer* Methode wurden mit *Sigmacote* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) beschichtete Kapillaren aus Borosilikatglas (Tube, Capillary, Melting point, $1.5-1.8 \times 100$ mm, Kimble Chase, Gerresheimer, Vineland, USA), verwendet. Die Kapillaren wurden mit einem Ziehgerät für *Patch* - Pipetten (PP-830, Narashige, Japan) in zwei Teile mit einer Spitzenöffnung von 30 - 50 μ m gezogen und anschließend bei 60 °C für mindestens 70 min inkubiert, um eine homogene Verteilung des *Sigmacotes* zu gewährleisten.

2.3 Auswertung und Darstellung der Daten

Zur Auswertung der elektrophysiologisch ermittelten Daten wurden die Programme PatchMaster (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland), KielPatch (Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie der CAU Kiel) und MATLAB (MathWorks, Sherborn, MA, USA) verwendet.

Für die Analyse, Berechnung und Darstellung der Daten wurde Microsoft Office (Redmond, WA, USA) verwendet (Windows 7; Windows 10).

2.3.1 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse der Daten wurde ein zweiseitiger, ungepaarter T - Test mit Microsoft Excel (Microsoft Office 2010, Redmond, WA, USA) durchgeführt. Populationen wurden als signifikant unterschiedlich (*) angesehen sofern die P - Werte (Signifikanzwert) $\leq 0,05$ lagen. Mit Werten $\leq 0,01$ wurden die Populationen als sehr signifikant (**) und mit P - Werten $\leq 0,001$ als hochsignifikant (***) unterschiedlich angesehen.

3 Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Protein-Lipid-Interaktionen zwischen den drei viralen Kaliumkanälen Kcv_{NTS}, Kcv_S, Kmp_{V12T} und verschiedenen Membranumgebung zu untersuchen.

Um diese Interaktionen systematisch zu analysieren, wurden Messungen in artifiziellen Membranen mithilfe von zwei verschiedenen Messmethoden der Planaren Lipid *Bilayer* und *Contact Bubble Bilayer* Methode durchgeführt. Mit diesem Vorgehen sollte ein möglichst breites Spektrum an Membranvariabilität ausgeschöpft werden. Beide Methoden erlauben es, die Lipidzusammensetzung exakt kontrollieren. Durch die Verwendung von zellfreien Messmethoden wurde zusätzlich eine konstante Messumgebung gewährleistet. Die Messungen der Kanalaktivität wurden auf Einzelkanalbasis durchgeführt, um die genauen Auswirkungen der Lipide auf die Funktionseigenschaften einzelner Kanalproteine zu untersuchen.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden alle drei Kanäle in Kontrollmembranen aus DPhPC (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin; **Abbildung 78**) am Planaren Lipid *Bilayer* charakterisiert (Kapitel 3.1). Anschließend wurde ein *in vitro* Expressionssystem auf dessen Nutzbarkeit für Protein-Lipid-Interaktionen getestet (Kapitel 3.2.1). Des Weiteren wurde die *Contact Bubble Bilayer* - Methode etabliert und mithilfe der drei Kanäle auf ihre Verwendbarkeit getestet (Kapitel 3.2.2). Nach Feststellung der Eignung der Methoden, wurde anschließend der Einfluss verschiedener Fettsäureketten (Kapitel 3.3), von Cholesterol (Kapitel 3.4) und anionischen Lipiden (Kapitel 3.5) auf die Funktion von Kcv_{NTS}, Kcv_S und Kmp_{V12T} analysiert. Alle verwendeten Lipide und Sterole wurden von Avanti Polar Lipids (Inc, Alabaster, AL, USA) bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Messungen unter symmetrischen Bedingungen in 100 mM KCl, 10 mM Hepes bei pH 7 durchgeführt.

3.1 Charakterisierung von Kcv_{Next-to-Smith}, Kcv_{Smith} und Kmpv_{12T} am Planaren Lipid Bilayer

Um im Weiteren die Auswirkungen verschiedener Membranumgebungen auf Kcv_{N_TS}, Kcv_S und Kmpv_{12T} vergleichen zu können, müssen diese zunächst in Kontrollmembranen charakterisiert werden. Dafür wurden sie zunächst *in vitro* exprimiert und anschließend auf Einzelkanalbasis am planaren Lipid Bilayer (PLB) untersucht.

Als Kontrolllipid wurde das synthetisch hergestellte Lipid DPhPC verwendet, dessen Vorbild aus Archaeen stammende Phytanoyl sind. Sie sind die Schlüsselfaktoren für die hohe chemische und mechanische Stabilität dieser Prokaryoten gegenüber extremen Bedingungen (Kara et al., 2017). DPhPC besteht aus einer Cholin Kopfgruppe die über eine Phosphatgruppe an zwei methylierte 16 - C Fettsäureketten gebunden ist. Es durchläuft in einem Temperaturbereich zwischen -120 °C und +120 °C keinen Phasenübergang (Lindsey, Petersen, & Chan, 1979) und verleiht seinen Membranen einen hohen elektrischen Widerstand (Redwood, Pfeiffer, Weisbach, & Thompson, 1971). Daher eignet es sich gut für Messungen an Ionenkanälen (F.-Y. Chen, Lee, & Huang, 2002; Wu, He, Ludtke, & Huang, 1995), da deren Leitfähigkeiten typischerweise im pA - Bereich liegen (Redwood et al., 1971). Die methylierten stabilen Fettsäureketten sorgen für einen kleineren Diffusionskoeffizienten im hydrophoben Teil der Membran (Tristram-Nagle et al., 2010), was wahrscheinlich ausschlaggebend dafür ist, dass das Aufspannen eines Bilayers aus DPhPC sehr einfach und zuverlässig ist. Daher liefern Ionenkanalmessungen mit Membranen aus DPhPC reproduzierbare Messergebnisse.

3.1.1 Kcv_{N_TS} und Kcv_S sind sich strukturell sehr ähnlich, besitzen jedoch signifikant unterschiedliche Offenwahrscheinlichkeiten

Das Schaltverhalten (*Gating*; Kapitel 1.4.1) von Kcv_{N_TS} und Kcv_S unterscheidet sich grundlegend (**Abbildung 19**). Während Kcv_{N_TS} (links) fast ausschließlich geöffnet ist, weist Kcv_S (rechts) häufigere und längere Geschlossenphasen auf. Des Weiteren ist die Offenkanalamplitude von Kcv_S bei positiven Spannungen im Vergleich zu Kcv_{N_TS} höher.

Während die Offenkanalamplituden von beiden Kanälen bei positiven Spannungen durch langsames *Gating* deutlich erkennbar sind, schalten beide Kanäle bei negativen Spannungen sehr schnell, sodass die Schaltereignisse zeitlich nicht mehr aufgelöst werden können. Dieses schnelle *Gating* wird auch Flicker - *Gating* (Kapitel 1.4.1) genannt (Schroeder & Hansen, 2006, 2007) und führt zu einem deutlichen Offenkanalrauschen, das typisch für diverse Kcv - Kanäle ist (Abenavoli et al., 2009; Gazzarrini et al., 2009; Rauh et al., 2017) (Rauh, 2018).

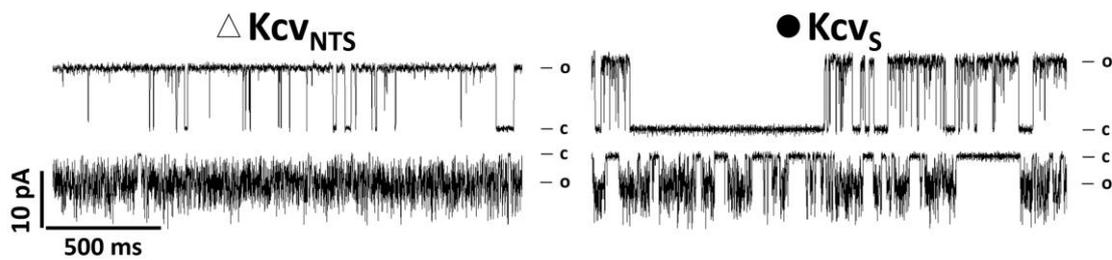


Abbildung 19: Kcv_{NTS} und Kcv_S zeigen bei negativen Spannungen das für Kcv - Kanäle typische Flicker - *Gating* und unterscheiden sich anhand der langen Geschlossenzeiten von Kcv_S . Gezeigt sind charakteristische Einzelkanalströme bei einer angelegten Haltespannung von ± 120 mV von Kcv_{NTS} (links) und Kcv_S (rechts). Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen- und o das Offenniveau des Kanals.

Die Stromspannungskurven (i/V Kurven) und Offenwahrscheinlichkeitsdiagramme sind in **Abbildung 20 A** und **B** abgebildet. Die scheinbare Verringerung der Stromamplitude beider Kanäle im negativen Spannungsbereich kommt durch die oben erwähnte Zunahme der *Gating* - Frequenz mit steigenden negativen Spannungen zustande. Zur besseren Übersicht werden die Leitfähigkeiten von -60 mV bis $+60$ mV und die Offenwahrscheinlichkeiten der einzelnen Messungen gemittelt und zum Vergleich aufgetragen (**Abbildung 20 C** und **D**).

Kcv_{NTS} besitzt eine niedrigere Leitfähigkeit als Kcv_S , was den höheren Offenkanalamplituden von Kcv_S bei positiven Spannungen zu schulden ist (**Abbildung 20 A** und **C**). Die mittlere Offenwahrscheinlichkeit von Kcv_{NTS} liegt hingegen signifikant über der von Kcv_S (**Abbildung 20 B** und **D**). Beide Kanäle zeigen über den gesamten Spannungsbereich eine konstante Offenwahrscheinlichkeit, die eine Mittelung der Werte erlaubt (**Abbildung 20 B**). Die Zahlenwerte aus **Abbildung 20** sind der **Tabelle 1** am Ende des Kapitels zu entnehmen.

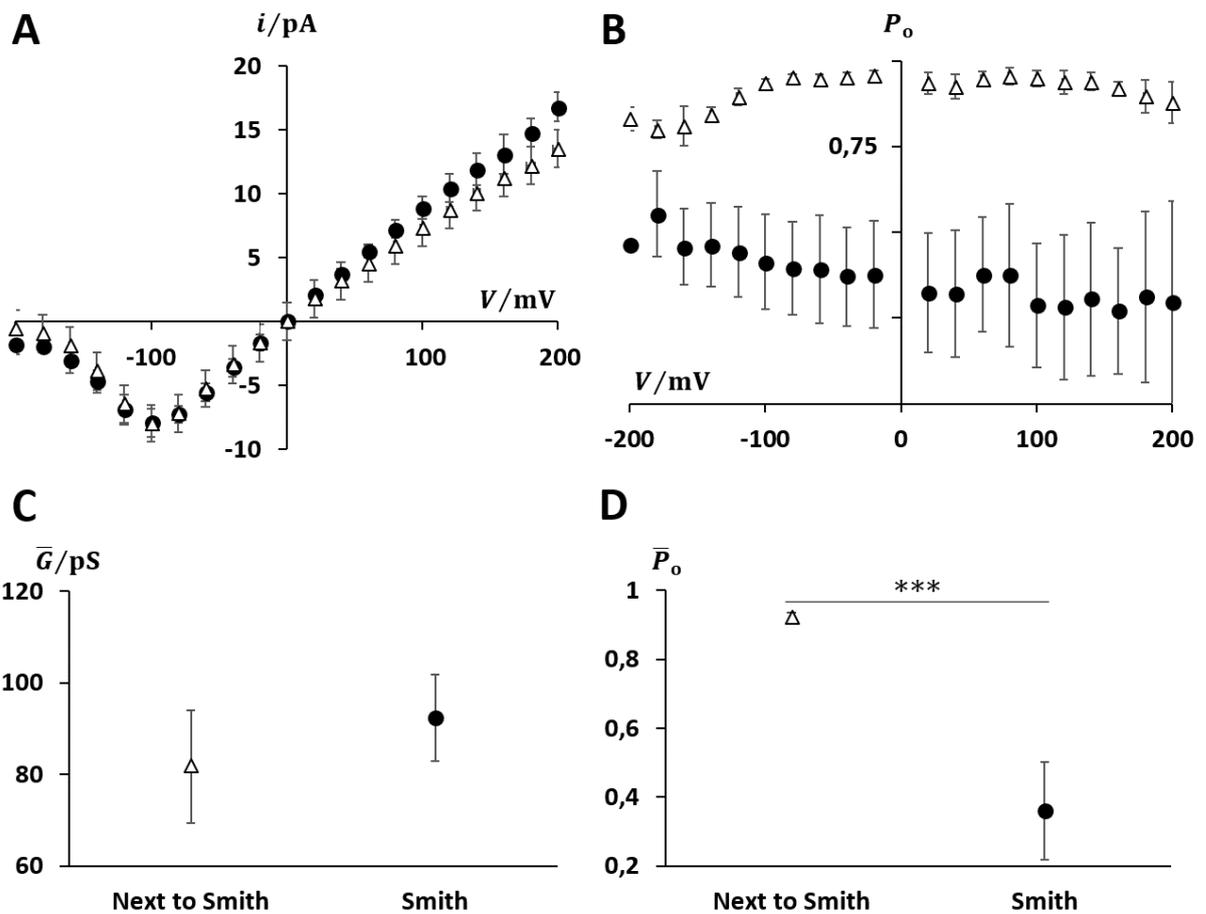


Abbildung 20: Charakterisierung des Kcv_{NTS} und Kcv_S in Membranen aus DPhPC auf Einzelkanalbasis am Planaren Lipid *Bilayer*. **A** i/V Kurven. **B** Offenwahrscheinlichkeiten. **C** gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Bereich der i/V Kurve von -60 mV bis $+60$ mV, sowie die mittleren Offenwahrscheinlichkeiten (**D**). Alle Datenreihen und Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen. Die Symbole in **A** und **B** entsprechen denen in **C** und **D**.

Um den deutlichen Unterschied in der Offenwahrscheinlichkeit näher zu analysieren wurden sogenannte *Dwelltime* - Analysen durchgeführt. In **Abbildung 21** sind die Geschlossen- und Offenzeithistogramme von Kcv_{NTS} (**A**) und Kcv_S (**B**) abgebildet. Die Histogramme ergeben sich aus einer Häufigkeitsverteilung des Auftretens (Y - Achse) von Offen - und Geschlossenereignissen verschiedener Dauer über die Ereignisdauer (X - Achse) und können mit Exponentialfunktionen beschrieben werden. Der Fit über alle Geschlossenpopulationen kommt durch die Summe der einzelnen Exponentialfunktionen zustande (Colquhoun & Hawkes, 1983; Colquhoun & Sigworth, 1983). Die Maxima der gefitteten Populationen geben die mittlere Verweildauer des Kanals in den jeweiligen Zuständen an (τ - Werte). Während

beide Kanäle nur einen Offenzustand aufweisen (rechts), besitzt Kcv_{NTS} (Abbildung 21 A) zwei und Kcv_S (Abbildung 21 B) drei Geschlossenzustände (links).

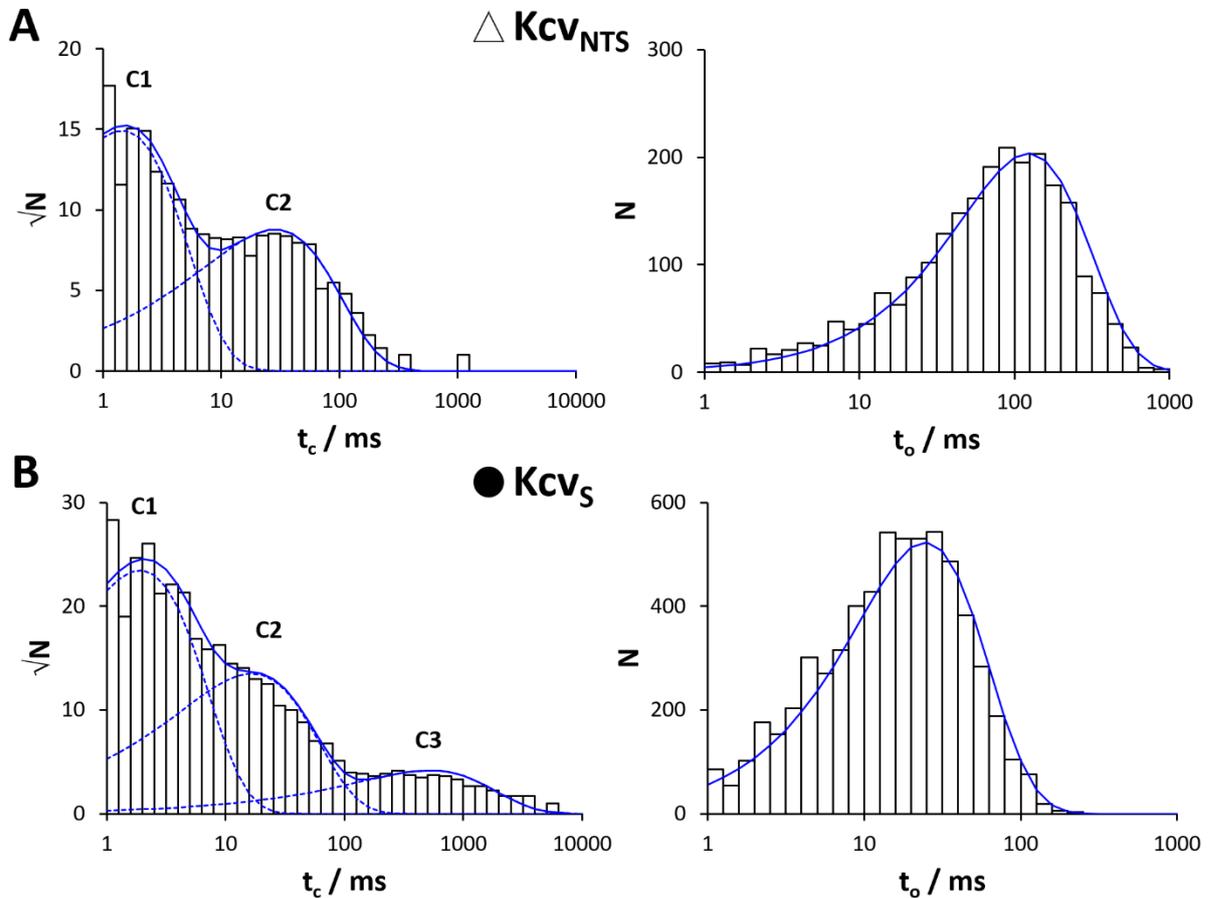


Abbildung 21: Charakterisierung der Geschlossen- und Offenzeiten von Kcv_{NTS} und Kcv_S mithilfe von *Dwelltime*-Analysen. A repräsentative *Dwelltime*-Histogramme der Geschlossenzustände (links) und der Offenzzeit (rechts) von Kcv_{NTS} . B repräsentative *Dwelltime*-Histogramme der Geschlossenzustände (links) und der Offenzzeit (rechts) von Kcv_S . t entspricht den Verweildauern, an dessen Populationsmaxima die mittleren Verweildauern der jeweiligen Population abgelesen werden können. N ist die Anzahl der Ereignisse. Die blauen Linien beschreiben den Graphen der Fitfunktion. Die Histogramme entstammen einer Messung bei +120 mV in DPhPC (die Analysen und Histogramme wurden von Oliver Rauh durchgeführt und bereitgestellt; Rauh, 2017).

Die geringere Offenwahrscheinlichkeit von Kcv_S kann hauptsächlich auf die Existenz des dritten langen Geschlossenzustandes (C3) zurückgeführt werden. Dieser ist ebenso in den exemplarischen Stromspuren aus **Abbildung 19** rechts deutlich erkennbar. Des Weiteren ist auch die mittlere Lebensdauer des Offenzustandes von Kcv_S geringer. Dies ist auf ein häufigeres Auftreten kurzer Geschlossenereignisse zurückzuführen.

3.1.2 Der virale Kaliumkanal Kmpv_{12T} ist ein Einwärtsgleichrichter und besitzt eine Unterleitfähigkeit

Die bisher untersuchten Kanäle Kcv_{NTS} und Kcv_S besitzen bis auf 11 AS eine identische Aminosäuresequenz. Kmpv_{12T} ist mit 78 AS der kleinste bisher bekannte Kaliumkanal mit einer Sequenzhomologie von nur 13% zu den Kcv - Kanälen (Kapitel 1.5)

Das Schaltverhalten von Kmpv_{12T} ist spannungsabhängig (**Abbildung 22 A**), was durch die wesentlich kürzeren Offenzeiten bei positiven Spannungen deutlich wird. Auffällig ist weiterhin das Kmpv_{12T} im Gegensatz zu den Kcv - Kanälen zwei Leitfähigkeiten besitzt. Die Unterleitfähigkeit wird als zweiter Offenzustand o₂ gekennzeichnet. Der Kanal ist in der Lage von jedem Zustand (Offen, Geschlossen und Unterleitfähigkeit) in beide anderen zu springen, was anhand **Abbildung 22 B** schematisch dargestellt ist.

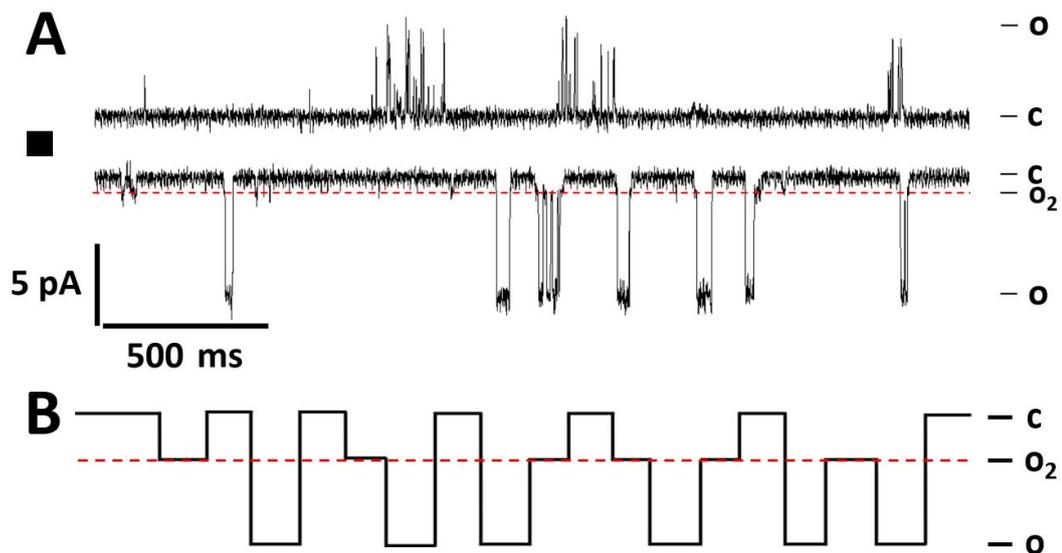


Abbildung 22: Kmpv_{12T} besitzt eine Unterleitfähigkeit und zeigt ein spannungsabhängiges Gating-Verhalten. A Charakteristische Einzelkanalströme bei ± 160 mV. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen- und o das Offenniveau des Kanals. Die rote Linie sowie o₂ markieren die Unterleitfähigkeit. B Mögliche Schaltereignisse des Kmpv_{12T}.

Die hohe Leitfähigkeit von $Kmpv_{12T}$ geht ab ± 100 mV in Sättigung über, wohingegen die Unterleitfähigkeit mit steigender Spannung exponentiell anzusteigen scheint (**Abbildung 23 A**). Die Unterleitfähigkeit ist aufgrund ihrer geringen Amplitude erst bei höheren Spannungen detektierbar. Aus diesen Gründen wurde sie im Folgenden nicht näher analysiert.

Im Vergleich zu anderen viralen Kaliumkanälen besitzt $Kmpv_{12T}$ im linearen Bereich der Stromspannungskurve (-60 mV - $+60$ mV) eine sehr geringe Leitfähigkeit (**Abbildung 23 A**, **Tabelle 1**) (Siotto et al., 2014).

Die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals ist spannungsabhängig und reicht von $\sim 3\%$ bei $+160$ mV, bis $\sim 25\%$ bei -160 mV, was ihn zu einem Einwärtsgleichrichter macht (**Abbildung 23 B**). Um die Offenwahrscheinlichkeit zu quantifizieren wurde im Folgenden die Differenz der Offenwahrscheinlichkeit von -160 mV und $+160$ mV bestimmt (**Tabelle 1**).

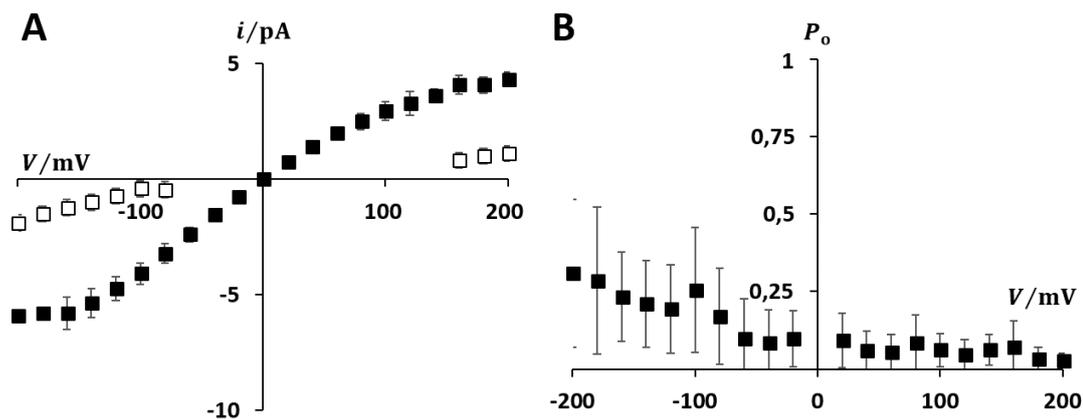


Abbildung 23: Charakterisierung des $Kmpv_{12T}$ in Membranen aus DPhPC auf Einzelkanalbasis am Planaren Lipid Bilayer. A i/V Kurve der hohen Leitfähigkeit in Schwarz und i/V Kurve der Unterleitfähigkeit in Weiß. B Offenwahrscheinlichkeiten der hohen Leitfähigkeit. Alle Datenpunkte und Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen.

Tabelle 1: Mittlere Leitfähigkeiten und mittlere Offenwahrscheinlichkeiten von Kcv_{NTS} und Kcv_S , sowie mittlere Leitfähigkeiten und Offenwahrscheinlichkeitsdifferenzen von $Kmpv_{12T}$ in reinen DPhPC Membranen der PLB Methode. Die Markierungen der Kanäle entsprechen den Symbolen der Graphen in den zugehörigen Abbildungen.

	$\triangle Kcv_{NTS}$ (n=6)		$\bullet Kcv_S$ (n=10)		$\blacksquare Kmpv_{12T}$ (n=10)	
	\bar{G}/pS	\bar{P}_o	\bar{G}/pS	\bar{P}_o	\bar{G}/pS	ΔP_o
DPhPC	$81,7 \pm 12,3$	$0,92 \pm 0,02$	$92,4 \pm 9,4$	$0,36 \pm 0,14$	$36,6 \pm 4,7$	$0,18 \pm 0,13$

3.2 Etablierung der *in vitro* Expressionsmethode und Überprüfung ihrer Anwendbarkeit auf Protein-Lipid-Untersuchungen mit Hilfe der *Contact Bubble Bilayer* Methode

Eine weitere Technik zur Charakterisierung von Ionenkanälen in artifiziellen Membranen, ist die *Contact Bubble Bilayer* Methode (CBB). Vorteile ihrer Verwendung sind die größere Variabilität an Lipiden, mit denen Experimente möglich sind, eine einfachere Herstellung asymmetrischer *Bilayer*, sowie die während des Experiments veränderbare *Bilayer* - Größe. Nachteilig ist allerdings die Instabilität und Variabilität der physikalischen Parameter der Membranen (Iwamoto & Oiki, 2018).

Die PLB sowie die CBB Methode bieten sich an, mit ihnen *in vitro* exprimierte Ionenkanäle elektrophysiologisch zu untersuchen. Um die Kanäle in einer möglichst natürlichen Umgebung, d.h. in einer Membranumgebung, aber dennoch *in vitro* zu exprimieren wurden sie wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, in Anwesenheit von Nanodisks exprimiert.

In diesem Kapitel wurde mit der CBB Methode getestet, ob die Anwendung dieser Expressionsmethode für verschiedene Kanalproteine möglich ist. Ebenso wurde evaluiert ob sich die Expressionsmethode in Verbindung mit der PLB und CBB Technik für die Untersuchung von Protein- /Lipidinteraktionen eignet. Im zweiten Teil des Kapitels wurde evaluiert ob sich beide Methoden im gleichen Maße für die Untersuchung von Protein-Lipid-Interaktionen eignen.

3.2.1 Eignet sich die *in vitro* Synthese viraler Kaliumkanäle in Nanodisks zur Untersuchung von Protein-Lipid-Interaktionen?

Damit beide Methoden (PLB und CBB) genutzt werden können, um Protein-Lipid-Interaktionen zu untersuchen, muss zunächst sichergestellt werden, dass sich die zu untersuchenden Ionenkanäle wirklich in der Ziellmembran befinden. Dies wurde mithilfe der *Contact Bubble Bilayer* Methode untersucht.

Die Kanalproteine wurden in der Vergangenheit mittels eines kommerziell erhältlichen *in vitro* Expressionssystems (MembraneMax™ HN Protein Expression Kit; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) in Anwesenheit von sogenannten Nanodisks exprimiert, um die langwierige Expression und Aufreinigung von Proteinen zu umgehen. Nanodisks sind kleine *Bilayerpatches*, die von einem Gerüstprotein (*scaffold protein*) umschlossen sind (Kapitel 2.1.2) (Bayburt et al., 1998). Bei der *in vitro* Expression eines Kanals in Anwesenheit solcher Nanodisks faltet sich das Protein korrekt und baut sich als funktionelles Oligomer, im Falle von Kaliumkanälen als Tetramer, in die Membran ein.

Da sich die Kanäle daher nicht in Liposomen oder frei in Lösung befinden, muss evaluiert werden, ob die Kanäle die Nanodisk beim Einbau in den *Bilayer* verlassen oder ob sie sich samt Membran - *patch* und *scaffold protein* in den Ziel - *Bilayer* einbauen.

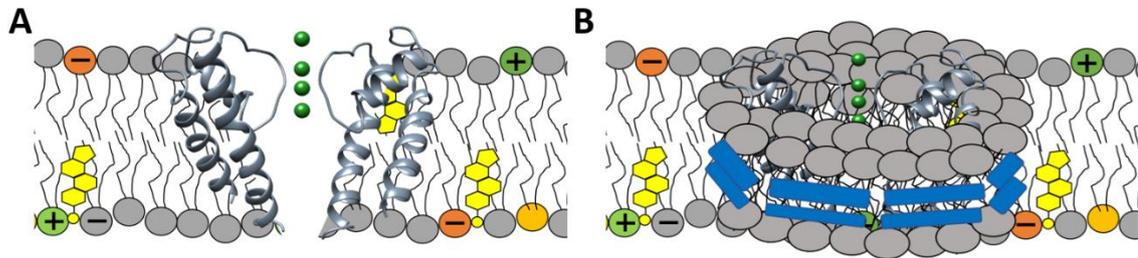


Abbildung 24: Mögliche Einbauarten eines Kanals der zuvor in Nanodisks exprimiert wurde in den *Bilayer*. A Der Ionenkanal verlässt die Nanodisk und baut sich direkt in den Ziel - *Bilayer* ein (K_{cvNTS}). B Die gesamte Nanodisk inklusive Ionenkanal (K_{cvNTS}) inseriert in den *Bilayer*.

Die im *in vitro* Expressionssystem beigefügten Nanodisks enthalten das Lipid 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) und werden im Folgenden aufgrund des Herstellernamens als MM (*Membrane Max*) bezeichnet.

Um festzustellen, ob eine erfolgreiche Expression der Kanalproteine von der Membran in den Nanodisks beeinflusst wird, wurden weitere DMPC Disks von einem anderen Hersteller und Nanodisks mit anderen Lipiden (POPC und DMPG) verwendet (Cube Biotech, Monheim, Deutschland). Der Kaliumkanal K_{cvNTS} wurde dazu *in vitro* in Anwesenheit der unterschiedlichen Nanodisks (MM, DMPC, POPC und DMPG) exprimiert und mit der CBB Methode elektrophysiologisch charakterisiert. Die funktionellen Daten wurden anschließend bezüglich ihrer Vergleichbarkeit in unterschiedlichen Disks untersucht (Winterstein et al., 2018).

Wie in **Abbildung 25** deutlich zu erkennen ist, hat die Expression in verschiedenen Nanodisks keine Auswirkungen auf die funktionellen Eigenschaften von Kcv_{NTS} in DPhPC Membranen. Die Stromspuren der repräsentativen Einzelkanalmessungen zeigen sehr ähnliche Offenkanalamplituden, Geschlossenzeiten und das charakteristischen Flicker - *Gating* bei negativen Spannungen.

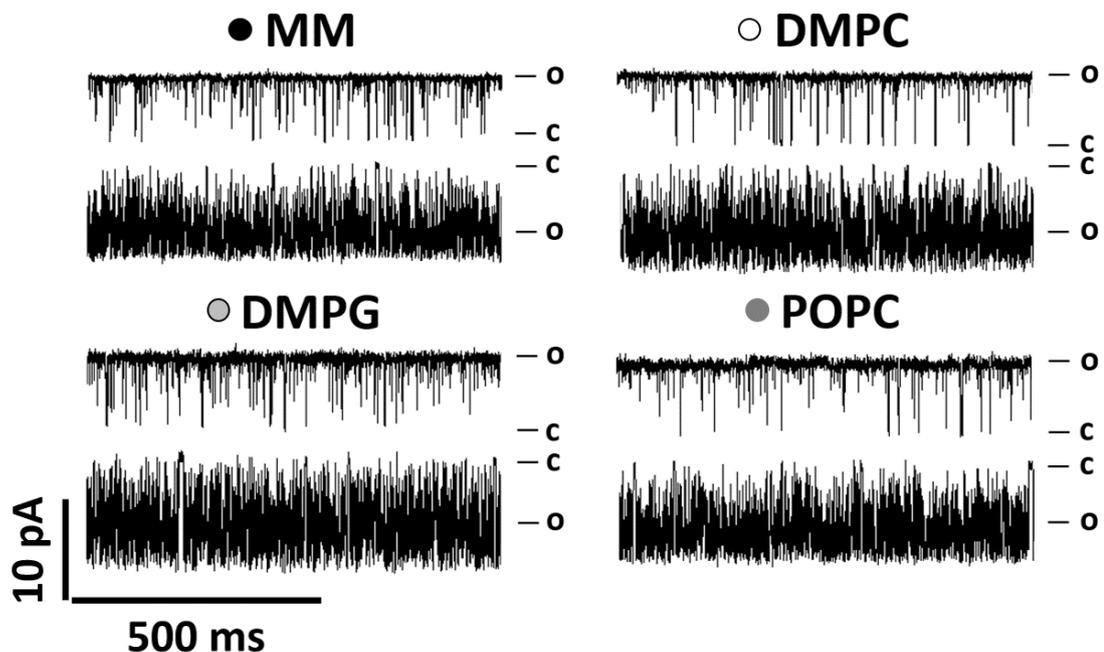


Abbildung 25: Kcv_{NTS} konnte erfolgreich in verschiedenen Nanodisks exprimiert werden und zeigt identisches Schaltverhalten in DPhPC Membranen der *Contact Bubble Bilayer* Methode. Die charakteristischen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 100 mV aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen- und o das Offenniveau des Kanals.

Die Leitfähigkeiten im linearen Kurvenbereich von -60 mV bis +60 mV und die mittleren Offenwahrscheinlichkeiten sind nicht signifikant unterschiedlich (**Abbildung 26**). Die exakten Zahlenwerte sind der **Tabelle 2** am Ende des Kapitels zu entnehmen.

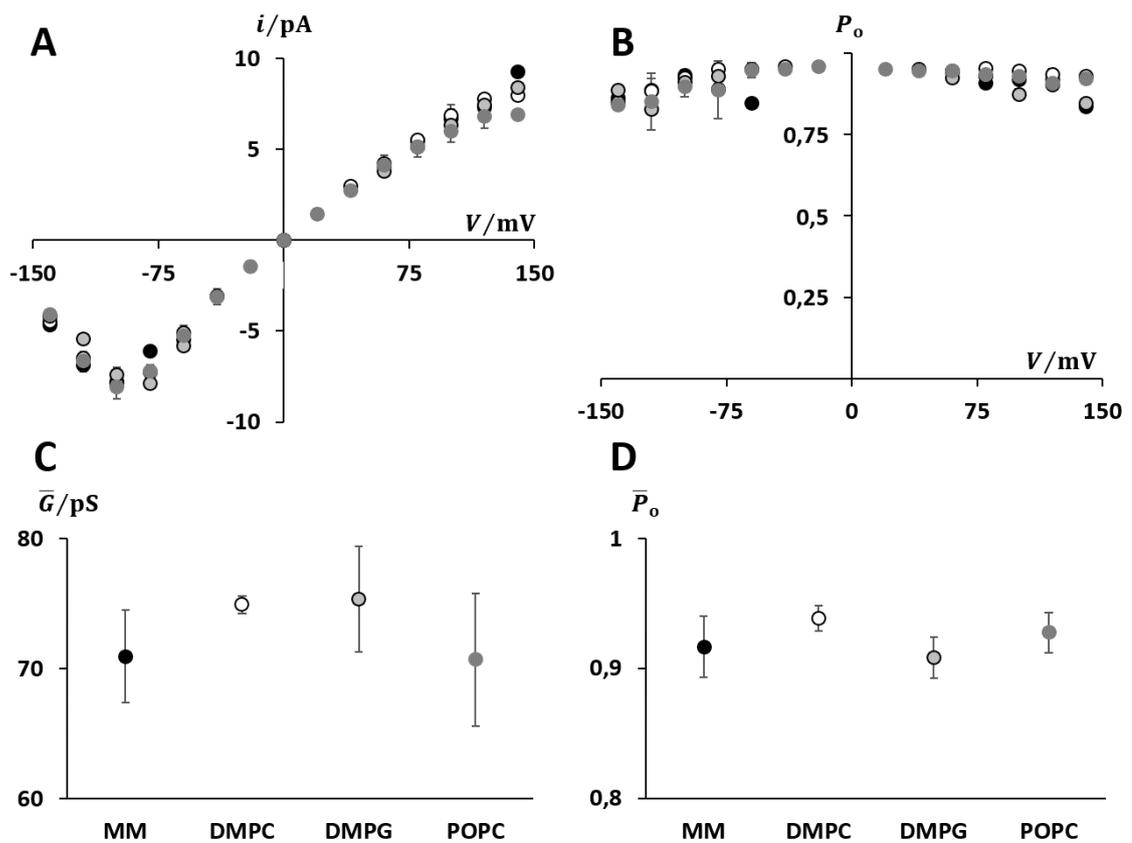


Abbildung 26: Die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kaliumkanals Kcv_{NTS} (CBB) verändern sich nicht durch die Art der Nanodisk (MM, DMPC, DMPG und POPC), in der er exprimiert wurde. **A** i/V Kurven. **B** Offenwahrscheinlichkeiten. **C** gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV sowie mittlere Offenwahrscheinlichkeiten (**D**) von Kcv_{NTS} aus verschiedenen Nanodisks. Jeder Datenpunkt und dessen Standardabweichung stammt aus mind. drei unabhängigen Messungen der *Contact Bubble Bilayer* Methode. Die Symbole aus **A** und **B** entsprechen denen in **C** und **D**.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression und korrekte Faltung von Kcv_{NTS} unabhängig von den in den Nanodisks vorhandenen Lipiden möglich ist (**Abbildung 26**). Identische Versuche mit der Planaren Lipid *Bilayer* Methode (Winterstein et al., 2018) führten zwar zu dem Schluss, dass die Expressionseffizienz im Falle von Kcv_{NTS} mit der Nutzung unterschiedlicher Disk - Lipide variiert, die Funktion jedoch nicht beeinflusst wird.

Die Tatsache, dass der Kanal unabhängig von der Disk - Membran in der Zielmembran aus DPhPC identische Funktionseigenschaften (**Abbildung 25** und **Abbildung 26**) aufweist, lässt zwei mögliche Schlüsse zu: Dass das Kanalprotein aus der Nanodisk ohne das *scaffold protein* in die Zielmembran übertritt, oder dass sich der Kanal samt Nanodisk und Gerüstprotein in die Ziel - Membran einbaut, wobei jedoch die unterschiedlichen Membranen der Disks keinen Einfluss auf die Funktion des Kanals haben.

Tabelle 2: Mittlere Leitfähigkeiten und mittlere Offenwahrscheinlichkeiten von Kcv_{NtS} aus verschiedenen Nanodisks. Die Markierungen der Diskzusammensetzungen entsprechen denen in Abbildung 25 und Abbildung 26.

Kcv _{Next to Smith}		
Lipid der Nanodisk	\bar{G}/pS	\bar{P}_o
● MM (n = 4)	71 ± 3,5	0,92 ± 0,02
○ DMPC (n = 7)	75 ± 0,7	0,94 ± 0,01
◐ DMPG (n = 4)	75,4 ± 4,1	0,91 ± 0,02
● POPC (n = 5)	70,7 ± 5,1	0,93 ± 0,02

3.2.1.1 In MM - Disks exprimierte Kir_{2.1} Kanäle führen zu distinktem Kanalschalten in PIP₂ enthaltenden DPhPC Membranen der CBB Methode

Um zwischen den beiden genannten Alternativen unterscheiden zu können, wurde der humane Kaliumkanal Kir_{2.1} in MM Disks exprimiert und mithilfe der CBB Methode untersucht. Hierbei wurden Liposomen aus DPhPC verwendet, die 1 mol% PIP₂ enthalten. Kir_{2.1} sollte in diesem Versuchsaufbau nur funktional sein, sofern er die Nanodisk verlässt und in die Zielmembran inseriert, da nur dort das PIP₂ vorhanden ist, das er für seine grundlegende Funktionalität benötigt (Hansen, 2015).

In **Abbildung 27** ist zu erkennen, dass das Kanalprotein Kir_{2.1} in MM Nanodisks mit der *Contact Bubble Bilayer* Methode zu distinktem Kanalschalten führen.



Abbildung 27: Der humane Kaliumkanal Kir_{2.1} aus MM Disks ist funktional. Die charakteristischen Einzelkanalströme von Kir_{2.1} in DPhPC + 1 mol% PIP₂ Membranen der CBB Methode wurden bei einer angelegten Haltespannung von ±120 mV aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen- und o das Offenniveau des Kanals.

Kir_{2.1} (n = 7) zeigt seine für ihn charakteristischen geringen Stromamplituden (Abbildung 27), die aus der geringen Leitfähigkeit von nur 13,7 pS ± 3 pS (Abbildung 28 A) resultieren (Binda et al., 2018) und eine über den gesamten Spannungsbereich sehr hohe Offenwahrscheinlichkeit von über 90% (Abbildung 28 B). Aufgrund fehlenden Magnesiums oder Spermidin verhält sich der Kanal nicht einwärtsgleichrichtend und weist einen linearen Verlauf der *i/V* Kurve auf.

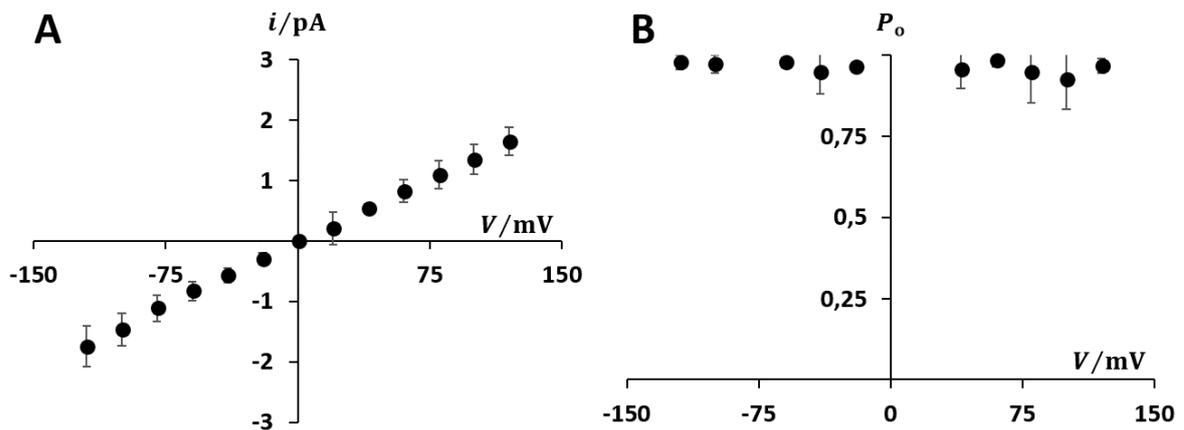


Abbildung 28: Der humane Kaliumkanal Kir_{2.1} aus MM Disks verhält sich aufgrund fehlenden Magnesiums oder Spermidin in der Messlösung nicht einwärtsgleichrichtend und besitzt eine hohe Offenwahrscheinlichkeit. A *i/V* Kurve. B Offenwahrscheinlichkeiten. Alle Datenpunkte und dessen Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen der *Contact Bubble Bilayer* Methode.

Dieses Verhalten von Kir_{2.1} ist ein Indiz dafür, dass ein Membranwechsel für diverse Ionenkanäle möglich ist.

Offen bleibt dennoch, ob die Kanäle aus der Disk direkt in den Ziel - *Bilayer* inseriert oder über die Liposomen an die *Bubble* - Oberfläche tritt (Iwamoto & Oiki, 2015). Da für diese Arbeit nur wichtig ist, ob die zu untersuchenden Kanäle die Eigenschaften der Zielmembran spüren oder nicht, wurde dieser Aspekt nicht weiter untersucht.

3.2.1.2 Die CBB Methode eignet sich ebenfalls zur Untersuchung von bakteriellen Kaliumkanälen

Nachdem gezeigt wurde, dass die *Contact Bubble Bilayer* Methode mit der beschriebenen Expressionsmethode diskunabhängig für virale sowie humane Kanäle (Kir_{2.1}) funktioniert, sollte weiterhin untersucht werden, ob dies ebenso für bakterielle Kanäle gilt. Dies konnte anhand der nicht inaktivierenden Mutante E71A des Modellkanals KcsA untersucht werden (Cordero-Morales et al., 2007).

Bereits mit der herkömmlichen Planaren Lipid *Bilayer* Methode konnte gezeigt werden, dass sich der Kaliumkanal KcsA_{E71A} in allen genannten Disks exprimieren lässt und ebenso keine Unterschiede in seiner Funktionalität zu erkennen sind (Winterstein et al., 2018). Auffällig ist die Tatsache, dass die KcsA_{E71A} Kanalkonzentration nach der Expression deutlich geringer ist oder der Einbau des Kanals in den Ziel-*Bilayer* ineffizienter ist, als der der viralen Kaliumkanäle. Dennoch inserierte der Kanal aus allen Disks in die CBB Membranen, wodurch exemplarische Stromantworten aufgenommen werden konnten (**Abbildung 29**).

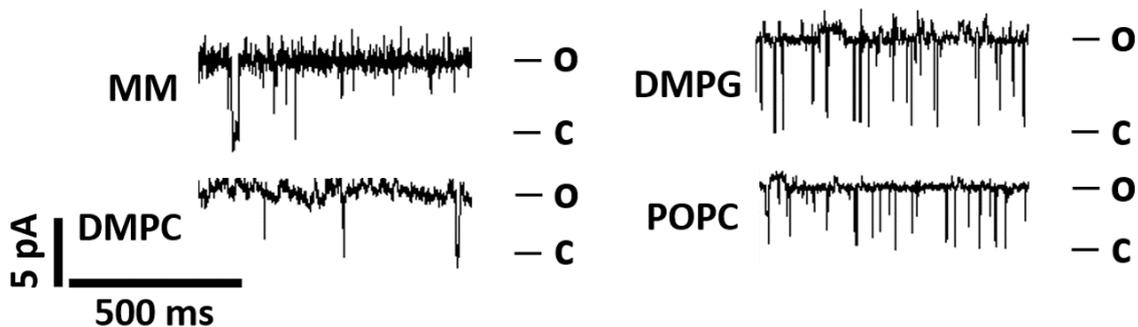


Abbildung 29: Repräsentative Einzelkanalströme des bakteriellen Modellkanals KcsA E71A aus vier verschiedenen Nanodisks, zeigen kaum Unterschiede im Schaltverhalten. Die repräsentativen Stromspuren stammen aus DPhPC Membranen der CBB Methode in 100 mM KCl, 10 mM Hepes (pH 4) bei einer Haltespannung von 100 mV. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen- und o das Offenniveau des Kanals.

Um zu zeigen, dass die hier beschriebene Expressionsmethode nicht nur für Kaliumkanäle verschiedenen Ursprungs funktionell ist, wurde in einer Kollaboration mit D.L. Turman aus dem Labor von Chris Miller gezeigt, dass sie ebenfalls auf einen besonderen Fluoridkanal (Fluc-Ec2) anwendbar ist, dessen Monomere sich bidirektional in die Membran einbauen (Winterstein et al., 2018). Dies legt die Vermutung nahe, dass das hier beschriebene Expressionssystem für den Großteil an Kanalproteinen geeignet ist.

3.2.1.3 Direkte Expression des Kaliumkanals Kcv_{NTS} im *Contact Bubble Bilayer* System

Wie auch zuvor in *Droplet Interface Bilayers* gezeigt (Bayley et al., 2008), besteht die Möglichkeit der direkten Expression von Ionenkanälen nach *in vitro* Transkription und Translation in den *Bubbles*, die im *Contact Bubble Bilayer* System benutzt werden. Dies bietet die Möglichkeit, auf eine aufwendige Aufreinigung der Proteine oder auf die Benutzung von Nanodisks zu verzichten und den Kanal direkt in die anwesenden Liposomen oder den *Bilayer* zu exprimieren. Dies kann von Vorteil sein, wenn ein Kanalprotein bestimmte Lipide oder Lipidverteilungen für seine Expression benötigt, die in herkömmlichen Nanodisks nicht

verfügbar sind. Im Prinzip kann mit Hilfe eines solchen Expressionssystems auch die Kinetik der Kanalsynthese *in vitro* auf Einzelproteinebene aufgelöst werden. Für die Expression wird eine kleine Menge des Expressionsansatzes ohne Nanodisks zur Messlösung hinzugegeben. Nach Bildung eines *Bilayers* wird bei Raumtemperatur und einer niedrigen Spannung über die Membran gewartet, bis das erste Kanalschalten erkennbar ist. Um das Kanalschalten sowohl bei positiver wie auch bei negativer Spannung zu verfolgen wechselt das Spannungsprotokoll alle 30 Sekunden von +40 mV zu -40 mV.

Abbildung 30 A zeigt den ersten Kanaleinbau nach ungefähr einer Stunde bei -40 mV. Die Offenkanalamplitude von -2,7 pA entspricht der typischen Leitfähigkeit von Kcv_{NTS} bei -40 pA. Das typische Schaltverhalten inklusive des einsetzenden Flicker - *Gatings* bei -80 mV aus **Abbildung 30 B** entspricht eindeutig dem von Kcv_{NTS} .

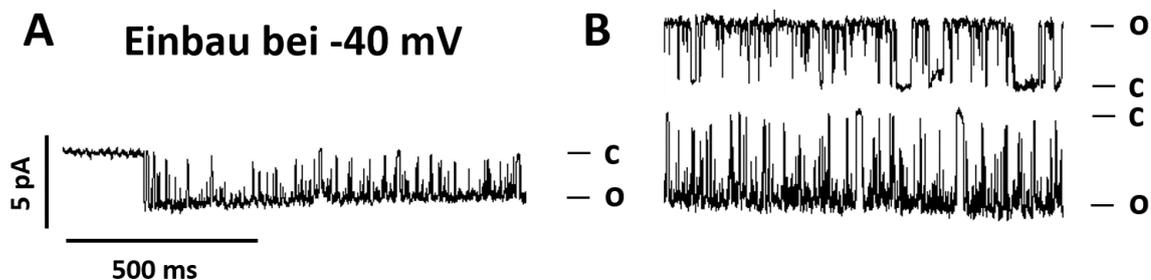


Abbildung 30: Direkter Kanaleinbau des viralen Kaliumkanals Kcv_{NTS} nach Expression in den *Bubbles* der CBB Methode. A erster Kanaleinbau nach ca. 60 Minuten (-40 mV). B zwei charakteristische Stromspuren bei ± 80 mV. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen- und o das Offenniveau des Kanals.

Da sich die Konzentration der exprimierten Kanäle stetig erhöht, wird es mit fortlaufender Zeit schwer, Messungen auf Einzelkanalbasis durchzuführen. Die Daten belegen, dass es mit dieser Technik möglich ist die Expressionsdynamik von Kanälen zu messen und zu vergleichen, sowie zellfreie Mehrkanalmessungen durchzuführen.

3.2.2 Elektrophysiologische Untersuchungen mit der *Contact Bubble Bilayer* Methode und der Planaren Lipid *Bilayer* Methode führen zu ähnlichen Ergebnissen

Eine effiziente, gut untersuchte und seit mehr als 50 Jahren etablierte Technik zu funktionellen Rekonstitution von Ionenkanälen ist die bereits angesprochene Planare Lipid *Bilayer* Methode (PLB) (Montal & Mueller, 1972) (Kapitel 2.2.1). Bei dieser Methode wird ein *Bilayer* über ein ca. 100 μm großes Loch in einem Teflonseptum gespannt, welches zwei mit Elektrolytlösung

gefüllte Kammern voneinander trennt (siehe Material und Methoden). Da es mit manchen Lipiden sehr schwer ist, *Bilayer* mit der Planaren Lipid *Bilayer* Methode aufzuspannen, ist es unter Umständen vonnöten auf die *Contact Bubble Bilayer* Methode auszuweichen. Das gleiche gilt für asymmetrische Membranen, die mit der konventionellen PLB Methode nur sehr schwer zu realisieren sind.

Die wechselseitige Anwendung beider Methoden im gleichen Maße ist jedoch nur vertretbar, sofern beide Systeme ähnliche Ergebnisse liefern. Um festzustellen, ob die *Contact Bubble Bilayer* Methode für die Untersuchung von Kanalproteinen genauso geeignet ist wie die Planare Lipid *Bilayer* Methode, wurde die Funktion der Kanäle mit beiden Messmethoden miteinander verglichen.

Die Funktion von Kcv_{NTS} (oben) und Kcv_S (unten) in beiden Messsystemen unterscheidet sich nicht wesentlich voneinander (**Abbildung 31**). Die Offenkanalamplitude von beiden Kanälen ist unter Anwendung der *Contact Bubble Bilayer* Methode (**Abbildung 31** links) bei positiven Spannungen durch ein einsetzendes schnelles *Gating* etwas geringer als in Membranen der PLB Methode (**Abbildung 31**). Im Gegensatz dazu tritt das *Flicker - Gating* im negativen Spannungsbereich bei beiden Kanälen verspätet auf, was die Offenkanalamplitude beider Kanäle etwas erhöht (**Abbildung 31**). Bezüglich der Offenwahrscheinlichkeit sind weder bei Kcv_{NTS} noch bei Kcv_S systemübergreifende Unterschiede anhand der Stromspurenbilder in **Abbildung 31** zu erkennen.

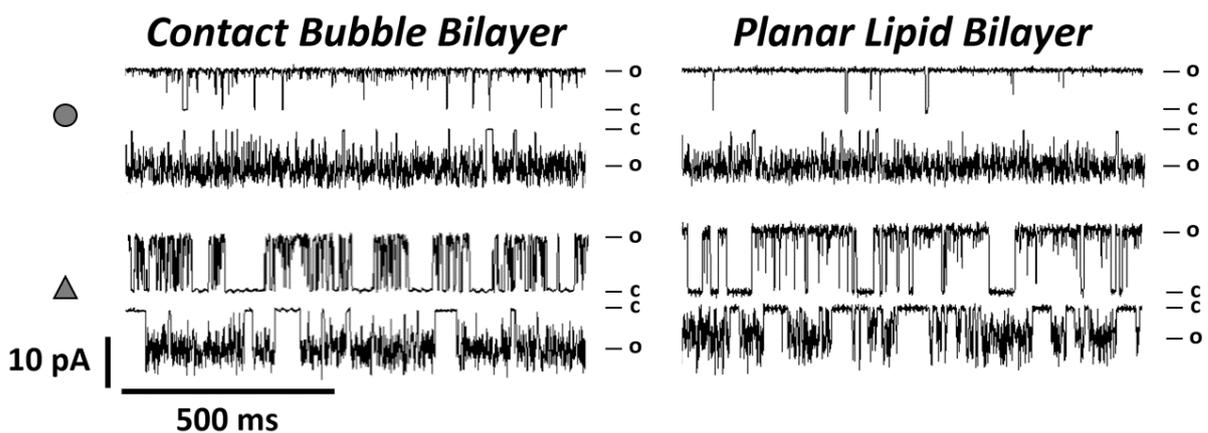


Abbildung 31: Beide Kcv - Kanäle sind mit der Planaren Lipid und der *Contact Bubble Bilayer* Methode messbar und zeigen vergleichbare Schaltverhalten. Die charakteristischen Einzelkanalströme von Kcv_{NTS} (oben) und Kcv_S (unten) wurden einer angelegten Haltespannung von ± 100 mV aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen- und o das Offenniveau des Kanals.

Wie bereits angedeutet, ist der auffälligste Unterschied zwischen den Ergebnissen beider Messsysteme der Stromabfall bei angelegten Spannungen $\geq +120$ mV, der sich bei beiden Kanälen durch die Verwendung CBB Methode zeigt (**Abbildung 31**). Deutlich wird er anhand der i/V - Kurven in **Abbildung 32 A** ($K_{CV_{NTS}}$) und **C** (K_{CV_S}). Dies ist wahrscheinlich durch die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften von freischwebenden CBBs und fixierten PLBs bedingt (Freeman, Najem, Sukharev, Philen, & Leo, 2016). In **Abbildung 32 A** und **C** ist erkennbar, dass die Leitfähigkeiten beider Kcv - Kanäle im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV bei der CBB Methode erhöht sind, der Unterschied jedoch nicht signifikant ist (**Abbildung 32 E**). Die Offenwahrscheinlichkeiten sind methodenübergreifend nur geringfügig verschieden. $K_{CV_{NTS}}$ zeigt in **Abbildung 32 B** jedoch einen Abfall der Offenwahrscheinlichkeit bei positiven Spannungen, was zu einer signifikant verringerten mittleren Offenwahrscheinlichkeiten führt (**Abbildung 32 F**). K_{CV_S} hingegen weist mit zunehmend positiveren Spannungen eine ansteigende Offenwahrscheinlichkeit auf, was dennoch zu keiner signifikanten Erhöhung der mittleren Offenwahrscheinlichkeit führt (**Abbildung 32 E**). Die Zahlenwerte sind der **Tabelle 3** am Ende des Kapitels zu entnehmen.

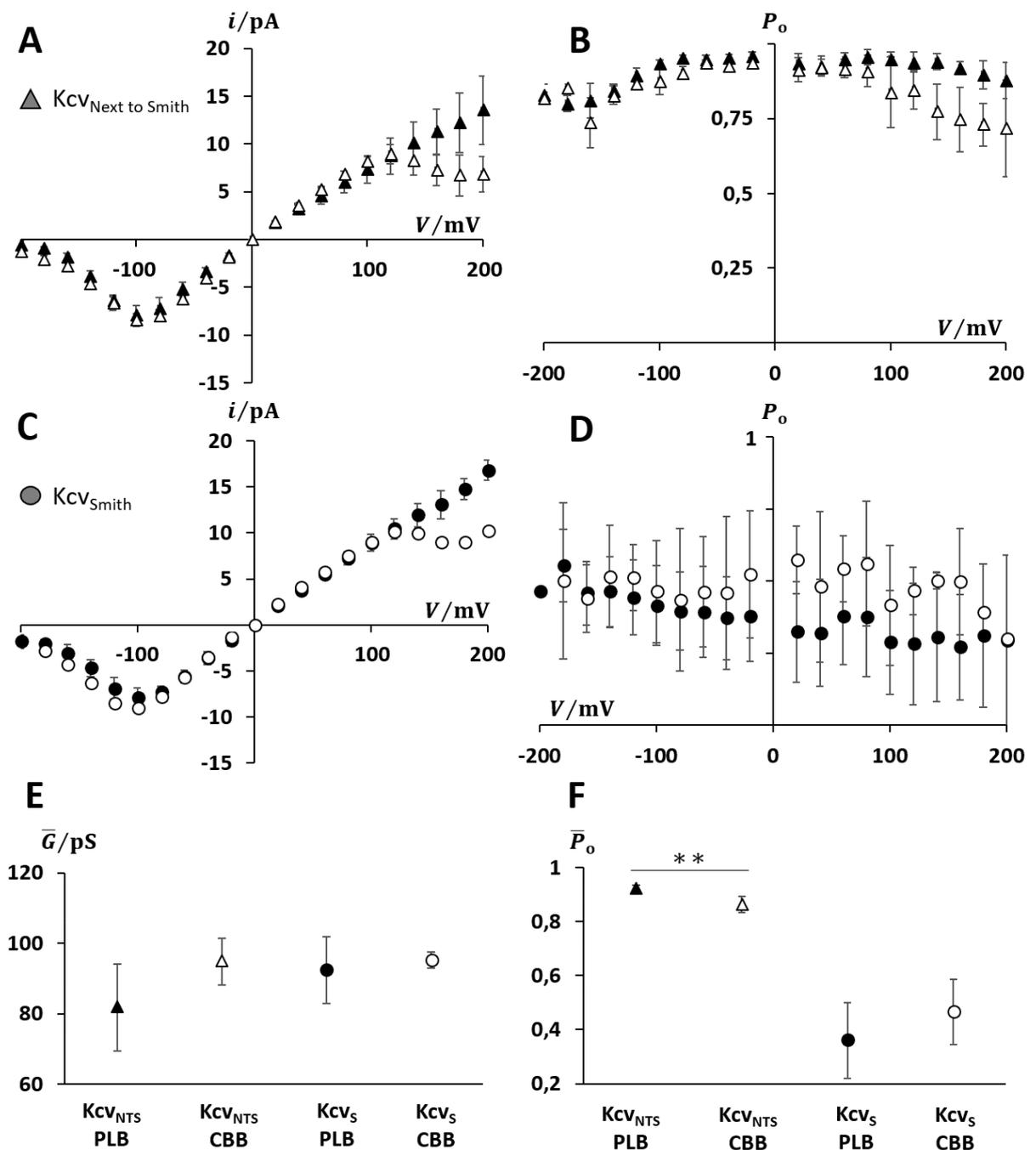


Abbildung 32: Die elektrophysiologischen Eigenschaften der beiden Kcv - Kanäle Kcv_{NTS} und Kcv_S sind in planaren Lipid *Bilayern* (schwarz) und *Contact Bubble Bilayern* (weiß) ähnlich. A, C i/V Kurven. B, D Offenwahrscheinlichkeiten. E gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV sowie mittlere Offenwahrscheinlichkeiten (F) von Kcv_{NTS} und Kcv_S in PLBs und CBBs. Jeder Datenpunkt und dessen Standardabweichung stammt aus mind. drei unabhängigen Messungen beider Methoden.

Ebenso wie die beiden Kcv - Kanäle kann auch Kmpv_{12T}, mit nur 78 AS pro Untereinheit der kleinste bisher bekannte Kaliumkanal, in CBB Membranen sowie in PLB Membranen untersucht werden. In **Abbildung 33** ist zu sehen, dass das *Gating* des Kanals methodenübergreifend bei negativen Spannungen im weitesten Sinne ähnlich ist. Jedoch sind die kurzen Offenereignisse (**Abbildung 33** rechts oben), die der Kanal in der Planaren Lipid *Bilayer* Methode bei positiven Spannungen zeigt, in Messungen mit der CBB Methode nicht mehr existent. Er weist stattdessen nur noch kleine, aber dennoch deutliche Offenereignisse auf (**Abbildung 33** links oben). Kmpv_{12T} zeigt in beiden Methoden bei negativen Spannungen seine typische Unterleitfähigkeit, die in **Abbildung 33** mit einer roten Linie gekennzeichnet ist.

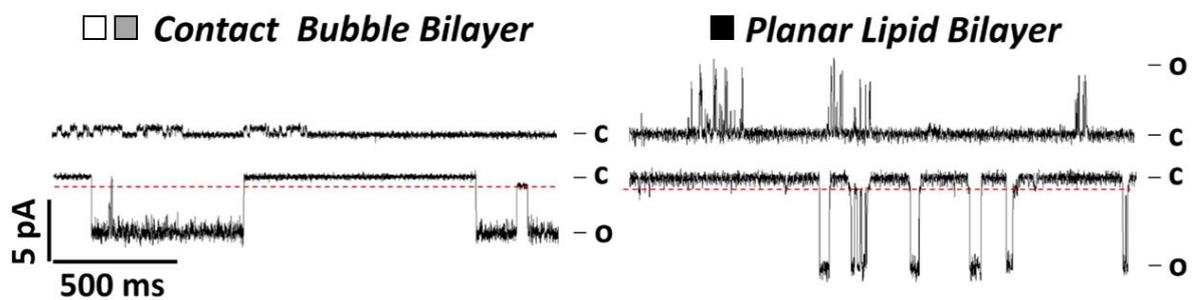


Abbildung 33: Kmpv_{12T} ist mit der Planaren Lipid und der *Contact Bubble Bilayer* Methode messbar zeigt jedoch unterschiedliches Schaltverhalten. Die charakteristischen Einzelkanalströme wurden einer angelegten Haltespannung von ± 160 mV aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen- und o das Offenniveau des Kanals. Die rote Linie markiert die Unterleitfähigkeit.

Kmpv_{12T} zeigt in *Contact Bubble Bilayern* im Vergleich zu PLB Membranen eine deutlich verstärkte Einwärtsgleichrichtung, die sich nicht nur in der Offenwahrscheinlichkeit (PLB), sondern auch im Stromfluss manifestiert (**Abbildung 33** und **Abbildung 34 A**).

Die Amplituden bei positiven Spannungen der CBB Methode sind mit ungefähr 0,5 pA extrem klein und konstant über alle positiven Spannungen (**Abbildung 33** links). Dass die kleinen Amplituden der Unterleitfähigkeit entsprechen ist nicht möglich, da diese wie in **Abbildung 23** zu erkennen mit höheren Spannungen exponentiell ansteigt, was hier nicht der Fall ist (**Abbildung 34 A**).

In **Abbildung 34 C** unterscheiden sich die Steigungen im linearen Bereich der i / V Kurven von -80 mV bis 0 mV beider Methoden zu erkennen, dass sich diese deutlich unterscheiden. Die Offenwahrscheinlichkeitsdifferenz zwischen -140 mV und +140 mV unterscheiden sich methodenübergreifend kaum und zeigen weiterhin eine Spannungsabhängigkeit, was dem zunehmend häufigeren Schalten und den längeren Offenzeiten bei negativen Spannungen

zuzuschreiben ist (Abbildung 34 B und D). Die Zahlenwerte sind der Tabelle 3 am Ende des Kapitels zu entnehmen.

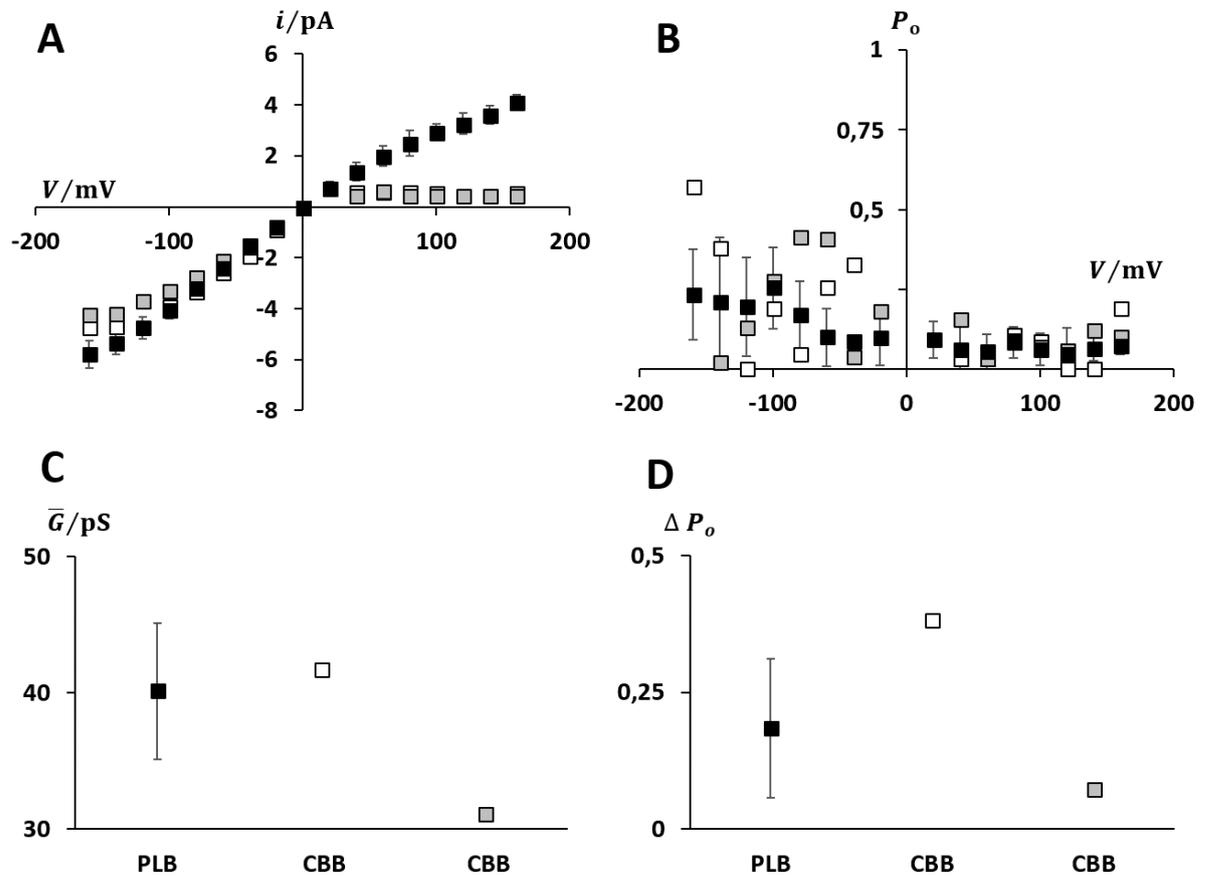


Abbildung 34: $Kmpv_{12T}$ zeigt in CBB Membranen eine deutliche Einwärtsgleichrichtung in der Strom – Spannungsbeziehung sowie eine Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit in beiden Messsystemen. A i/V Kurven. B Offenwahrscheinlichkeiten. C gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von 0 mV bis -80 mV sowie die Offenwahrscheinlichkeitsdifferenzen (D) von +140 mV und -140 mV in PLBs. Die Datenpunkte und dessen Standardabweichungen entstammen aus zehn unabhängigen Messungen. Die beiden Messungen in *Contact Bubble Bilayern* sind einzeln aufgetragen. Die Symbole in A und B entsprechen denen in C und D.

Es ist bereits bekannt, dass einige Mitglieder der $Kmpv$ - Kanalfamilie starke Einwärtsgleichrichter sind, was aus vorrangegangenen *Patch Clamp* Messungen in der *whole - cell* Konfiguration hervorging (Eckert, 2018). Befindet sich $Kmpv_{12T}$ in planaren Lipid Membranen verhält er sich ebenso einwärtsgleichrichtend, jedoch nur durch die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit bedingt. Die physikalischen Eigenschaften der CBB Membranen verstärken die Gleichrichtung des Kanals, indem auch die Leitfähigkeit zur starken Einwärtsgleichrichtung beiträgt (Abbildung 33 und Abbildung 34).

3.2.3 Zusammenfassung

Mit den Versuchen aus Kapitel 3.2 sollte die *Contact Bubble Bilayer* Methode weitergehend etabliert werden und auf ihre Anwendbarkeit für verschiedene Ionenkanäle und Membranen getestet werden. Des Weiteren sollte evaluiert werden, ob die Ergebnisse der CBB Methode und der PLB Methode zu ähnlichen Ergebnissen führen. Ebenso sollte die Eignung dieser Methode für die Untersuchung von Protein-Lipid-Interaktionen geprüft werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die CBB Methode nicht nur mit verschiedenen viralen Kaliumkanälen (Kcv_{NTS} , Kcv_S und Kmp_{V12T}) und mit verschiedenen Nanodisks funktioniert, sondern dass ebenso bakterielle Kanäle wie $KcsA$ und deutlich größere humane Kanäle wie $Kir_{2.1}$ in Nanodisks exprimiert und anschließend elektrophysiologisch charakterisiert werden können. Ebenso lässt sich anhand der Versuche mit dem Kaliumkanal $Kir_{2.1}$ schlussfolgern, dass wahrscheinlich alle Kanäle zum Einbau in den CBB Ziel - *Bilayer* ihre Nanodisks samt Lipidmantel verlassen und somit direkt die zu untersuchende Lipidumgebung wahrnehmen. Ebenso ist es höchst wahrscheinlich, dass der Membranwechsel von den Disks in den Ziel - *Bilayer* ebenso am Planaren Lipid *Bilayer* von statten geht, sodass sich beide Methoden für die Untersuchung von Protein-Lipid-Interaktionen eignen.

Obwohl festgestellt wurde, dass die Messungen der Kanalaktivität mit der Planaren Lipid *Bilayer* Methode und der *Contact Bubble Bilayer* Methode weitgehend zu ähnlichen wenn auch nicht in allen Aspekten identischen Ergebnissen führen, wurden die weiteren Experimente, sofern möglich, in Planaren *Bilayer* durchgeführt.

Dies hat zum einen den Vorteil, dass mit dieser Messmethode stabilere Membranen gebildet, und somit längere Messungen durchgeführt werden können. Des Weiteren ist die Fläche des *Bilayers* im Gegensatz zur CBB Methode bei jeder Messung nahezu identisch. Dadurch wird der Einfluss von unterschiedlichen Membrangrößen, -krümmungen und des lateralen Drucks minimiert. Die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanäle können demnach auf die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der jeweiligen Membran zurückgeführt werden.

Tabelle 3: Mittlere Leitfähigkeiten und mittlere Offenwahrscheinlichkeiten von Kcv_{NTS} und Kcv_S , sowie mittlere Leitfähigkeiten und Offenwahrscheinlichkeitsdifferenzen von $Kmpv_{12T}$ in reinen DPhPC Membran der PLB und CBB Methode. Die Markierungen der Membranzusammensetzungen entsprechen den Symbolen der Graphen in den zugehörigen Abbildungen.

Methode	▲ $Kcv_{Next\ to\ Smith}$		● Kcv_{Smith}		■ $Kmpv_{12T}$	
	\bar{G}/pS	\bar{P}_o	\bar{G}/pS	\bar{P}_o	\bar{G}/pS	ΔP_o
▼ <i>Planare Lipid Bilayer</i>	81,7 ± 12,3	0,92 ± 0,02	92,4 ± 9,4	0,36 ± 0,14	36,6 ± 5	0,18 ± 0,13
▽ <i>Contact Bubble Bilayer</i>	94,8 ± 6,6	0,86 ± 0,03	95,2 ± 2,2	0,47 ± 0,12	41,7 / 33,6	0,11 / 0,21

3.3 Protein-Lipid-Interaktionen der viralen Kaliumkanäle Kcv_{NTS} , Kcv_S und $Kmpv_{12T}$ in ungeladenen Membranen mit verschiedenen Fettsäureketten

Wie bereits beschrieben, kann eine Membran und deren Zusammensetzung verschiedene Auswirkungen auf Ionenkanäle haben. In diesem Kapitel soll der Einfluss der Fettsäureketten auf die viralen Kaliumkanäle untersucht werden. Diese können durch ihre Länge und ihren Sättigungsgrad die Dicke der Membran bestimmen (Tillman & Cascio, 2003; Yuan et al., 2004), welche mit inkorporierten Kanälen zu einem positiven oder negativen *hydrophobic Mismatch* führen kann (Hertel et al., 2006; Killian, 1998, 2003; Kim et al., 2012). Ionenkanäle können sich vor einem solchen *Mismatch* schützen indem sie durch Deformierung des eigenen Proteinrückgrates den Dickenunterschied (teilweise) ausgleichen. Dies kann zu Funktionsänderungen des Kanals führen (de Planque & Killian, 2003; Killian, 1998). Des Weiteren wird der laterale Druck durch ungesättigte Fettsäuren in einer Membran verändert, was ebenso Auswirkungen auf die Funktion des Kanals haben kann.

Im Fokus der hier durchgeführten Protein-Lipid-Untersuchungen stehen die in Kapitel 3.1 charakterisierten viralen Kaliumkanäle Kcv_{NTS} , Kcv_S und $Kmpv_{12T}$. Es gilt herauszufinden, ob einer oder mehrere dieser Kanäle Funktionsunterschiede durch verschiedene unmethylierte Fettsäureketten zeigen. Diese viralen Kaliumkanäle eignen sich hierfür sehr gut, da sie aufgrund ihrer geringen Größe von max. 82 AS pro Untereinheit komplett in die Membran eingebettet sind und Veränderungen im hydrophoben Bereich der Membran, dadurch erhöhten Einfluss auf sie haben sollten, sofern sie sich wie bereits vermutet aus ihrer Nanodisk ausbauen und in den Ziel - *Bilayer* inserieren.

In einem ersten Schritt wurde in Form einer gemischten Membran aus verschiedenen Phosphocholinen der Einfluss verschiedener Fettsäureketten auf die drei Kanäle untersucht. Im zweiten Teil dieses Kapitels wurden im speziellen die Auswirkungen von längeren und einfach

ungesättigten Lipiden durch Membranen aus POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholin) betrachtet.

3.3.1 Einfluss gemischter Fettsäureketten auf die Leitfähigkeit und das Kanalschalten der viralen Kaliumkanäle K_{CVNTS} , K_{CVS} und K_{MPV12T}

Um einen generellen Eindruck zu bekommen, in wieweit sich die untersuchten Kanäle von unmethylierten Fettsäureketten beeinflussen lassen, wurden diese in Membranen aus Soja - Lecithin untersucht und die Ergebnisse mit denen in methyliertem, synthetisiertem DPhPC Membranen (Kontrollmembran aus Kapitel 3.1) verglichen. Lecithine gehören zu den Phosphoglyceriden und tragen Cholin als Kopfgruppe. Da Cholin als Kation positiv geladen ist und die Phosphatgruppe bei neutralem pH - Wert als Anion vorliegt, ist die gesamte Kopfgruppe zwitterionisch und liegt bei physiologischen Messbedingungen ungeladen vor.

Hierbei galt es festzustellen, ob unterschiedliche Kettenlängen bzw. gesättigte oder ungesättigte Fettsäureketten und dadurch resultierender veränderter lateraler Druck, sowie eine unterschiedliche Dicke der Membran Auswirkungen auf die Kanalfunktion haben. Da das hier verwendete Lecithin ein Gemisch aus verschiedenen Phosphocholinen ist, besteht in Bezug auf die Kopfgruppen kein Unterschied zu DPhPC Membranen, wodurch allein die Veränderungen durch die Fettsäureketten eine Rolle spielen.

K_{CVNTS} ist in der Lage sich in Lecithin Membranen einzubauen und distinktes Kanalschalten zu zeigen (Abbildung 35). Es ist deutlich, dass das *Gating* - Verhalten unverändert bleibt, die Offenkanalamplitude in Lecithin Membranen jedoch erhöht ist.

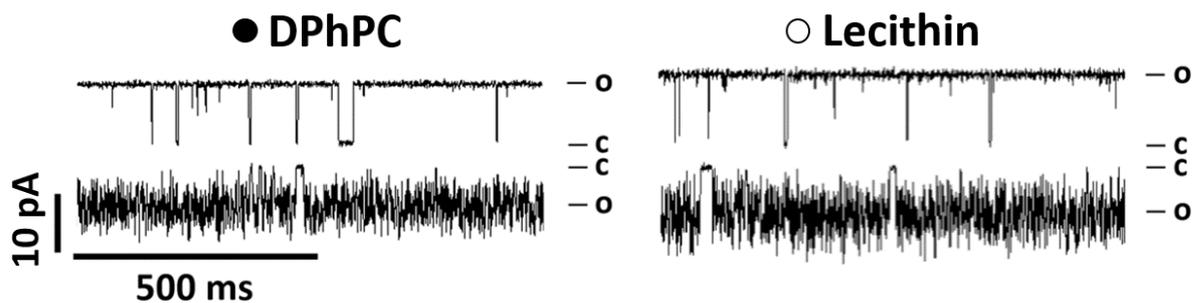


Abbildung 35: K_{CVNTS} ist in Soja - Lecithin Membranen messbar und zeigt ähnliches Schaltverhalten mit erhöhter Offenkanalamplitude. Die charakteristischen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 120 mV mit der PLB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen- und o das Offenniveau des Kanals.

Die in **Abbildung 36 A** dargestellten i/V Kurven sowie die repräsentativen Einzelkanalströme (**Abbildung 35**) zeigen, dass KcV_{NTS} in artifiziellen Membranen aus Soja - Lecithin im Vergleich zu Membranen aus DPhPC eine signifikant erhöhte mittlere Leitfähigkeit (**Abbildung 36 C**) besitzt. Dies ist auf die erhöhten Offenkanalamplituden zurückzuführen die in **Abbildung 35** zu erkennen sind. Ebenso scheint der Kanal in Lecithin Membranen stabiler zu sein, also weniger konformelle Schwankungen zu erleben; die Standardabweichungen, gerade bei positiven Spannungen sind im Vergleich zu denen der DPhPC Messungen, sehr klein. Die mittlere Offenwahrscheinlichkeit in Lecithin - Membranen ist im Vergleich zu DPhPC Membranen unverändert hoch (**Abbildung 36 B und C**). Die exakten Zahlenwerte sind der **Tabelle 4** am Ende des Kapitels zu entnehmen.

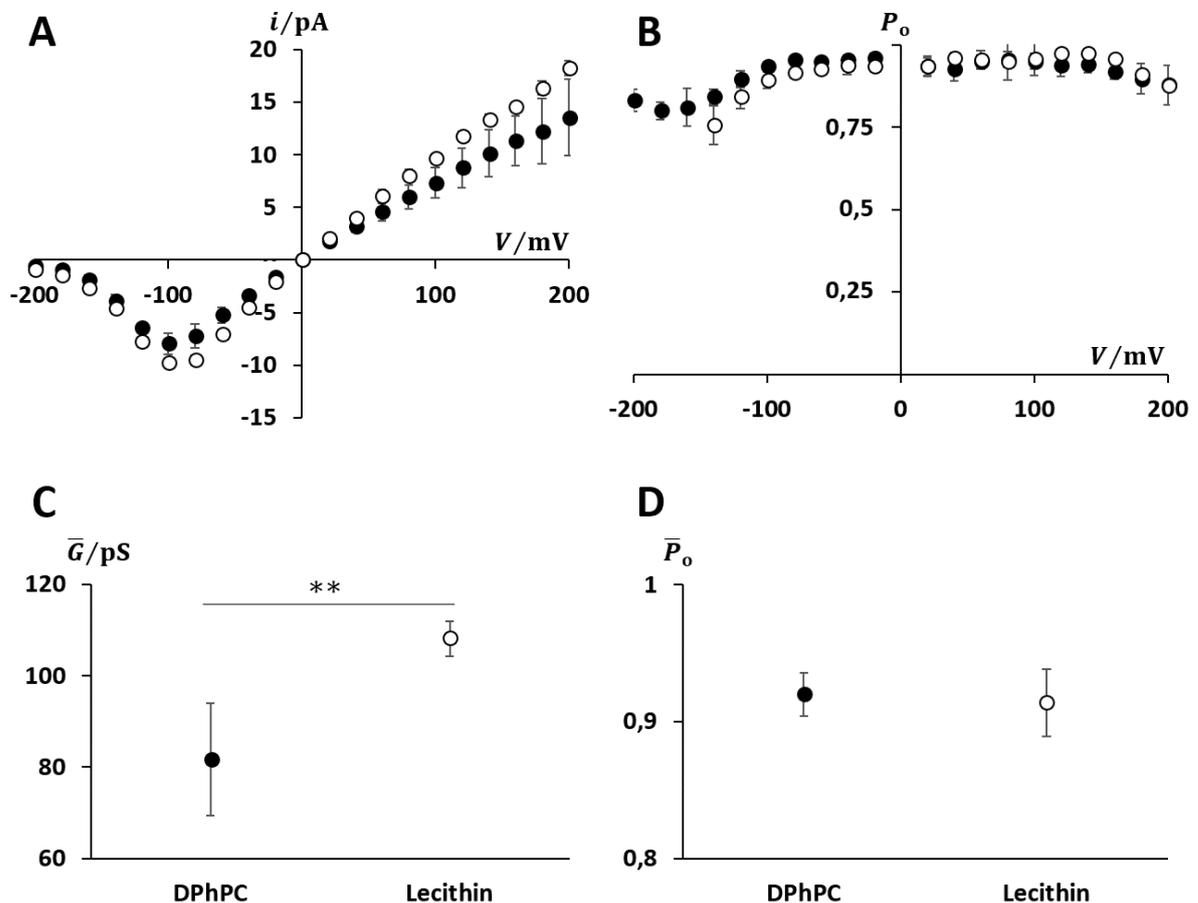


Abbildung 36: Die elektrophysiologischen Eigenschaften des KcV_{NTS} in ungeladenen Soja – Lecithin Membranen zeigen eine erhöhte Leitfähigkeit. **A** i/V Kurven. **B** Offenwahrscheinlichkeiten. **C** gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV sowie mittlere Offenwahrscheinlichkeiten (**D**) in DPhPC und Soja - Lecithin Membranen am PLB. Alle Datenpunkte und Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen. Die Symbole aus **A** und **B** entsprechen denen in **C** und **D**.

Ebenso wie K_{CVNTS} ist auch K_{CVS} in Membranen aus Lecithin funktional und zeigt erhöhte Offenkanalamplituden sowie verkürzte Geschlossenphasen, vor allem bei positiven Spannungen (Abbildung 37).

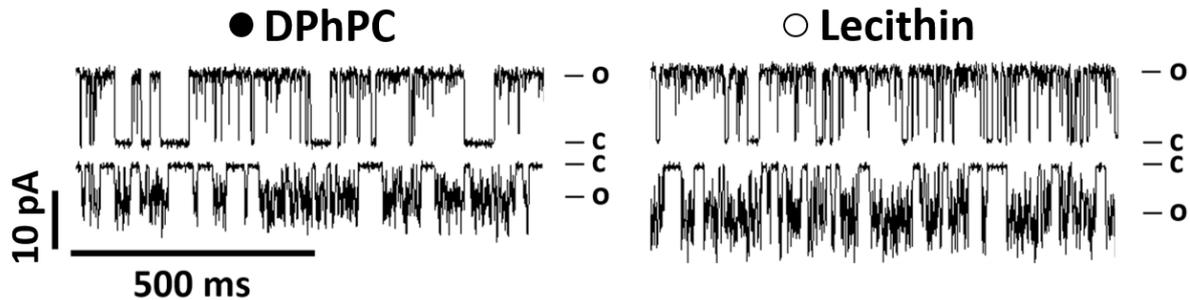


Abbildung 37: K_{CVS} ist in Soja - Lecithin Membranen messbar und zeigt ähnliches Schaltverhalten mit erhöhter Leitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit. Die charakteristischen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 120 mV mit der PLB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen- und o das Offenniveau des Kanals.

In **Abbildung 38 A** ist zu erkennen, dass die Offenkanalamplitude in Lecithin Membranen bei negativen Spannungen im Vergleich zu DPhPC Membranen einen höheren Anstieg zeigen als bei positiven Spannungen. Dies führt zu einer erhöhten Leitfähigkeit, die jedoch aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht signifikant ist (**Abbildung 38 C**). Die Offenwahrscheinlichkeit steigt im Gegensatz zu reinen DPhPC Membranen mit zunehmenden positiven Spannungen in Lecithin Membranen (**Abbildung 38 B**). Dies spiegelt sich in einer, im Vergleich zu reinen DPhPC Membranen, signifikant erhöhten mittleren Offenwahrscheinlichkeit von K_{CVS} in Soja - Lecithin Membranen wider (**Abbildung 38 D**). Die exakten Zahlenwerte sind der **Tabelle 4** am Ende des Kapitels zu entnehmen.

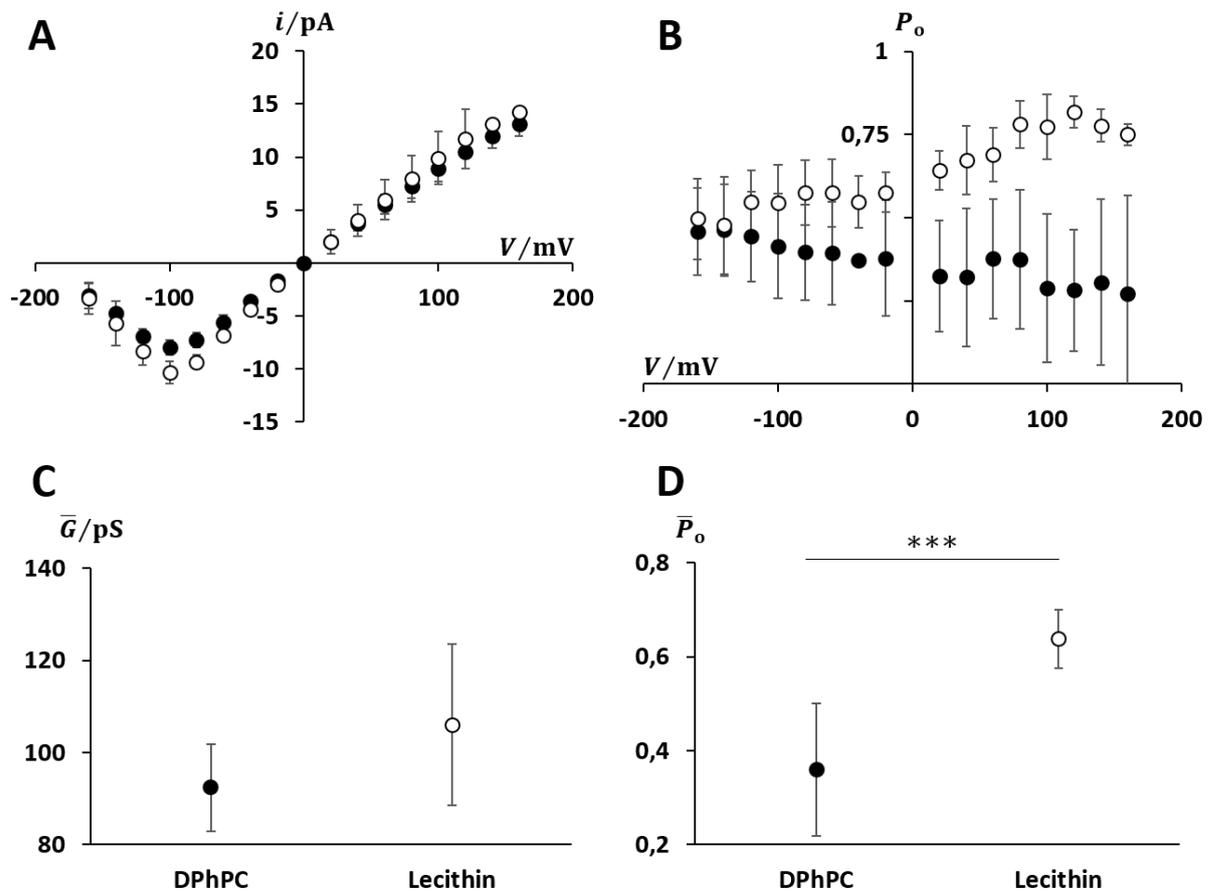


Abbildung 38: Die elektrophysiologischen Messergebnisse des Kcv_S in Soja – Lecithin Membranen zeigen eine deutlich erhöhte Offenwahrscheinlichkeit, sowie eine in geringem Maße erhöhte Leitfähigkeit. **A** i/V Kurven. **B** Offenwahrscheinlichkeiten. **C** gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis $+60$ mV sowie mittlere Offenwahrscheinlichkeiten (**D**) in DPhPC und Soja - Lecithin Membranen am PLB. Alle Datenpunkte und Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen. Die Symbole aus **A** und **B** entsprechen denen aus **C** und **D**.

Beide Kcv - Kanäle lassen sich in Membranen aus Soja - Lecithin untersuchen (**Abbildung 35**; **Abbildung 37**). Genauere Analysen zeigen, dass bei beiden Kanälen die Leitfähigkeit in diesen Membranen im Vergleich zu DPhPC Membranen erhöht ist (**Abbildung 36 A** und **C**; **Abbildung 38 A** und **C**). Die mittleren Offenwahrscheinlichkeiten sind von Kcv_{NTS} unverändert, von Kcv_S hingegen signifikant erhöht (**Abbildung 36 B** und **D**; **Abbildung 38 B** und **D**).

In einem weiteren Versuch wurde der kleinste Kaliumkanal Kmp_{V12T} ebenfalls in Membranen aus Soja - Lecithin untersucht. Anhand **Abbildung 39** ist erkennbar, dass sich Kmp_{V12T} trotz seiner geringen Größe in Soja - Lecithin Membranen einbaut und das Schaltverhalten zu dem in reinen DPhPC Membranen sehr ähnlich ist. Ebenso ist die Unterleitfähigkeit bei negativen Spannungen deutlich erkennbar.

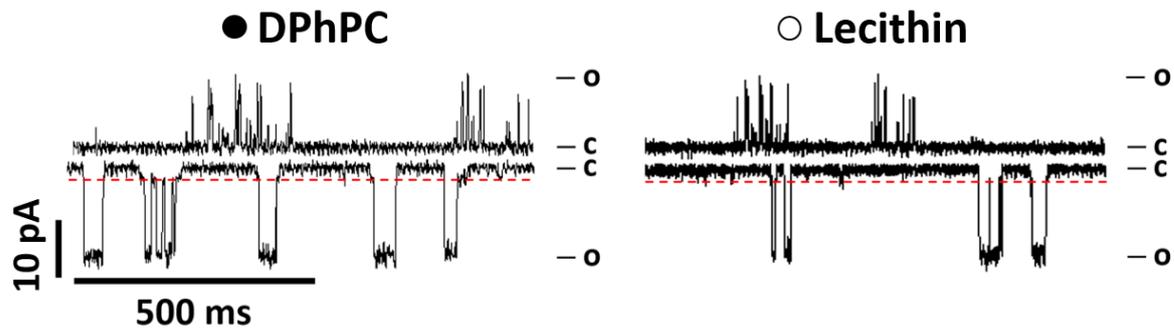


Abbildung 39: Kmp_{V12T} ist in Soja - Lecithin Membranen messbar und zeigt ähnliches Schaltverhalten mit geringeren Offenwahrscheinlichkeiten. Die charakteristischen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 160 mV mit der PLB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen-, o das Offenniveau und die rote Linie markiert die Unterleitfähigkeit Kanals.

Kmp_{V12T} zeigt in Membranen aus Lecithin, ebenso wie Kcv_{NTS} (**Abbildung 36**), eine signifikant erhöhte Leitfähigkeit im Vergleich zu DPhPC Membranen (**Abbildung 40 A und C**) aus denen die in **Abbildung 39** unten abgebildeten erhöhten Offenkanalamplituden bei negativen Spannungen resultieren. Die Offenwahrscheinlichkeiten liegen über den kompletten Spannungsbereich niedriger als in DPhPC Membranen was zu einer stark verminderten Spannungsabhängigkeit führt (**Abbildung 40 B und D**). Die Zahlenwerte sind der **Tabelle 4** am Ende des Kapitels zu entnehmen.

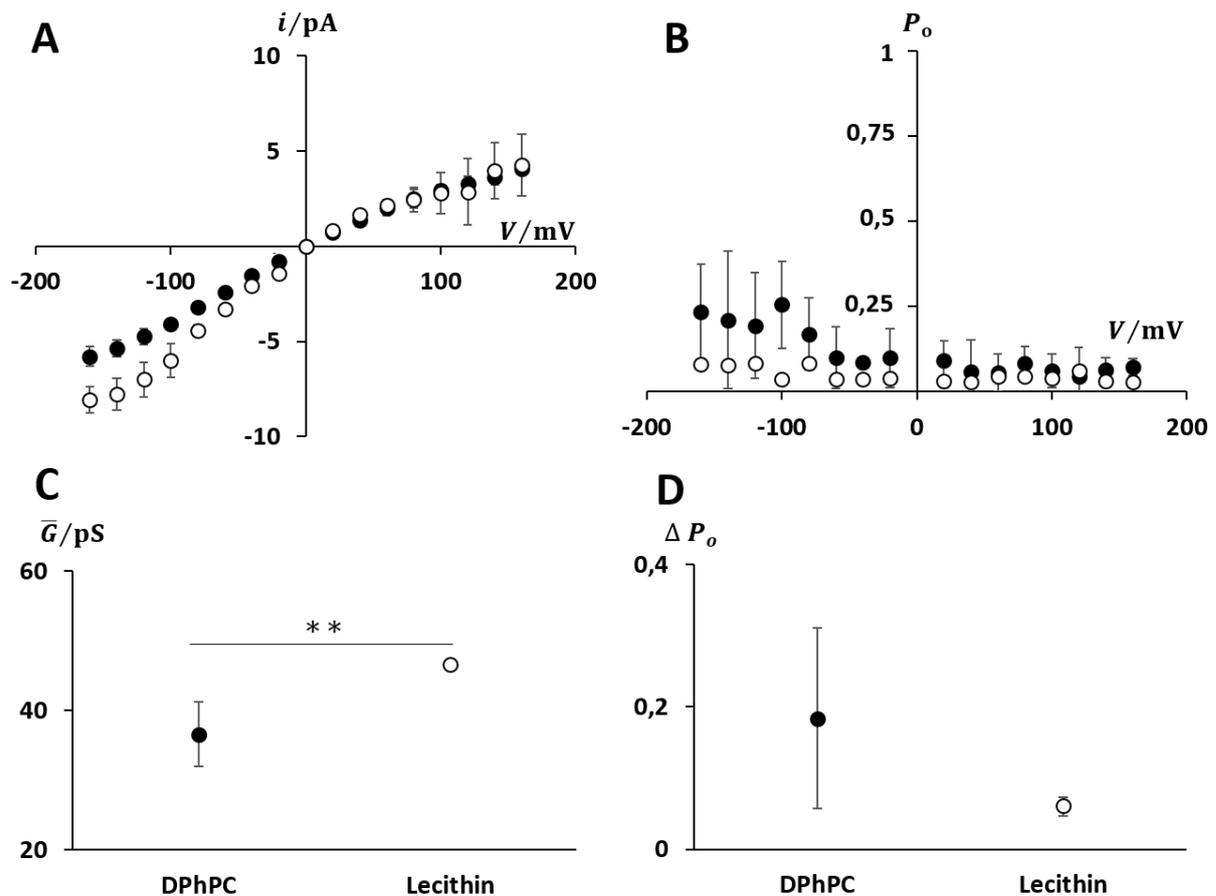


Abbildung 40: Repräsentative Einzelkanalströme des KmpV_{12T} zeigen eine erhöhte Leitfähigkeit in Soja – Lecithin Membranen. A i/V Kurven. B Offenwahrscheinlichkeiten. C gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV sowie die Offenwahrscheinlichkeitsdifferenzen (D) von +160 mV und -160 mV in DPhPC und Soja - Lecithin Membranen am PLB. Die Datenpunkte und Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen. Die Symbole aus A und B entsprechen denen in C und D.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich alle drei viralen Kaliumkanäle in Membranen aus Soja - Lecithin einbauen und untersuchen lassen (**Abbildung 35**; **Abbildung 37**; **Abbildung 39**). Alle drei wiesen dabei eine auffällige, und gleichzeitig Kanalprotein spezifische Empfindlichkeit gegenüber der Lipidumgebung auf. Kcv_{N_TS}, Kcv_S und KmpV_{12T} zeigen alle eine erhöhte Leitfähigkeit, die im Falle von Kcv_{N_TS} und KmpV_{12T} signifikant sind (**Abbildung 36 A** und **C**; **Abbildung 38 A** und **C**; **Abbildung 40 A** und **C**). Die mittlere Offenwahrscheinlichkeit blieb bei Kcv_{N_TS} unverändert, war bei Kcv_S signifikant erhöht und bei KmpV_{12T} verringert (**Abbildung 36 B** und **D**; **Abbildung 38 B** und **D**; **Abbildung 40 B** und **D**).

3.3.2 Einfluss von POPC auf die Leitfähigkeit und das Kanalschalten der viralen Kaliumkanäle Kcv_{N_{NTS}}, Kcv_S und Kmpv_{12T}

Da Lecithin ein Lipidgemisch ist, werden sich in der Membran Mikroumgebungen bilden, in die sich die Kanäle durch laterale Diffusion bevorzugt einlagern. Daher kann keine Aussage getroffen werden welche Membraneigenschaften (Kettenlänge, Sättigung, lateraler Druck) der Lecithin Membran für die spezifischen Funktionsänderungen verantwortlich sind. Um im Weiteren zu untersuchen ob ungesättigte Fettsäureketten oder die Dicke der Membran (hydrophober Bereich) Auswirkungen auf die drei viralen Kaliumkanäle Kcv_{N_{NTS}}, Kcv_S und Kmpv_{12T} haben, wurden sie in Membranen aus reinem POPC untersucht. POPC besitzt eine gesättigte 16 C- und eine ungesättigte 18 C-Fettsäurekette, sowie eine Phosphocholinkopfgruppe (**Abbildung 78**). (Kučerka et al., 2008) ist zu entnehmen, dass POPC Membranen dichter gepackt sind als DPhPC Membranen, da die Fläche pro Lipid deutlich abnimmt. Sie beträgt für POPC 62,7 Å² und für DPhPC 78 Å². POPC Membranen sind aufgrund ihrer ungesättigten Fettsäurekette mit 39,8 Å im Vergleich zu DPhPC Membranen (36,3 Å) dicker (D_{HH}) und auch der hydrophobe Bereich ist mit 29,2 Å verdickt (DPhPC = 27,8 Å). In diesen reinen POPC Membranen sind die Kanäle überall den gleichen Bedingungen ausgesetzt und haben nicht mehr die Möglichkeit in eine Microdomäne (*Lipid - Raft*) mit den für den Kanal günstigsten Membraneigenschaften zu inserieren.

Da es mit der Planaren Lipid *Bilayer* Methode nicht möglich war Membranen aus POPC aufzuspannen, wurde für diese Messungen die *Contact Bubble Bilayer* Methode verwendet und die Ergebnisse mit den dazugehörigen Kontrollmessungen (DPhPC Membranen mit der CBB Methode) verglichen. Zusätzlich wurden für Kcv_{N_{NTS}} Messungen in asymmetrischen Membranen durchgeführt, um unterschiedliche laterale Drücke zwischen den *leaflets*, sowie verschiedene Fluiditäten zu generieren.

Bei diesen Messungen befand sich in der Pipettenlösung der Erdelektrode das Lipid DPhPC mit dem zu messenden Kaliumkanal Kcv_{N_{NTS}} in Nanodisks; in der Lösung der Messelektrode war nur das Lipid POPC vorhanden. Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass der Kanal bei jeder Messung mit der gleichen Orientierung in die Membran inseriert (Rauh, 2014). Mit dem hier beschriebenen Versuchsaufbau besteht der *Monolayer* der Erdelektrode aus DPhPC, welche der intrazellulären Seite des *Bilayers* entspricht. Der *Monolayer* der zu der extrazellulären Seite hin ausgerichtet ist, besteht hingegen aus POPC.

Generell kann davon ausgegangen werden, dass ohne ein unkontrolliertes Verschmelzen der *Bubbles* der *Bilayer* tatsächlich über mehrere Stunden asymmetrisch bleibt und nicht frühzeitig

durch einen Lipidwechsel vermischt wird. Ein spontaner *flip - flop* von Phospholipiden, der nur alle 5 - 10 Stunden auftritt (Nakano et al., 2007; Wimley & Thompson, 1990), ist viel zu langsam um die Asymmetrie des *Bilayers* aufzuheben während einer Messung aufzuheben (Hwang, Chen, Cronin, Holden, & Bayley, 2008; Taylor et al., 2019).

K_{CVNTS} konnte in symmetrischen POPC Membranen (**Abbildung 41 A**), sowie in asymmetrischen POPC/DPhPC Membranen (**Abbildung 41 B**) mit der CBB Methode untersucht werden. Während das Schaltverhalten von K_{CVNTS} in reinen POPC Membranen durch das Eintreten eines schnellen Flicker - *Gatings* bei positiven Spannungen etwas verändert wird (**Abbildung 41 A** rechts), erhöht eine asymmetrische Membran zusätzlich die Offenkanalamplitude in hohen positiven Spannungsbereichen (+160 mV) (**Abbildung 41 B** Mitte). Das liegt daran, dass durch die CBB Methode ausgelöste Flicker - *Gating* bei positiven Spannungen (**Abbildung 31** und **Abbildung 32**) erst bei höheren Spannungen einsetzt. Dadurch entstehen deutlich höhere Offenkanalamplituden bei hohen positiven Spannungen >100 mV (**Abbildung 41 B**; **Abbildung 42 A**).

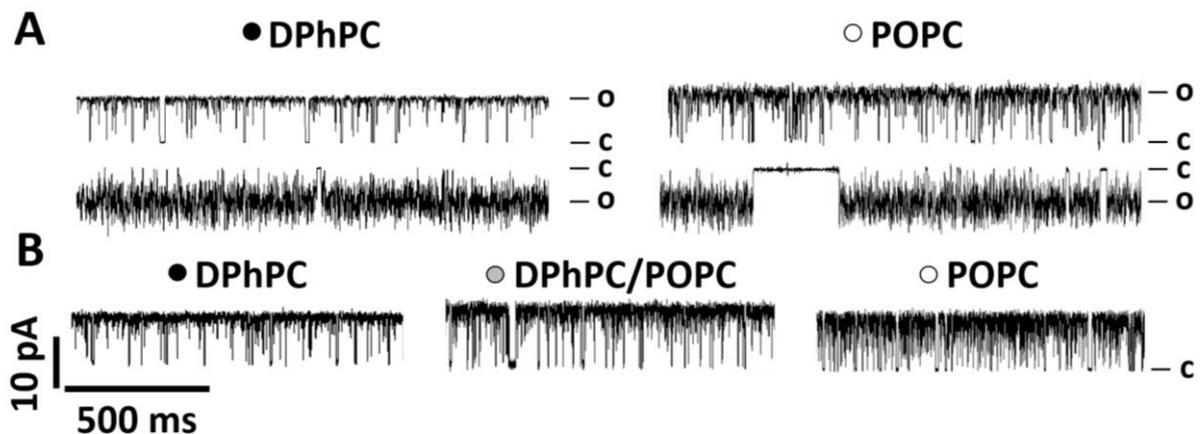


Abbildung 41: K_{CVNTS} lässt sich in symmetrischen POPC sowie in asymmetrischen DPhPC/POPC Membranen messen und zeigt in letzteren eine erhöhte Offenkanalamplitude bei +160 mV. A Repräsentative Stromantworten in symmetrischen Membranen aus DPhPC und POPC bei ±120 mV. B Repräsentative Stromantworten in symmetrischen Membranen aus DPhPC, POPC und asymmetrischen DPhPC/POPC Membranen bei +160 mV. Die Stromantworten wurden mit der CBB Methode generiert und digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen- und o das Offenniveau des Kanals.

Im Gegensatz dazu bleibt die Leitfähigkeit im linearen Bereich der i/V Kurve bei allen Messbedingungen unverändert. (Abbildung 42; A und C).

Die Offenwahrscheinlichkeit von $K_{CV_{NTS}}$ in reinen POPC Membranen fällt in einigen Messungen bei negativen Spannungen auf bis zu 50 % ab (Abbildung 41; Abbildung 42 B und D) (Schlee, 2016). Die Zahlenwerte sind der Tabelle 4 am Ende des Kapitels zu entnehmen.

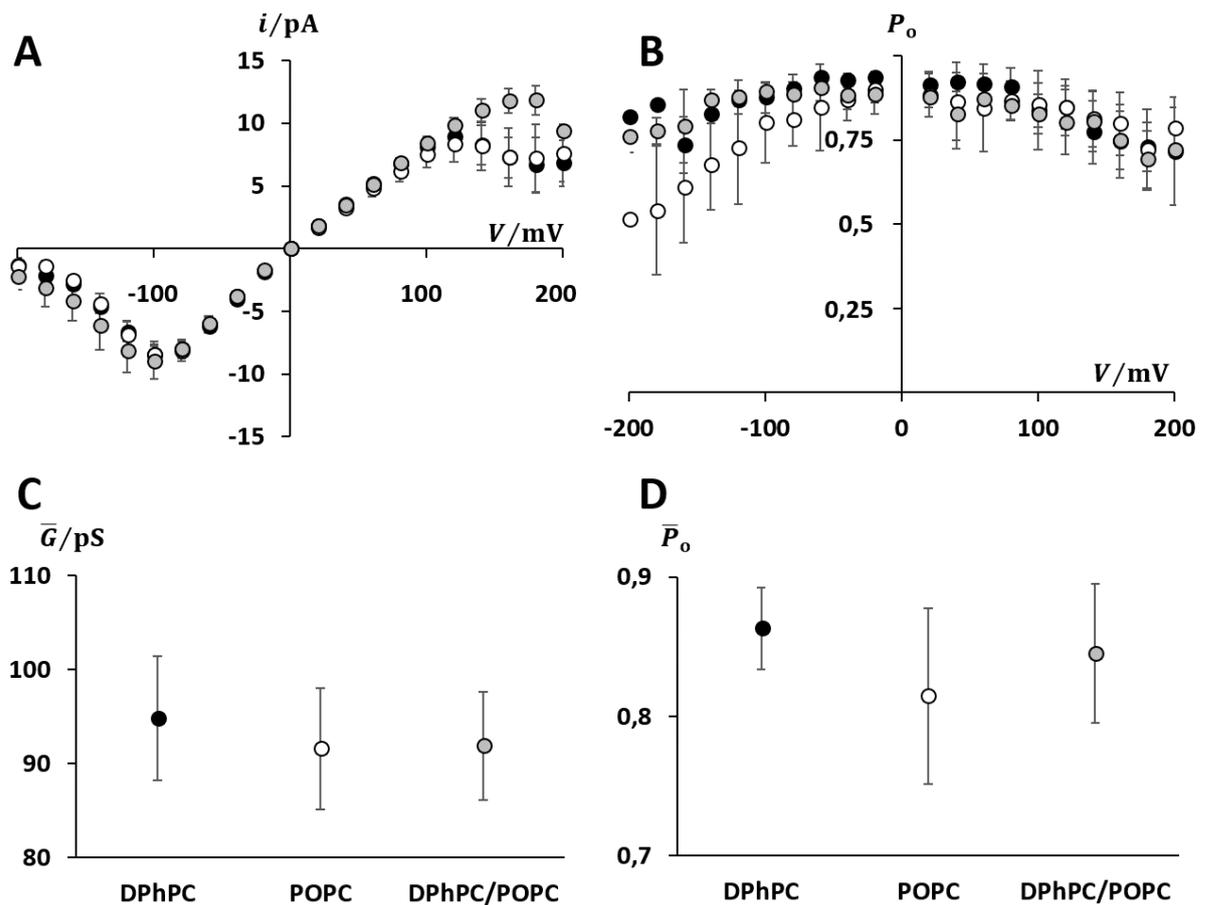


Abbildung 42: $K_{CV_{NTS}}$ zeigt einen erhöhten Stromfluss bei hohen positiven Spannungen in asymmetrischen POPC / DPhPC Bilayern (CBB), während eine reine Membran aus POPC keine veränderte Funktion des Kanals hervorruft. A i/V Kurven. B Offenwahrscheinlichkeiten. C gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV sowie mittlere Offenwahrscheinlichkeiten (D) in DPhPC und POPC Membranen. Jeder Datenpunkt und dessen Standardabweichung entstammt aus mind. drei unabhängigen Messungen. Die Symbole aus A und B entsprechen denen in C und D.

Kcv_s wurde ausschließlich in symmetrischen CBB Membranen aus reinem POPC gemessen und zeigt distinktes Kanalschalten mit deutlichem Flicker - *Gating* bei positiven Spannungen (**Abbildung 43**). Bei negativen Spannungen hingegen treten häufiger längere Geschlossenzeiten auf (**Abbildung 43** rechts unten).

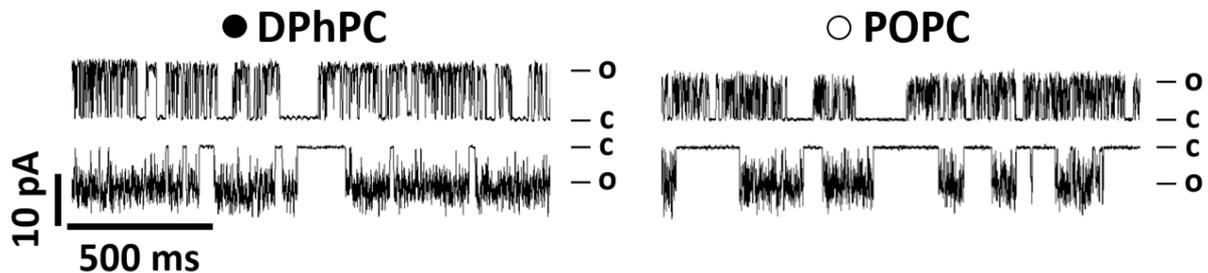


Abbildung 43: Kcv_s ist in Membranen aus POPC messbar und zeigt verringerte Offenkanaalamplituden und häufigere Geschlossenphasen. Die charakteristischen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 120 mV mit der CBB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen- und o das Offenniveau des Kanals.

Die mittlere Leitfähigkeit von Kcv_s ist durch das in **Abbildung 43** erkennbare verstärkt auftretendes Flicker - *Gating* und die dadurch verringerte Offenkanaalamplitude bei positiven Spannungen in POPC Membranen signifikant reduziert (**Abbildung 44 A und C**). Ebenso ist die Offenwahrscheinlichkeit von Kcv_s in POPC Membranen bei allen Spannungen verringert, sodass die mittlere Offenwahrscheinlichkeit des Kanals signifikant kleiner ist als in DPhPC Membranen (**Abbildung 44 B und D**). Die Zahlenwerte sind der **Tabelle 4** am Ende des Kapitels zu entnehmen.

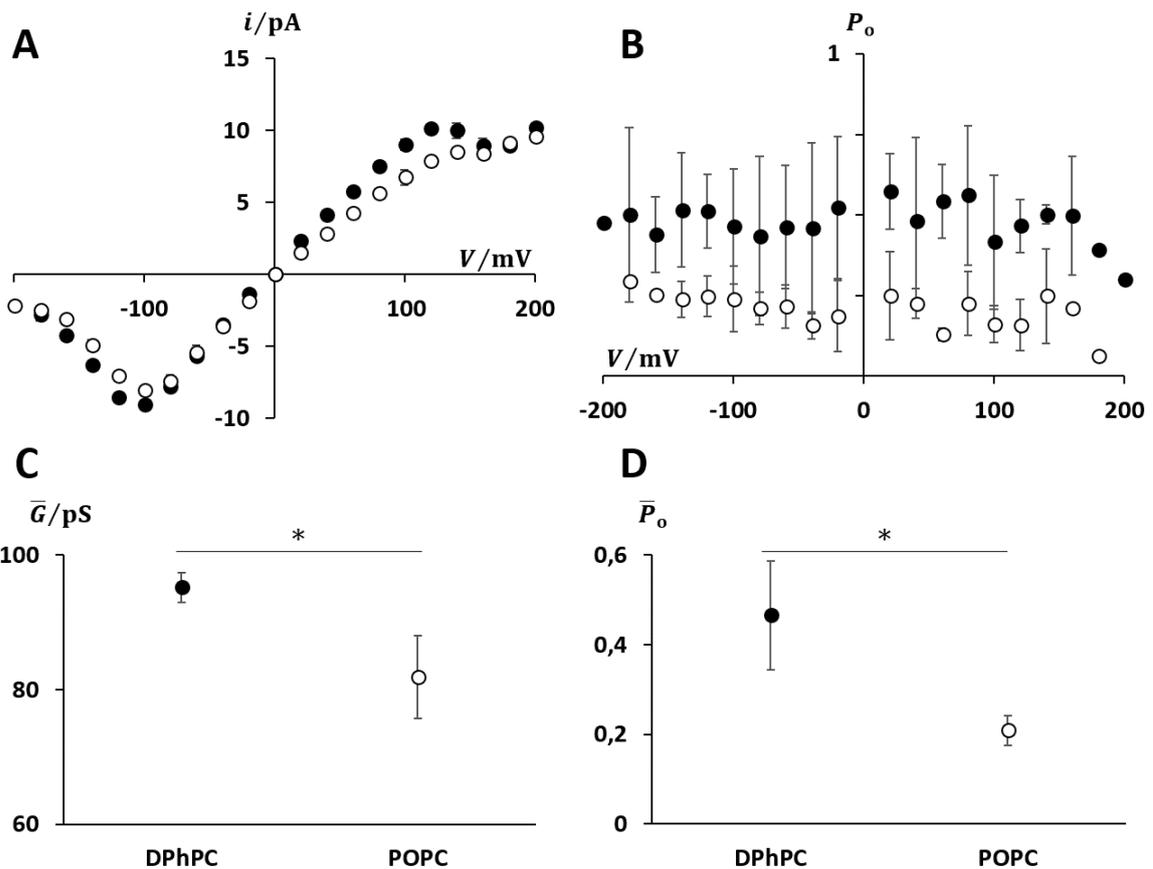


Abbildung 44: Kcv_5 besitzt eine niedrigere Leitfähigkeit sowie eine deutlich verringerte Offenwahrscheinlichkeit in reinen POPC Membranen unter Verwendung der CBB - Methode. A i/V Kurven. B Offenwahrscheinlichkeiten. C gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV sowie mittlere Offenwahrscheinlichkeiten (D) in DPhPC und POPC Membranen. Jeder Datenpunkt und dessen Standardabweichung entstammt aus mind. drei unabhängigen Messungen. Die Symbole aus A und B entsprechen denen in C und D.

Zusätzlich zu den Kcv - Kanälen wurde der Einfluss von POPC auf $Kmpv_{12T}$ in CBB Membranen untersucht, was jedoch zu keinen offensichtlichen Funktionsänderungen des Kanals führt.

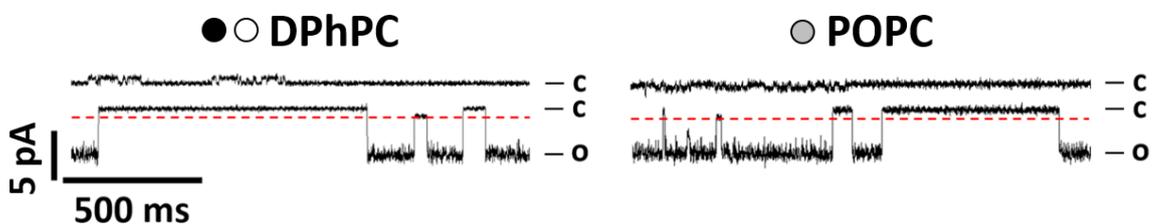


Abbildung 45: $Kmpv_{12T}$ ist in Membranen aus POPC messbar, zeigen jedoch kein verändertes Schaltverhalten im Vergleich zu DPhPC Membranen. Die charakteristischen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 160 mV mit der CBB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen-, o das Offenniveau und die rote Linie die Unterleitfähigkeit.

Nach genauerer Datenanalyse der Messergebnisse ist erkennbar, dass sich die Ergebnisse von $Kmpv_{12T}$ in DPhPC und POPC Membranen der CBB Methode in Bezug auf die Leitfähigkeiten im linearen Kurvenbereich (-80 mV - 0 mV) und der Offenwahrscheinlichkeitsdifferenz von +140 mV und -140 mV nicht unterscheiden (Abbildung 46). Dies bedeutet, dass der Kanal unverändert als starker Einwärtsgleichrichter auftritt und POPC als umgebendes Lipid keinen Einfluss auf den Kanal hat (Abbildung 45; Abbildung 46). Die Zahlenwerte sind der Tabelle 4 am Ende des Kapitels zu entnehmen.

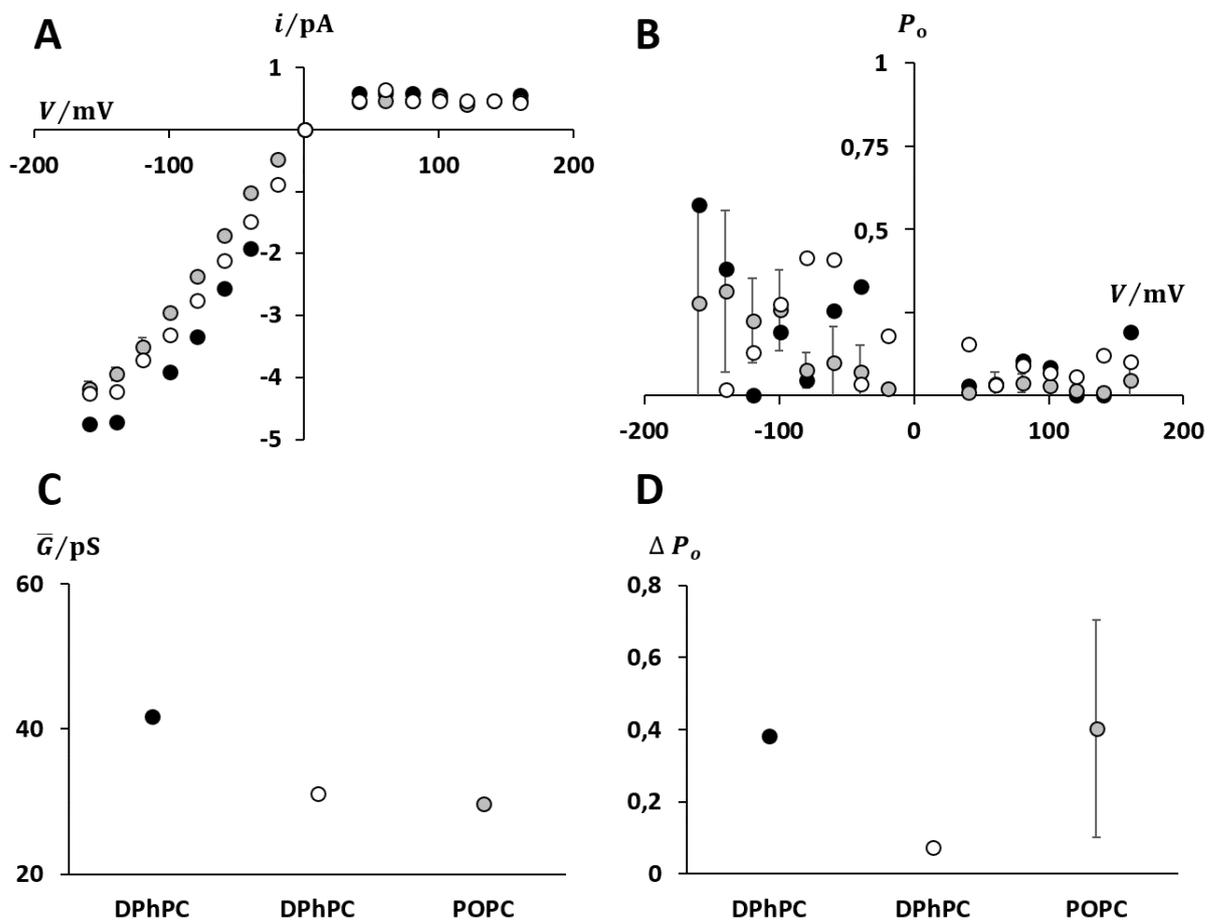


Abbildung 46: Membranen aus POPC haben keinen Einfluss auf den viralen Kaliumkanal $Kmpv_{12T}$. A i/V Kurven. B Offenwahrscheinlichkeiten. C gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von -80 mV bis 0 mV. D Offenwahrscheinlichkeitsdifferenzen von +140 mV und -140 mV von $Kmpv_{12T}$ in DPhPC und POPC Membranen der CBB Methode. Jeder Datenpunkt und dessen Standardabweichung der POPC Membranen entstammt aus mind. drei unabhängigen Messungen, die beiden Messungen in DPhPC sind einzeln aufgetragen. Die Symbole aus A und B entsprechen denen aus C und D.

Um alle drei viralen Kaliumkanäle in Membranen aus POPC zu untersuchen, wurde auf die CBB Methode zurückgegriffen. Im Vergleich zu den Kontrollmessungen in DPhPC ist die mittlere Leitfähigkeiten und die Offenwahrscheinlichkeit von $K_{CV_{NTS}}$ und $K_{mpV_{12T}}$ nahezu unbeeinträchtigt, die von K_{CV_S} signifikant verringert.

Da POPC eine längere und ungesättigte Fettsäurekette besitzt, ist eine Membran aus reinem POPC 3,5 Å dicker (D_{HH}) als reine DPhPC Membranen (N. Kucerka, Nieh, & Katsaras, 2011). Dadurch führt ein Einbau dieser kleinen Kanäle zu einem positiven *Mismatch*, dem der Kanal durch eine Konformationsänderung entgegen wirken kann (de Planque & Killian, 2003; Killian, 1998).

Trotz der ungesättigten Fettsäurekette ist eine POPC Membran dicht gepackt und weist im Vergleich zu reinen gesättigten Membranen einen höheren lateralen Oberflächendruck auf (N. Kucerka et al., 2011). Aufgrund der zahlreichen Unterschiede zwischen POPC und DPhPC Membranen kann keine Aussage getroffen werden, welche physikalischen Parameter für das veränderte Schaltverhalten der Kanäle verantwortlich sind.

$K_{CV_{NTS}}$ wurde zusätzlich in asymmetrischen Membranen untersucht. Es ist bekannt, dass asymmetrische *Bilayer* andere physikalische Eigenschaften aufweisen als symmetrische Membranen (Freeman et al., 2016). Die verschiedenen *Monolayer* können andere Anziehungskräfte haben und somit die Membran an sich instabilisieren. Ebenso könnten sie sich aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften gegeneinander verschieben oder verkeilen, so dass sie Druck auf den Kanal ausüben würden.

Die POPC Lipide in der asymmetrischen Membran befinden sich, aufgrund der bevorzugten Einbaurichtung des Kanals, auf der extrazellulären Seite des Kanals (C - und N - Terminus). Daher ist es möglich, dass der Kanal nur auf einer Seite konformell verändert wird, sodass sich die Membraneinflüsse nur auf die Leitfähigkeit und das *Gating* in einer Richtung auswirken. Daher kann ein einseitiger *Mismatch* für den erhöhten Stromfluss durch später einsetzendes Flickern bei positiven Spannungen verantwortlich sein.

3.3.3 Zusammenfassung

Mit den Messungen in Lecithin und POPC sollte evaluiert werden, ob ungeladene Membranen, welche sich nur im hydrophoben Bereich der Fettsäureketten von DPhPC unterscheiden Auswirkungen auf die Funktion der Ionenkanäle Kcv_{NTS} , Kcv_S und $Kmpv_{12T}$ haben.

Anhand dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass alle Kanäle auf Membranen aus Soja - Lecithin reagieren, wohingegen nur die Kcv - Kanäle Veränderungen des Schaltverhaltens in reinen Membranen aus POPC aufweisen. Dennoch sind die Auswirkungen von POPC nicht mit denen des zuvor untersuchten Lecithins zu vergleichen.

Zusammenfassend kann daher die Aussage getroffen werden, dass die Effekte der Lecithin Membran auf die drei untersuchten Kanäle nicht allein auf die Anwesenheit von Lipiden mit einer längeren und ungesättigten Fettsäurekette (wie POPC) zurückzuführen sind. Es ist davon auszugehen, dass im Lipidgemisch längere, aber auch kürzere Lipide anwesend sind und auch der laterale Druck innerhalb eines *Bilayers* sehr variabel sein kann. Anscheinend ist tatsächlich die Mischung der Lipide und eventuell die Lokalisation des Kanals in bevorzugten Arealen/Lipidumgebungen (*Lipid - Rafts*) für das Verhalten in Lecithin - Membranen ausschlaggebend.

Es kann ebenso sein, dass sich die Kanäle, aufgrund ihrer Größe, in Umgebung von viel kürzeren Lipiden aufhalten, was ihre Leitfähigkeit erhöht bzw. die Offenwahrscheinlichkeit beeinflusst. Ebenso müssen die veränderte Fluidität der Membran und die damit einhergehende Beweglichkeit des Kanals als Auslöser in Betracht gezogen werden.

Des Weiteren muss auch beachtet werden, dass die Ergebnisse zwischen Lecithin und POPC methodenübergreifend verglichen werden. Es könnte durchaus sein, dass ungesättigte Lipide am Planaren Lipid *Bilayer* andere Effekte auslösen.

Setzt man diese Ergebnisse in einen größeren Kontext, weisen die Daten darauf hin, dass Ionenkanäle sich in ihrer bevorzugten Lipidumgebung aufhalten. Ist ihnen das aufgrund von veränderter Lipidzusammensetzung nicht möglich, kann es zu gravierenden Funktionsveränderung der Proteine, des Membranabschnitts oder gar einer ganzen Zellmembran kommen.

Mit den hier durchgeführten Messungen der Kanäle in verschiedenen Membranen, kann zusätzlich aufgrund deren veränderten Eigenschaften abermals bestätigt werden, dass sich auch virale Kaliumkanäle ohne ihre Nanodisk in den Ziel - *Bilayer* einbauen. Dies ist daran erkennbar, dass die Kanäle sich andernfalls nicht durch die veränderten physikalischen Eigenschaften der hier verwendeten Lipide hätten beeinflussen lassen.

Tabelle 4: Mittlere Leitfähigkeiten und mittlere Offenwahrscheinlichkeiten von $K_{cv_{NTS}}$ und K_{cv_S} , sowie mittlere Leitfähigkeiten und Offenwahrscheinlichkeitsdifferenzen von $K_{mpv_{12T}}$ in reinen DPhPC, Soja - Lecithin und POPC Membranen der PLB und CBB Methode. Die Markierungen der Membranzusammensetzungen entsprechen den Symbolen der Graphen in den zugehörigen Abbildungen.

$K_{cv_{Next\ to\ Smith}}$		
Membran (PLB)	\bar{G}/pS	\bar{P}_o
● DPhPC (n = 6)	81,7 ± 12,3	0,92 ± 0,02
○ Lecithin (n = 5)	108 ± 3,8	0,91 ± 0,02
Membran (CBB)		
● DPhPC (n = 6)	94,8 ± 6,6	0,86 ± 0,03
○ POPC (n = 18)	91,6 ± 6,5	0,82 ± 0,06
●○ DPhPC / POPC (n = 6)	91,8 ± 5,8	0,85 ± 0,05
$K_{cv_{Smith}}$		
Membran (PLB)	\bar{G}/pS	\bar{P}_o
● DPhPC (n = 10)	92,4 ± 9,4	0,36 ± 0,14
○ Lecithin (n = 7)	106,1 ± 17,5	0,64 ± 0,06
Membran (CBB)		
● DPhPC (n = 10)	95,2 ± 2,2	0,47 ± 0,12
○ POPC (n = 3)	81,9 ± 6,2	0,21 ± 0,03
$K_{mpv_{12T}}$		
Membran (PLB)	\bar{G}/pS	$\Delta P_o (-160 - (+160))$
● DPhPC (n = 10)	36,6 ± 5	0,18 ± 0,13
○ Lecithin (n = 3)	46,5 ± 0,7	0,06 ± 0,01
Membran (CBB)		
		$\Delta P_o (-140 - (+140))$
●○ DPhPC (n = 2)	41,7 / 33,6	0,38 / 0,1
●○ POPC (n = 3)	29,6 ± 0,7	0,4 ± 0,3

3.4 Der Einfluss von Cholesterol auf die viralen Kaliumkanäle Kcv_{NTS}, Kcv_S und Kmpv_{12T}

Cholesterol ist ein natürlicher Hauptbestandteil von eukaryotischen Plasmamembranen und bekannt für die Induktion der Ausbildung von *Lipid - Rafts* (J. Gallová et al., 2008). Cholesterol kann die physikalischen Eigenschaften der Membran wie die Fluidität, die Dicke und den lateralen Druck konzentrationsabhängig beeinflussen (Kapitel 1.1.3.1). Des Weiteren ist Cholesterol in der Lage indirekt über diese physikalischen Aspekte auf Ionenkanäle zu wirken, oder direkte Interaktionen mit diesen einzugehen (Kapitel 1.3).

Da Cholesterol in Konzentrationen von 10 - 45 mol% in natürlichen Plasmamembranen vorkommen kann (Philip L. Yeagle, 1985; P. L. Yeagle, 1991) wurden die drei viralen Kaliumkanäle Kcv_{NTS}, Kcv_S und Kmpv_{12T} in DPhPC Membranen mit Cholesterolkonzentrationen von 10 mol%, 20 mol% und 30 mol% im Planaren *Lipid Bilayer* untersucht.

Im zweiten Teil dieses Kapitels wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Laura Cantu (Universität Mailand) untersucht, wie die Cholesterolverteilung in DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) Membranen durch Kcv_{NTS} beeinflusst werden kann.

3.4.1 Cholesterol hat geringe, aber kanalspezifische Auswirkungen auf die viralen Kaliumkanäle Kcv_{NTS}, Kcv_S und Kmpv_{12T}

Für die Untersuchungen des Cholesteroleinflusses auf die drei viralen Kaliumkanäle Kcv_{NTS}, Kcv_S und Kmpv_{12T} wurde DPhPC als umgebendes Lipid verwendet, da bereits gezeigt wurde, dass der kondensierende Effekt von Cholesterol auf gesättigte Lipide größer ist, als auf ungesättigte (Huster, Arnold, & Gawrisch, 1998; Shaikh, Cherezov, Caffrey, Stillwell, & Wassall, 2003). Des Weiteren ist bekannt, dass die Kopfgruppenkonformation von Phosphatidylcholinen nicht durch Cholesterol beeinflusst wird (McIntosh, 1978).

Abbildung 47 zeigt, dass steigende Cholesterolkonzentrationen in der Membran die Kanalfunktion von Kcv_{NTS} nicht unterbindet. Das ist bemerkenswert vor dem Hintergrund, dass der virale Kanal sehr klein ist und in molekulardynamischen Simulationen kaum eine dünne DMPC (14 C - Fettsäureketten) Membran durchspannen kann (Braun, Lachnit, et al., 2014). Während das Schaltverhalten unverändert erscheint, ist die Offenkanalamplitude bei positiven Spannungen sogar erhöht.

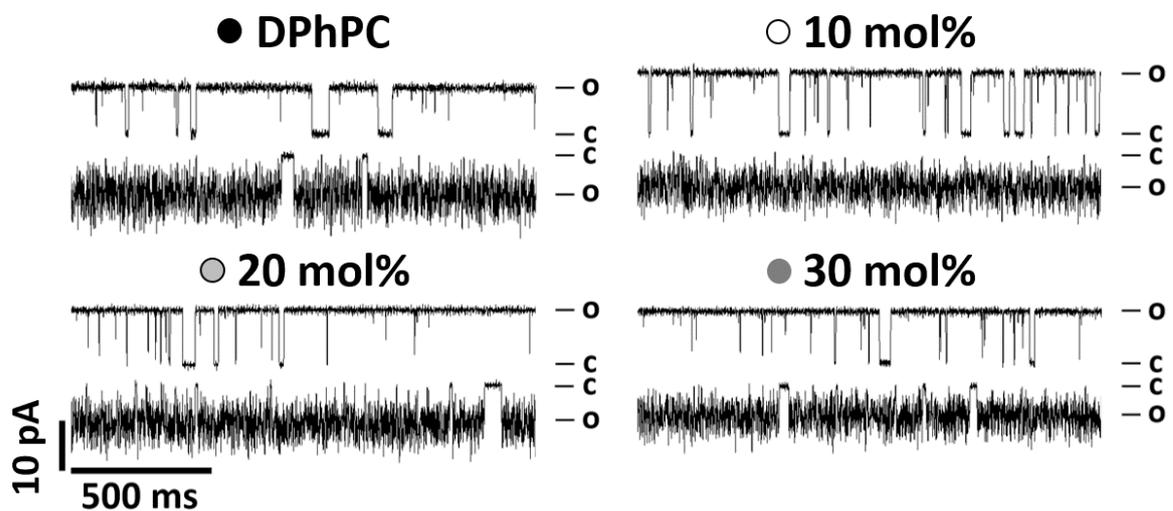


Abbildung 47: Kcv_{NTS} ist in cholesterolhaltigen Membranen messbar und zeigt ähnliches Schaltverhalten mit erhöhten Offenkanalamplituden bei positiven Spannungen. Die charakteristischen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 120 mV mit der PLB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen- und o das Offenniveau des Kanals.

Steigende Cholesterolkonzentrationen erhöhen die Einzelkanalleitfähigkeit im linearen Kurvenbereich von -60 mV bis +60 mV (Abbildung 48 A und C). Die Erhöhung der mittleren Leitfähigkeit sättigt bei höheren Cholesterolkonzentrationen (Abbildung 48 C). Die mittleren Offenwahrscheinlichkeiten, welche in Abbildung 48 B abgebildet sind, liegen in allen Membranen mit und ohne Cholesterol vergleichbar hoch (Abbildung 48 B und C). Die exakten Zahlenwerte sind der Tabelle 5 am Ende des Kapitels zu entnehmen.

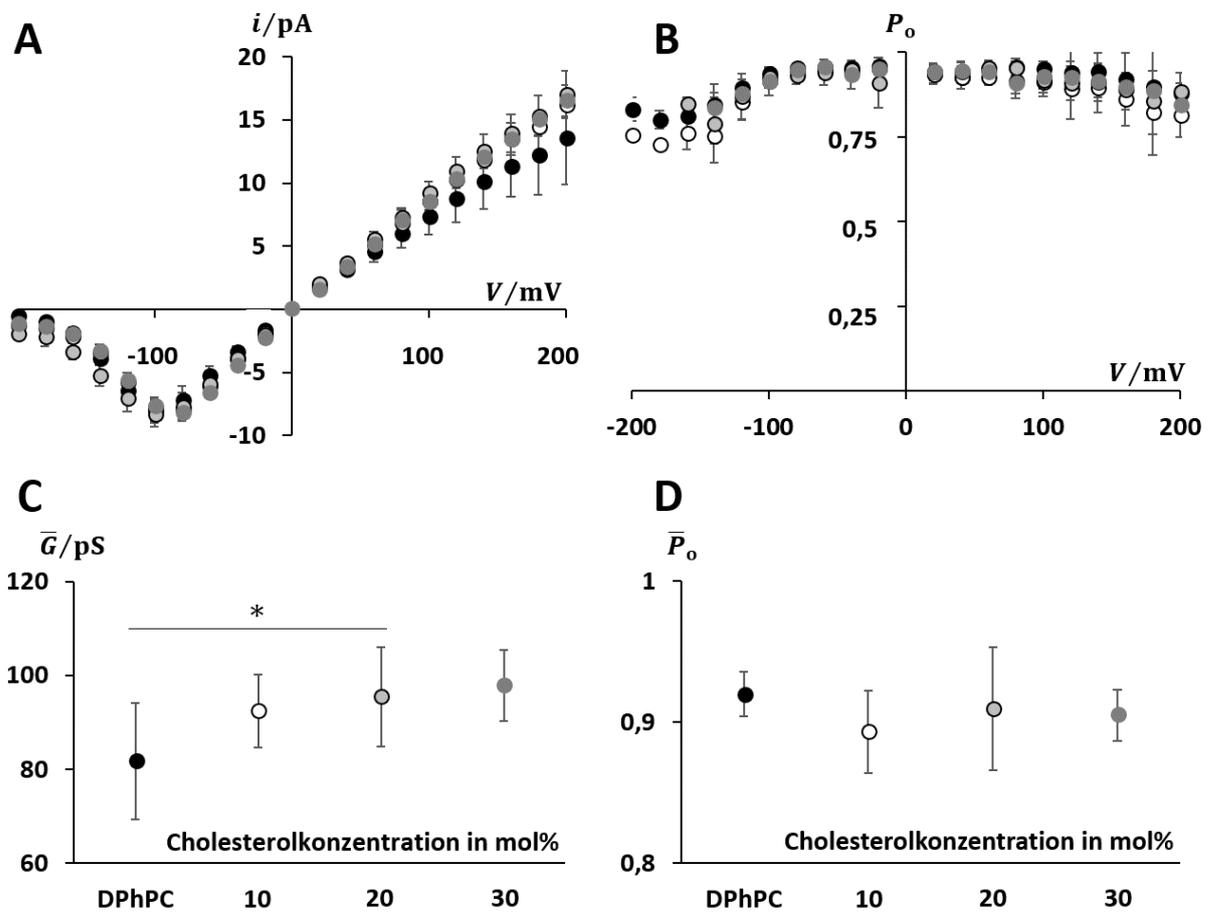


Abbildung 48: Die Leitfähigkeit von Kcv_{NTS} ist in Membranen mit Cholesterolanteilen erhöht, während die Offenwahrscheinlichkeit unverändert bleibt. **A** i/V Kurven. **B** Offenwahrscheinlichkeiten. **C** gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV sowie mittlere Offenwahrscheinlichkeiten (**D**) von Kcv_{NTS} in DPhPC Membranen mit verschiedenen Cholesterolkonzentrationen. Alle Datenpunkte und Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen am Planaren Lipid *Bilayer*. Die Symbole in **A** und **B** entsprechen denen aus **C** und **D**.

Aufgrund der gleichen Kanalgröße ist Kcv_S genauso tief in eine Membran eingebettet wie Kcv_{NTS} , und zeigt ebenso wie dieser distinktes Kanalschalten in Membranen, die durch Cholesterol verdickt sind. Anhand **Abbildung 49** ist zu erkennen, dass Kcv_S in Membranen die Cholesterol enthalten identische Offenkanaalamplituden aufweist, sich das *Gating* - Verhalten jedoch von häufigeren (10 mol%) zu längeren (30 mol%) Offenzeiten verändert.

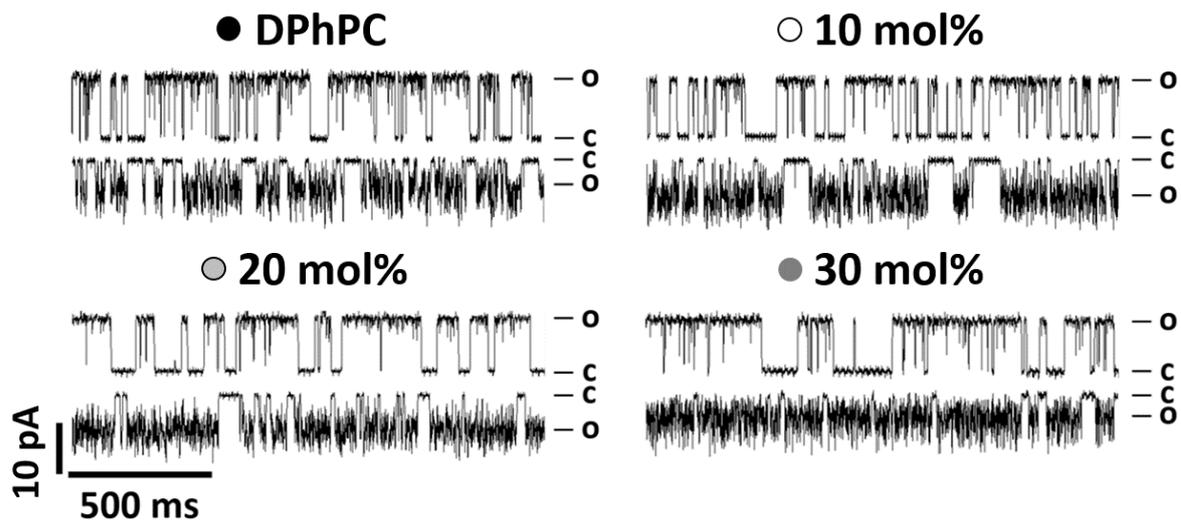


Abbildung 49: Kcv_S ist in cholesterolhaltigen Membranen messbar und zeigt ein verändertes Schaltverhalten was zu höheren Offenwahrscheinlichkeiten führt. Die charakteristischen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 120 mV mit der PLB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen- und o das Offenniveau des Kanals.

Im Vergleich zu reinen DPhPC Membranen zeigt Kcv_S nur in Membranen aus 30 mol% Cholesterol (dunkelgrau) im linearen Kurvenbereich von -60 mV bis +60 mV eine geringfügig erhöhte Leitfähigkeit (**Abbildung 50 A und C**).

Anders als Kcv_{NTS} zeigen die mittleren Offenwahrscheinlichkeiten von Kcv_S eine Empfindlichkeit gegenüber Cholesterol. Der höchste Wert ergibt sich für Membranen mit 10 mol% Cholesterol (**Abbildung 50 B und D**; weiße Symbole). Die Zahlenwerte sind der **Tabelle 5** am Ende des Kapitels zu entnehmen.

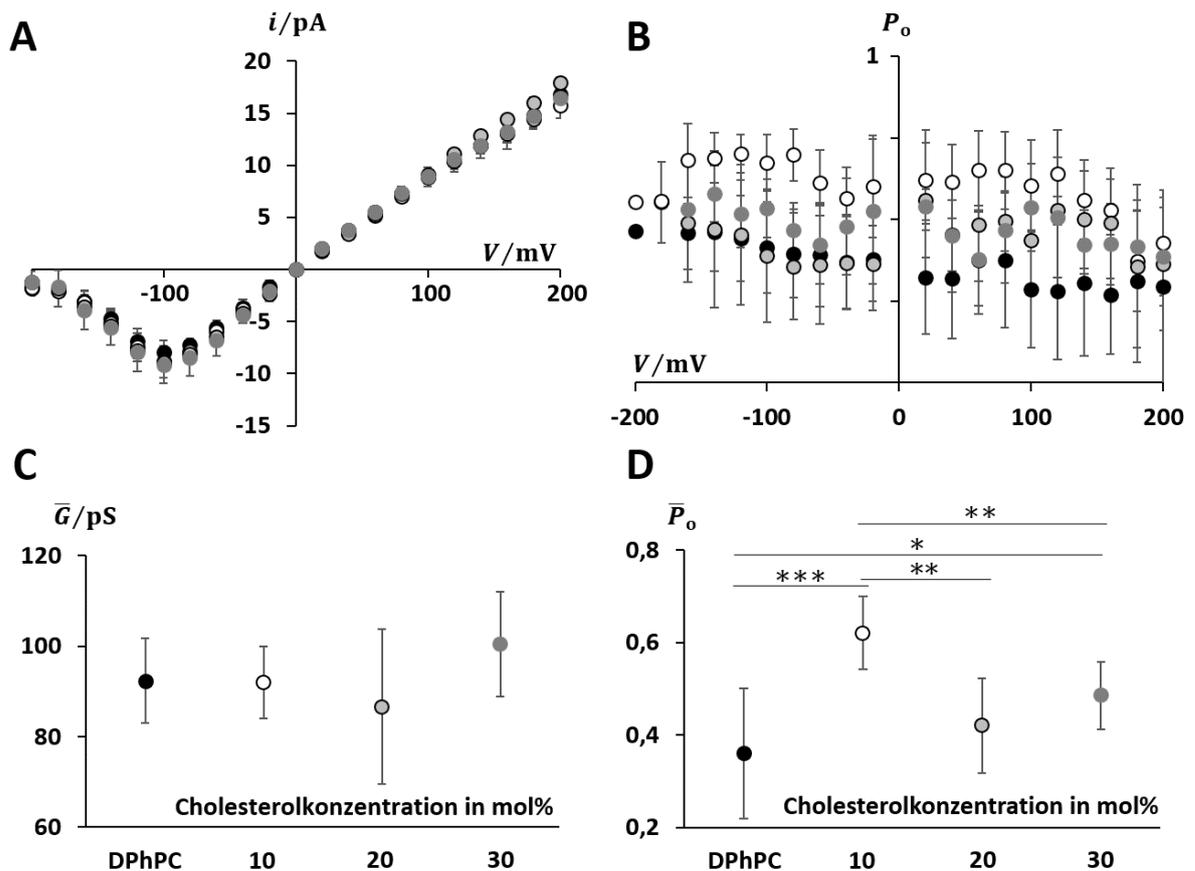


Abbildung 50: Kcv_S zeigt eine erhöhte Leitfähigkeit in Membranen aus DPhPC mit 30 mol% Cholesterol, während die Offenwahrscheinlichkeiten nur mit 10 mol% Cholesterol deutlich ansteigt. A i/V Kurven. B Offenwahrscheinlichkeiten. C gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV sowie mittlere Offenwahrscheinlichkeiten (D) in DPhPC Membranen mit verschiedenen Cholesterolkonzentrationen. Alle Datenpunkte und Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen am Planaren Lipid *Bilayer*. Die Symbole aus A und B entsprechen denen aus C und D.

Mit 82 AS pro Monomer zählen die beiden Kcv - Kanäle zu den kleinsten ihrer Art. Sie bauen sich dennoch in verdickte Cholesterolmembranen ein und lassen sich von dieser Umgebung nur sehr geringfügig in ihrer Funktion beeinflussen. Während Kcv_{NTS} mit signifikant steigenden Leitfähigkeiten reagiert, zeigt Kcv_S eine Tendenz zu erhöhten Offenwahrscheinlichkeiten.

Der noch kleinere Kmpv_{12T} Kanal baut sich tatsächlich in Membranen ein, die bis zu 30% Cholesterol enthalten, und wird nicht in seiner grundlegenden Funktion gestört (Abbildung 51). Auffällig ist sogar, dass bei negativen Spannungen die Offenzeiten verlängert erscheinen und die Offenkanalamplituden durch 30 mol% erhöht sind.

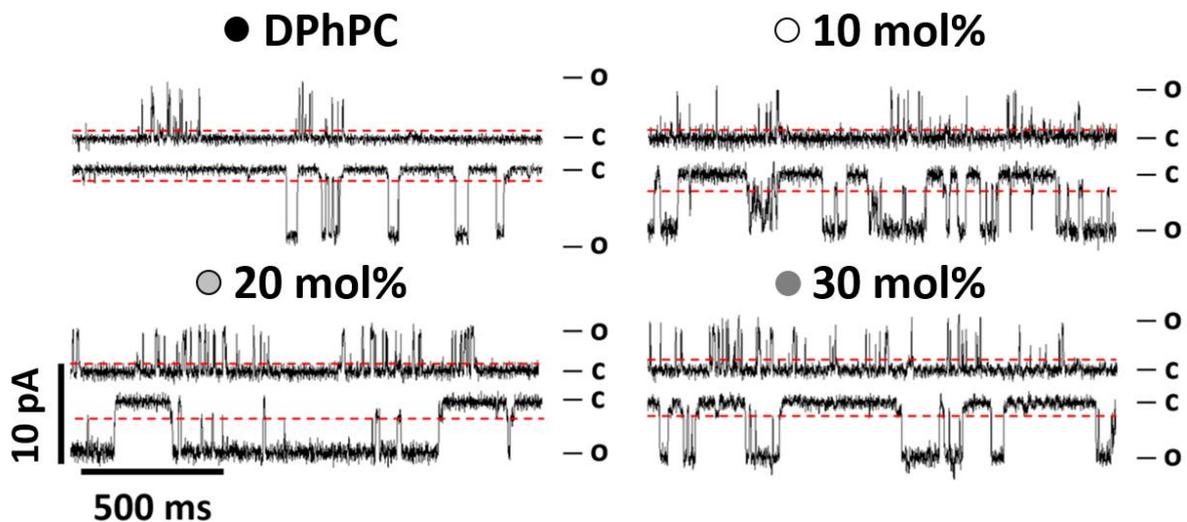


Abbildung 51: Kmpv_{12T} ist in cholesterolhaltigen Membranen funktionell und zeigt mit steigenden Cholesterolkonzentrationen verlängerte Offenzeiten. Die charakteristischen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 160 mV mit der PLB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen-, o das Offenniveau und die rote Linie die Unterleitfähigkeit.

Nach genauerer Datenanalyse ergibt sich nur für Membranen mit 30 mol% eine signifikant erhöhte Leitfähigkeit im Vergleich zu reinen DPhPC Membranen und Membranen mit niedrigeren Cholesterolkonzentrationen (Abbildung 52 A und C). Anders als die Einzelkanalleitfähigkeit steigt bei diesem Kanal jedoch die Offenwahrscheinlichkeit ab einer Cholesterolkonzentration von 10 mol% im Vergleich zu reinen DPhPC Membranen signifikant an und geht ab 20 mol% in Sättigung über (Abbildung 52 B und D). Die Zahlenwerte sind der Tabelle 5 am Ende des Kapitels zu entnehmen.

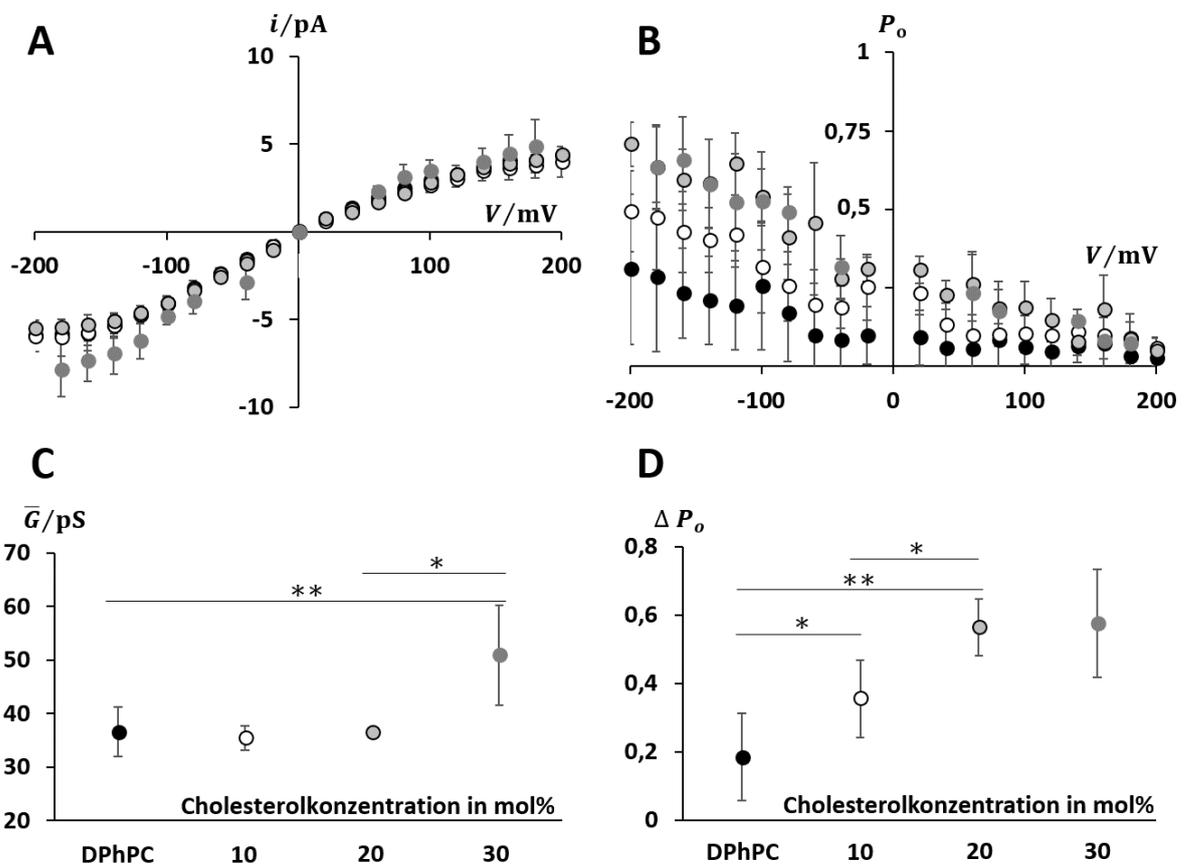


Abbildung 52: Die Leitfähigkeiten von KmpV_{12T} sind in Membranen mit einem Cholesterolanteil von 30 mol% erhöht, während die Offenwahrscheinlichkeiten mit allen Konzentrationen deutlich ansteigen. A i/V Kurven. B Offenwahrscheinlichkeiten. C gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV sowie die Differenz der Offenwahrscheinlichkeit zwischen +160 mV und -160 mV (D) von KmpV_{12T} in DPhPC Membranen mit verschiedenen Cholesterolkonzentrationen. Alle Datenpunkte und Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen am Planaren Lipid *Bilayer*. Die Symbole aus A und B entsprechen denen aus C und D.

Cholesterol hat auf die drei viralen Kaliumkanäle KcV_{NTS}, KcV_S und KmpV_{12T} nur geringe aber interessanterweise kanalspezifische Auswirkungen. Während die getesteten Cholesterolkonzentrationen (10 mol%, 20 mol% und 30 mol%) die Leitfähigkeit von KcV_{NTS} nahezu in gleichem Maße erhöhen (Abbildung 48 A und C), ist die Leitfähigkeit von KcV_S nur unwesentlich durch Cholesterol beeinflusst (Abbildung 50 A und C). KmpV_{12T} zeigt nur mit 30 mol% Cholesterol einen erhöhten Stromfluss (Abbildung 52 A und C).

Die Offenwahrscheinlichkeit von KcV_{NTS} ist nicht beeinflusst (Abbildung 48 B und D), während sie bei KcV_S und KmpV_{12T} erhöht sind. Hierbei ist auffällig, dass die Erhöhungen der Offenwahrscheinlichkeiten von KcV_S nicht mit dem steigenden Cholesterolanteil korrelieren (Abbildung 50 B und D), bei KmpV_{12T} hingegen mit steigender Cholesterolkonzentration eine

erhöhte Offenwahrscheinlichkeit einhergeht (**Abbildung 52 B und D**). Diese scheint bei 20 mol% bereits in Sättigung überzugehen.

Es ist bekannt, dass Cholesterol die Eigenschaften einer Membran grundlegend verändert, sei es die Fluidität, die Dicke oder der laterale Druck des *Bilayers*. Diese Eigenschaften können einzeln oder in Verbindung miteinander die Funktion von Kanalproteinen beeinflussen. Cholesterol ist bekannt dafür neben Sphingolipiden ein großer Bestandteil von sogenannten *Lipid - Rafts* zu sein (Brown & London, 2000) (Kapitel 1.1.3.1 und Kapitel 1.3). Des Weiteren ist bekannt, dass Cholesterol diese Anordnungen oder Microdomänen in Phosphatidylcholin Membranen sehr gut ausbildet (Plesnar, Subczynski, & Pasenkiewicz-Gierula, 2012).

Cholesterol ist ebenso in der Lage sich auch direkt um Proteine anzulagern und einen sogenannten *Lipid - Belt* (Barrantes, 2004) auszubilden, der direkte Einflüsse aber auch indirekte physikalische Auswirkungen auf einen Ionenkanal haben kann (*Mismatch*). Hierbei müssen sich *Lipid - Belts*, *Lipid - Rafts* oder generelle *Mismatch* Effekte nicht gegenseitig ausschließen, sondern können sich sogar bedingen (Criado, Eibl, & Barrantes, 1982; Marsh & Barrantes, 1978). Außerhalb oder innerhalb solcher *Lipid - Rafts* gibt es unterschiedliche Mechanismen, wie Cholesterol membranständige Proteine und somit auch Ionenkanäle beeinflusst.

Es gibt Ionenkanäle, die bestimmte Cholesterolkonzentrationen für ihre korrekte Funktionalität benötigen und die durch veränderte Konzentrationen ihren üblichen zellulären Aufgaben nicht mehr nachkommen können (Levitan et al., 2014). Dabei ist eine Verminderung der Kanalaktivität mit zunehmender Cholesterolkonzentration der am häufigsten auftretende Effekt (Levitan et al., 2010), welcher beispielsweise auch am prokaryotischen Kir Kanal (KirBac_{1.1}) auftritt. Dieser besitzt eine direkte Bindestelle für Cholesterol (Singh et al., 2011). Eine veränderte Kanalaktivität kann, wenn er nicht aus einer direkten Cholesterolbindung resultiert, dem von Lundbaek und Andersen beschriebenen *Mismatch* Effekt zugeschrieben werden (Lundbaek & Andersen, 1999; Lundbaek, Birn, Girshman, Hansen, & Andersen, 1996).

Die dargestellten Daten zeigen, dass die untersuchten Kanäle auf die veränderten physikalischen Eigenschaften der Membran nicht mit einer Suppression, sondern mit einer Erhöhung der Kanalaktivität reagieren. Da die untersuchten Kanäle mit 82 AS und 78 AS pro Monomer alle komplett in die Membran eingebettet sind (Braun, Lachnit, et al., 2014), ist ein erhöhter negativer *Mismatch* durch hohe Cholesterolkonzentrationen, also einer erhöhten Membrandicke (McIntosh, 1978) zu erwarten. Bedingt daraus ist es wahrscheinlich, dass die

Kanäle mit einer Verformung oder Konformationsänderung reagieren, welche die Erhöhung der Leitfähigkeit ($K_{CV_{NTS}}$; **Abbildung 48 C**) oder der Offenwahrscheinlichkeit (K_{CV_S} und $K_{MP_{V12T}}$; **Abbildung 50 D**; **Abbildung 52 D**) hervorruft.

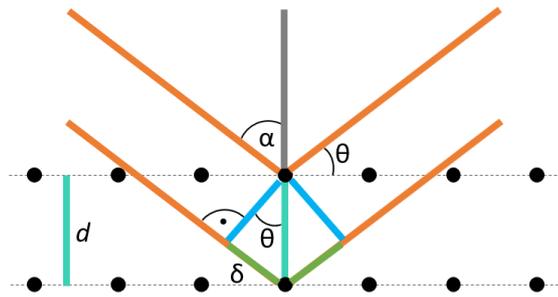
Da sich die Funktionsänderungen nicht mit einem ausgeprägteren *Mismatch* - Effekt (ansteigende Cholesterolkonzentrationen) verstärken, muss ein zusätzlicher Vorgang vonstattengehen, der eine weitere Konformationsänderung verhindert.

Setzt man diese Erkenntnis wiederum mit der Existenz von *Lipid - Rafts* in Verbindung, besteht die Möglichkeit, dass sich die Kanäle in Membranbereichen mit definierten Cholesterolkonzentrationen befinden und somit die eigentliche Konzentrationserhöhung in der gesamten Membran nicht sensieren.

3.4.2 $K_{CV_{NTS}}$ ist in der Lage eine definierte Cholesterolkonzentration von 20 mol% um sich herum zu rekrutieren.

Um die Hypothese, dass die viralen Kaliumkanäle sich in Bereichen mit definierten Cholesterolkonzentrationen aufhalten, weiter zu untersuchen, wurden zusätzliche Experimente mit dem viralen Kaliumkanal $K_{CV_{NTS}}$ durchgeführt.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Laura Cantu (Universität Mailand) wurden *Small Angle X-ray Scattering* (SAXS) Experimente am ESRF (European synchrotron radiation facility, Grenoble, Fr) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode wurden multilamellare Membranen (Membranstapel) mit Röntgenstrahlung einer definierten Wellenlänge ($\lambda = 0,1$ nm) für kurze Zeit (0,05 - 0,1 s) aus einem definierten Winkel (θ) bestrahlt und die reflektierte Strahlungsintensität gemessen, die sich aus den an den Membranen gebeugten und interferierenden Wellen ergibt (Braggsche Interferenz; **Abbildung 53 A**). Aus den SAXS Spektren **Abbildung 53 B** ist es möglich, die Abstände (d) der einzelnen Lamellen (Membranen) zu bestimmen und somit Rückschlüsse auf die eigentlichen Membrandicken zu ziehen.



$$n\lambda = 2d \cdot \sin \theta$$

Abbildung 53: Das Prinzip der Braggschen Interferenz und die zugehörige Bragg Gleichung.

Für die hier notwendigen Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Cholesterol auf die viralen Kaliumkanäle wurden die SAXS Spektren für Membranen aus DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin; **Abbildung 78**) mit (20 mol%, 25 mol% und 40 mol%) und ohne Cholesterol untersucht.

Generell zeigt jede der drei vermessenen Membranen ein anderes Spektrum, welches sich aus den jeweiligen interlamellaren Abständen ergibt. Die Membrandicken können aus den interlamellaren Abständen zwischen den Membranen ermittelt werden. Diese interlamellaren Abstände verringern sich mit zunehmender Cholesterolkonzentration, was auf eine Verdickung der Membran zurückzuführen ist (**Abbildung 54 A links und B**).

Die distinkten Intensitäten aus **Abbildung 54 A** (links) zeigen, dass Cholesterol in den DPPC Membranen homogen verteilt ist. Führt man jedoch das gleiche Experiment mit inserierten KCV_NTS Proteinen durch, weisen die Membranen mit 25 mol% und 40 mol% Cholesterol eine Phasentrennung auf, was durch das Vorhandensein von zwei Maxima im Spektrum angezeigt wird (**Abbildung 54 A rechts; Abbildung 54 B**). Sie besitzen demnach beide zwei unterschiedlichen Membrandicken, die ebenfalls anhand der verringerten interlamellaren Abständen aus **Abbildung 54 B** zu erkennen sind. Die eine Membrandicke entspricht ihrer eigentlichen durch X mol% Cholesterol bedingten Dicke und die zweite der von 20 mol% Cholesterol (**Abbildung 54 B**).

Da mittels SAXS nur Lipide und keine Proteine detektiert werden, ist es ausgeschlossen, dass die Kanalhöhe einer Membrandicke von DPPC mit 20 mol% Cholesterol entspricht und die zweite Phase nur auf den Kanal an sich zurückzuführen ist. Die Phasentrennung der Membranen mit höherer Cholesterolkonzentration und eingebauten Kanalproteinen weist

demnach darauf hin, dass das Cholesterol nicht mehr länger homogen in der Membran verteilt ist.

Da die Phasentrennung ohne Ionenkanäle und in Membranen aus DPPC mit 20 mol% nicht zu erkennen ist, lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass die Ionenkanäle für die Phasentrennung verantwortlich sind und sich in einer Umgebung aufhalten in der die Membrandicke einer Cholesterolkonzentration von 20 mol% entspricht.

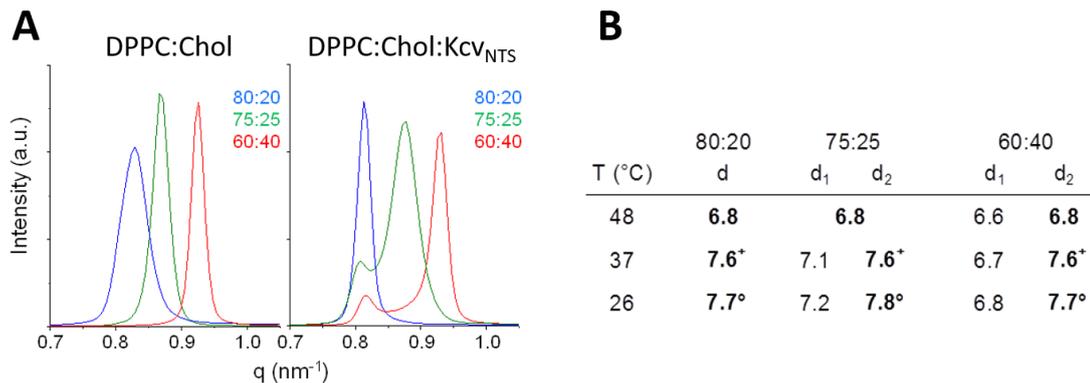


Abbildung 54: Die Insertion von KcV_{NTS} führt in Membranen mit verschiedenen Cholesterolkonzentrationen zu einer Phasentrennung und damit zu unterschiedlichen Membrandicken. A SAXS Spektren von DPPC Membranen ohne (links) und mit (rechts) KcV_{NTS}. B Interlamellare Membranabstände in nm der Membranen aus DPPC mit verschiedenen Cholesterolkonzentrationen bei verschiedenen Temperaturen nach Kanalinsertion. Der Abstand der dem einer Membran mit 20 mol% Cholesterol entspricht, ist jeweils fettgedruckt und zusätzlich temperaturspezifisch mit einem Symbol markiert.

Durch die homogene Verteilung des Cholesterols in Membranen ohne Ionenkanäle wird die grundlegende Existenz von *Lipid - Rafts* ausgeschlossen. Durch den Kanaleinbau scheint sich die Membran umzustrukturieren und es besteht die Möglichkeit, dass sich der virale Kaliumkanal KcV_{NTS} seine Membranumgebung selbst schafft, indem er ca. 20 mol% Cholesterol für seine nähere Umgebung rekrutiert. Mit anderen Worten: Erst die Anwesenheit des Kanalproteins ermöglicht die Bildung von *Lipid - Rafts*. Dementsprechend liefern die Ergebnisse der SAXS Messungen starke Hinweise darauf, dass der Kanal KcV_{NTS} in keinem Fall einer höheren Cholesterolkonzentration als 20 mol% ausgesetzt ist.

In einem weiteren Schritt sollte elektrophysiologisch überprüft werden ob KcV_{NTS} in allen Membranen aus DPPC mit verschiedenen Cholesterolkonzentrationen aufgrund der induzierten Phasentrennung des Kanals identische Funktionen zeigt. Dafür musste zunächst sichergestellt werden, dass KcV_{NTS} in DPPC Membranen überhaupt funktional ist, da DPPC im Gegensatz zu DPhPC andere Membraneigenschaften induziert.

Eine Membran aus DPPC ist mit 38 Å ungefähr 1,7 Å dicker und mit 62,8 Å² pro Lipid deutlich dichter gepackt als eine DPhPC Membran (78 Å²) (Norbert Kucerka et al., 2008). DPPC besitzt keine methylierten Fettsäureketten, was die Eigenschaften der hydrophoben Region im Vergleich zu DPhPC Membranen verändert. Zudem resultieren die unmethylierten Fettsäureketten und Lipideigenschaften in einer anderen Membranfluidität mit einem Phasenübergang bei 42°C.

Da DPPC eine sehr hohe Übergangstemperatur hat, wurde das Ölbad für die Versuche auf 24 °C – 32 °C erwärmt. Dennoch verschmolzen die *Bubbles* in den meisten Fällen nach 0,2 s - 1 s, weswegen die Kanalkonzentration stark erhöht werden musste, um sicherzustellen, dass in dieser kurzen Zeitspanne überhaupt Kanalschalten aufgezeichnet wurde. Diese einzelnen Datenpunkte wurden für jede Spannung gesammelt und anschließend zu einer gemittelten vollständigen Strom - Spannungskurve zusammengefügt (**Abbildung 56 A**).

Anhand von **Abbildung 55** ist erkennbar, dass KcV_{NTS} in reinen Membranen aus DPPC funktionell ist und auch in DPPC Membranen mit verschiedenen Cholesterolkonzentrationen kein verändertes Schaltverhalten zeigt.

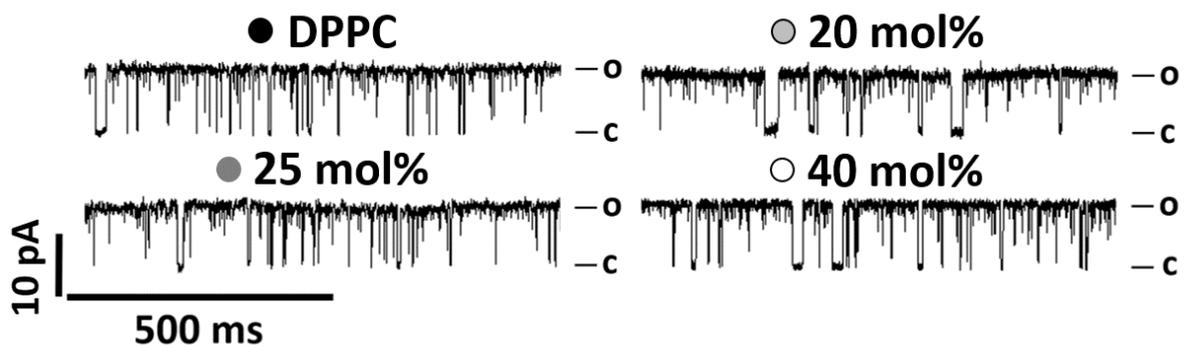


Abbildung 55: KcV_{NTS} ist in cholesterolhaltigen DPPC Membranen funktionell und zeigt identische Schaltereignisse in allen Membranen. Die charakteristischen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ±120 mV mit der CBB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen- und o das Offenniveau des Kanals.

KcV_{NTS} zeigt in CBB Membranen aus DPPC im Vergleich zu DPhPC Membranen eine nahezu identische mittlere Offenwahrscheinlichkeit (**Abbildung 56 B** und **D**) aber eine deutlich geringere Leitfähigkeit (**Abbildung 56 A** und **C**). Die Leitfähigkeiten mit Cholesterol in DPPC Membranen ähneln denen in reinen DPPC Membranen und reichen nicht an die Leitfähigkeit in reinen DPhPC Membranen heran (**Abbildung 56 C**). Auffällig ist jedoch die Stromerhöhung in DPPC Membranen mit Cholesterol bei positiven Spannungen > +80 mV im Vergleich zu

reinen DPPC Membranen (Abbildung 56 A). Die exakten Zahlenwerte sind der Tabelle 5 am Ende des Kapitels zu entnehmen.

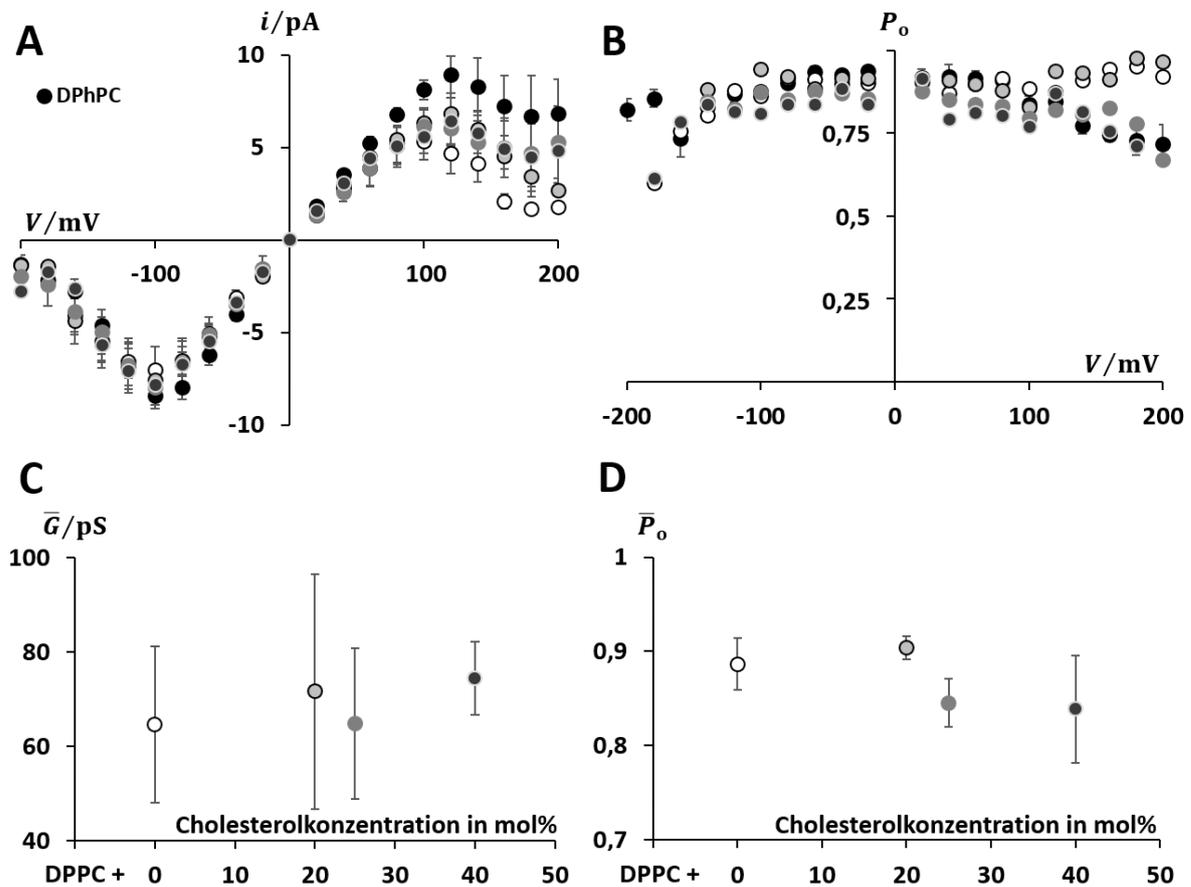


Abbildung 56: Die Leitfähigkeit von Kcv_{NTS} liegt in Membranen aus DPPC mit verschiedenen Cholesterolanteilen zwischen denen in reinen DPPC und DPhPC Membranen, während die Offenwahrscheinlichkeiten nur bei hohen positiven Spannungen variieren. **A** i/V Kurven. **B** Offenwahrscheinlichkeiten. **C** gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV sowie mittlere Offenwahrscheinlichkeiten (**D**) von Kcv_{NTS} in DPPC Membranen mit verschiedenen Cholesterolkonzentrationen. Alle Datenpunkte und Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messpunkten im CBB System. Die Symbole aus A und B entsprechen denen in C und D.

Prinzipiell sind die Verläufe der Strom - Spannungskurven jeder gemessenen Membran aus **Abbildung 56 A** gleich, woraus man schließen kann, dass die grundlegende Funktion des Kanals in DPPC Membranen zu Membranen aus DPhPC nicht verändert ist. Somit sind die Daten vergleichbar und durch die Funktionalität des Kanals ist eine Diskussion über eine mögliche Cholesterolrekrutierung gerechtfertigt.

Bei allen Cholesterolkonzentrationen (20 mol%, 25 mol% und 40 mol%) ist der Strom im Bereich hoher positiver Spannungen im Gegensatz zu reinen DPPC Membranen gleichermaßen

erhöht (**Abbildung 56 A**). Setzt man diese Erkenntnis mit den Ergebnissen der SAXS Messungen in Verbindung, bedeutet dies, dass sich in naher Lipidumgebung des KcV_{NTS} stets ca. 20 mol% Cholesterol befinden, woraus die identische Kanalfunktion und Stromerhöhung resultiert.

3.4.3 Zusammenfassung

Mit den Versuchen mit verschiedenen Cholesterolanteilen in DPhPC und DPPC Membranen sollte evaluiert werden, ob die Membranveränderungen, welche durch Cholesterol hervorgerufen werden, Auswirkungen auf virale Ionenkanäle haben.

Die hier untersuchten Kanäle sind für diese Untersuchung besonders interessant, da sie sehr klein sind und kaum einfache cholesterolfreie PC Membranen durchspannen (Braun, Lachnit, et al., 2014). Es ist davon auszugehen, dass die Zugabe von Cholesterol die Membrandicke aufgrund der gesättigten 16C - Fettsäureketten von DPPC weiter erhöht (McIntosh, 1978) und dass diese eine weitere strukturelle Herausforderung für die kleinen Kanäle ist.

Zusammengefasst geben alle durchgeführten Versuche (SAXS Messungen und elektrophysiologische Untersuchungen mit Cholesterol in DPPC Membranen) starke Hinweise darauf, dass kleine Ionenkanäle in der Lage sind die zunehmende Membrandicke und den daraus resultierenden hydrophoben *Mismatch* zu kompensieren. Die hochauflösenden SAXS Messungen legen nahe, dass die Kanalproteine dazu ihre eigene Membranumgebung mitgestalten indem sie Cholesterol um sich herum rekrutieren (*Lipid - Belt*) und somit eine Phasentrennung in Membranen mit Cholesterolkonzentrationen > 20 mol% verursacht. Die bevorzugte Cholesterolkonzentration scheint etwa 20 mol% zu sein. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Dicke einer Membran mit einem Anteil von ca. 20 mol% das energetische Optimum für den Kanal darstellt.

Auch anhand der elektrophysiologischen Daten von KcV_{NTS} in Cholesterol enthaltenden DPhPC Membranen ist erkennbar, dass der Effekt von verschiedenen Cholesterolkonzentrationen (10 mol%, 20 mol% und 30 mol%) auf den Kanal nahezu identisch ist und somit der Kanal auch in DPhPC Membranen in der Lage zu sein scheint, eine bestimmte Konzentration an Cholesterol um sich herum zu halten.

Dies kann bedeuten, dass zumindest KcV_{NTS} dazu fähig ist, den durch Cholesterol induzierten hydrophoben *Mismatch* zu kompensieren, indem er die für ihn energetisch und physikalisch favorisierte Dicke der Membran herstellt.

Auch die Daten mit dem KmpV_{12T} Kanal passen in dieses Bild. Sie weisen darauf hin, dass die Offenwahrscheinlichkeiten mit höheren Cholesterolkonzentrationen in DPhPC Membranen ansteigen, welche ab 20 mol% in Sättigung geht (**Abbildung 52**). Auch diese Daten können so

interpretiert werden, dass eine Umgebung von 20 mol% Cholesterol die thermodynamisch günstige Umgebung für den Kanal ist, um einen hydrophoben *Mismatch* zu vermeiden.

In weiteren SAXS Versuchen könnte diesbezüglich analysiert werden ob KCV_{NTS} mit Cholesterolkonzentrationen < 20 mol% ebenso eine Phasentrennung der Membran induziert oder ob für eine Cholesterolrekrutierung eine Mindestkonzentration in der Membran vorhanden sein muss. Mit diesen Ergebnissen könnten Rückschlüsse auf die ansteigende Offenwahrscheinlichkeit von Kmp_{V12T} gezogen werden.

Dass Cholesterol direkt an die hier untersuchten Ionenkanäle bindet ist unwahrscheinlich, da sie sich sequenziell sehr ähnlich sind und dennoch kanalspezifische Reaktionen auf Cholesterol zeigen.

Nach den hier präsentierten Ergebnissen muss der Einfluss von Cholesterol auf Ionenkanäle eventuell neu überdacht werden. Es ist möglich, dass die Bildung von „*Lipid - Rafts*“ oder „*Lipid - Belts*“ keine Eigenschaft von Cholesterol an sich ist, sondern von den in die Membran eingebetteten Proteinen begünstigt bzw. verursacht wird.

Tabelle 5: Gemittelte Leitfähigkeiten von $K_{CV_{NTS}}$, K_{CV_S} und $K_{mpv_{12T}}$ in verschiedenen Membranen mit diversen Cholesterolkonzentrationen; mittlere Offenwahrscheinlichkeiten von $K_{CV_{NTS}}$ und K_{CV_S} sowie die Offenwahrscheinlichkeitsdifferenz zwischen -160 mV und +160 mV von $K_{mpv_{12T}}$ in verschiedenen Membranen mit diversen Cholesterolkonzentrationen. Alle Daten stammen aus mind. drei unabhängigen Messungen der PLB Methode oder CBB Methode ($K_{CV_{NTS}}$; DPPC). Die Markierungen der Membranzusammensetzungen entsprechen den Symbolen der Graphen in den zugehörigen Abbildungen.

$K_{CV_{Next\ to\ Smith}}$		
Cholesterolkonzentration in mol% (PLB)	\bar{G}/pS	\bar{P}_o
● 0 (n = 6)	81,7 ± 12,3	0,92 ± 0,02
○ 10 (n = 6)	92,4 ± 7,7	0,89 ± 0,03
◐ 20 (n = 10)	95,4 ± 10,5	0,91 ± 0,04
◑ 30 (n = 7)	97,8 ± 7,5	0,91 ± 0,02
Membranzusammensetzung (CBB)		
● DPhPC (n = 6)	94,8 ± 6,6	0,86 ± 0,03
○ DPPC (n = 11)	64,5 ± 16,6	0,89 ± 0,03
◐ DPPC + 20 mol% (n = 10)	71,6 ± 24,9	0,9 ± 0,02
◑ DPPC + 25 mol% (n = 12)	64,9 ± 16	0,85 ± 0,03
● DPPC + 40 mol% (n = 6)	74,4 ± 7,7	0,84 ± 0,07
$K_{CV_{Smith}}$		
Cholesterolkonzentration in mol% (PLB)	\bar{G}/pS	\bar{P}_o
● 0 (n = 10)	92,4 ± 9,4	0,36 ± 0,14
○ 10 (n = 8)	91,9 ± 7,9	0,62 ± 0,08
◐ 20 (n = 4)	86,6 ± 17,1	0,5 ± 0,21
◑ 30 (n = 4)	100,4 ± 11,6	0,49 ± 0,07
$K_{mpv_{12T}}$		
Cholesterolkonzentration in mol% (PLB)	\bar{G}/pS	$\Delta P_o (-160 - (+160))$
● 0 (n = 10)	36,6 ± 4,7	0,18 ± 0,13
○ 10 (n = 10)	35,4 ± 2,3	0,36 ± 0,11
◐ 20 (n = 5)	36,5 ± 0,9	0,56 ± 0,08
◑ 30 (n = 3)	50,8 ± 9,2	0,57 ± 0,16

3.5 Der Einfluss von anionischen Lipiden auf virale Kaliumkanäle

Biologische Membranen enthalten neben verschiedenen ungeladenen Lipiden und Sterolen auch geladene Lipide. Während mono- und bivalente Kopfgruppen aufgrund ihrer Verteilung und Abstoßung in einer Membran zwar die Oberflächenladung erhöhen, sind die Auswirkungen in der Membranebene eher gering (Brockman et al., 2003). Für höher geladene Lipide wie beispielsweise das Signallipid PIP₂ kann aufgrund der erhöhten elektrostatischen Abstoßung ein signifikant erhöhter Oberflächendruck entstehen (Levental, Janmey, & Cēbers, 2008).

Neben diesen Einflüssen auf den Lipid - *Bilayer* können Ladungen in einer Membran auch gravierend auf viele physikalische Eigenschaften wie Dicke, lateraler Druck, Oberflächenladung oder Krümmung einwirken. Mechanosensitive Proteine oder Kanäle können von solchen Membranveränderungen betroffen sein und veränderte Funktionen zeigen. Ein Beispiel hierfür ist der kleine dimere Ionenkanal Gramicidin A. Die Kinetiken dieses bakteriellen Kanals sind sensitiv gegenüber der Membrandicke, deren mechanischer Spannung und der intrinsischen *Monolayer* - Krümmung (Elliott, Needham, Dilger, & Haydon, 1983; Lundbaek & Andersen, 1994). Ein weiteres Beispiel ist das SARS - CoV E Protein. Die Leitfähigkeit dieses viralen Kanalproteins ist in Membranen, die anionisches DPhPS enthalten signifikant reduziert (Verdiá-Báguena et al., 2013).

Neben einem Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften der Membran können geladene Lipide auch Membranproteine direkt durch eine Bindung beeinflussen. So ist beispielsweise die Mechanosensitivität von GIRK Kanälen in erster Linie durch die Bindung von PIP₂ an das Kanalprotein bestimmt (Zhang, 2004; Huang 1998). Ebenso wird auch dem Modellkanal KcsA nachgesagt, dass er nur unter Bindung von anionischen Lipiden vollkommen funktionsfähig sei (Williamson 2003; Marius et al 2008; Alvis 2003).

Nachdem in den bisherigen Experimenten ausschließlich ungeladene Lipide für die Protein-Lipid-Untersuchungen der viralen Kaliumkanäle Kcv_{NTS}, Kcv_S und Kmpv_{12T} verwendet wurden, soll im Folgenden die Auswirkungen negativer Ladungen analysiert werden.

Im ersten Abschnitt des Kapitels wurde der Einfluss monovalenter Lipide (DPhPS und DPhPG) und multivalenter anionischer Lipide in Form von PIP₂ auf die drei viralen Kaliumkanäle untersucht. Des Weiteren wurde ein molekularer Mechanismus lokalisiert, über den DPhPS auf Kcv - Kanäle wirken kann. Im letzten Abschnitt dieses Kapitels wurden Hinweise gesammelt, dass der Angriffspunkt von DPhPS wahrscheinlich auf intrazellulärer Membranseite liegt.

3.5.1 Der Einfluss von DPhPS auf die viralen Kaliumkanäle Kcv_{NTS} , Kcv_S und $Kmpv_{12T}$

Zur Untersuchung der drei viralen Kaliumkanäle Kcv_{NTS} , Kcv_S und $Kmpv_{12T}$ wurde das synthetische Lipid DPhPS (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phospho-L-Serin) (Abbildung 78) verwendet, welches genau wie DPhPC zwei gesättigte, methylierte 16C - Fettsäureketten besitzt. Dadurch kann festgestellt werden ob der Serinrest oder die monovalente Ladung der Kopfgruppe Auswirkungen auf die Kanalfunktion der untersuchten Kanäle hat.

In **Abbildung 57** sind exemplarische Stromspuren von $Kmpv_{12T}$ abgebildet, die aus Messungen in Membranen mit verschiedenen DPhPS - Konzentrationen stammen. $Kmpv_{12T}$ ist unabhängig von der Membranladung grundlegend funktionell, die Effekte der anionischen Ladung sind jedoch divers. Die Offenkanalamplituden sind in Membranen, ab 50 mol% DPhPS, erhöht. Die Unterleitfähigkeit des Kanals, die auch unter Kontrollbedingungen registriert wurde, ist weiterhin präsent, wurde aber nicht weiter analysiert.

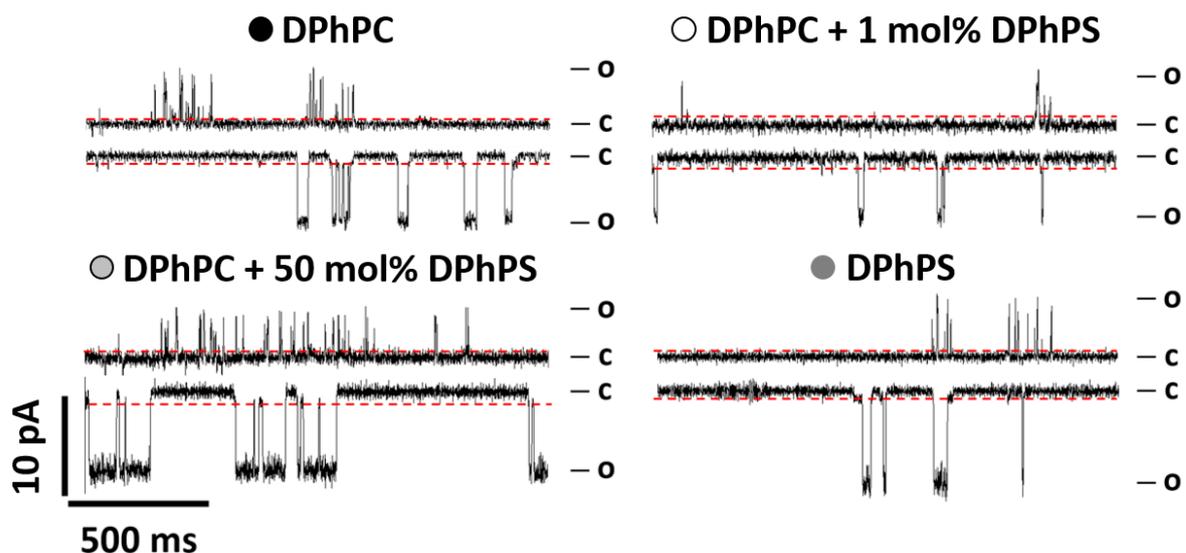


Abbildung 57: DPhPS führt mit steigender Konzentration zu vergrößerten Offenkanalamplituden, während die Offenwahrscheinlichkeiten mit 1 mol% und in reinen DPhPS Membranen verringert sind, in Membranen aus 50 mol% jedoch erhöht sind. Die repräsentativen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 160 mV mit der PLB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen-, o das Offenniveau und die rote Linie die Unterleitfähigkeit des $Kmpv_{12T}$ Kanals.

Kmpv_{12T} zeigt im Vergleich zu reinen DPhPC Membranen in *Bilayern* mit steigenden DPhPS - Konzentrationen ab 50 mol% signifikant erhöhte Leitfähigkeiten (Abbildung 58 A und C). Die Offenwahrscheinlichkeit in Membranen mit 1 mol% und 100 mol% DPhPS ist im Vergleich zur Kontrollmembran aus DPhPC niedriger, während sie in Membranen, die 50 mol% DPhPS enthalten nahezu identisch ist (Abbildung 58 B und D). Da die Standardabweichungen sehr groß sind, können keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Offenwahrscheinlichkeitsdifferenz zwischen -160 mV und +160 mV von Kmpv_{12T} in Membranen mit DPhPS festgestellt werden (Abbildung 58 D). Die Zahlenwerte sind der Tabelle 6 am Ende des Kapitels zu entnehmen.

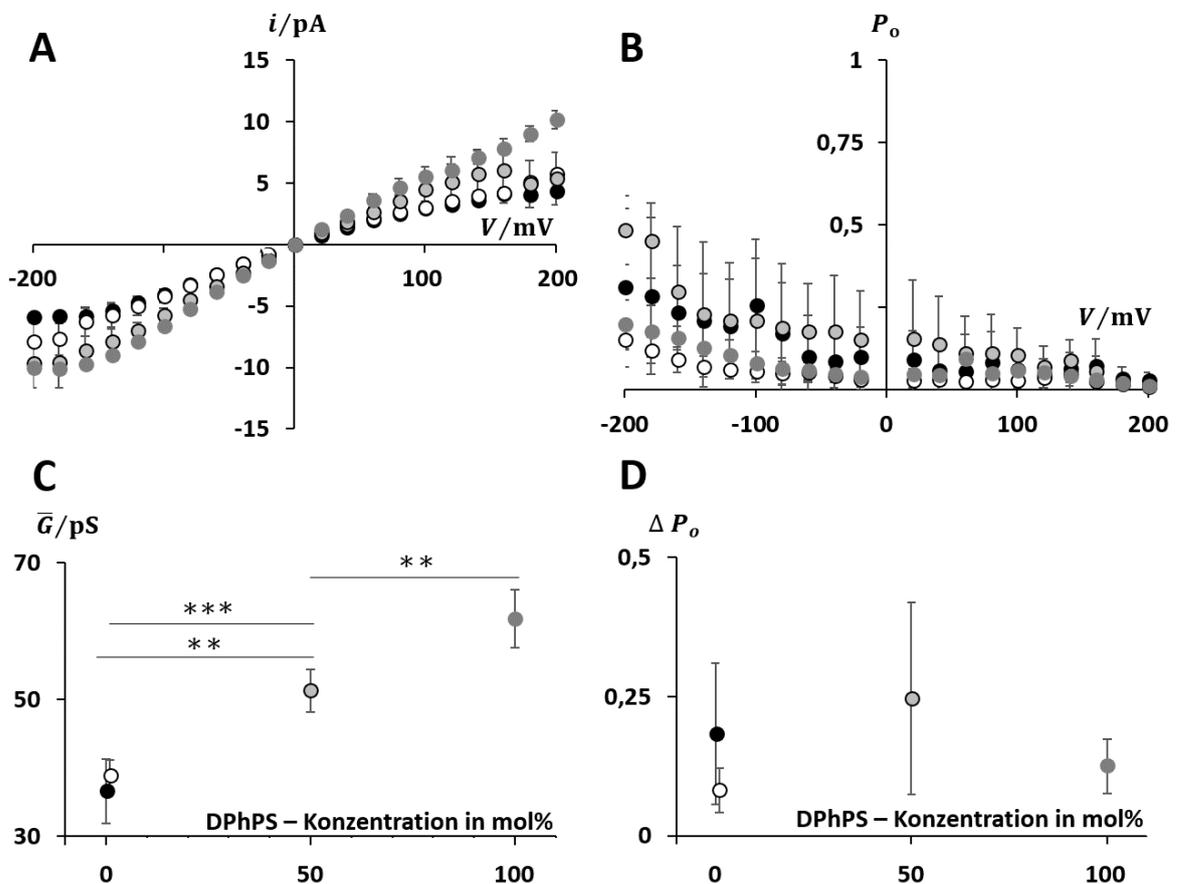


Abbildung 58: Die Leitfähigkeiten von Kmpv_{12T} sind in Membranen mit steigenden DPhPS - Konzentrationen erhöht, während die Auswirkungen auf die Offenwahrscheinlichkeiten divers sind. A i/V Kurven. B Offenwahrscheinlichkeiten. C gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV, sowie die Differenz der Offenwahrscheinlichkeit (D) zwischen -160 mV und +160 mV von Kmpv_{12T} in Membranen mit DPhPS Konzentrationen von 0 mol%, 1 mol%, 50 mol% und 100 mol%. Alle Datenpunkte und Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen am Planaren Lipid *Bilayer*. Die Symbole aus A und B entsprechen denen in C und D.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der sehr kleine KmpV_{12T} Kanal in anionischen Membranen funktionsfähig ist, wurden die beiden Kcv - Kanäle Kcv_{NTS} und Kcv_S ebenfalls in Membranen mit anionischen Lipiden untersucht.

In **Abbildung 59** ist erkennbar, dass sich Kcv_{NTS} ebenfalls in geladene Membranen einbaut und seine grundlegende Funktion beibehält. Zu erkennen sind jedoch erhöhte Offenkanalamplituden sowie eine Verminderung der Geschlossenereignisse in Membranen mit hohem DPhPS - Anteil (**Abbildung 59**).

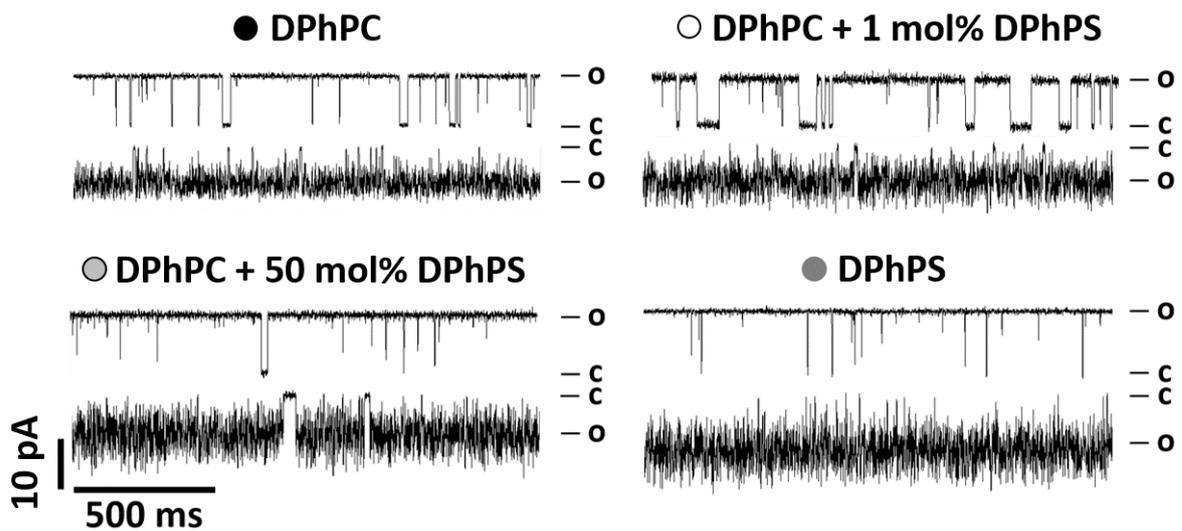


Abbildung 59: DPhPS führt mit steigender Konzentration zu vergrößerten Offenkanalamplituden von Kcv_{NTS}, während die Geschlossenphasen mit 1 mol% vermehrt auftreten und in Membranen über 50 mol% jedoch noch seltener auftreten als in reinen DPhPC Membranen. Die repräsentativen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 120 mV mit der PLB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen-, o das Offenniveau des Kanals.

Genauere Analysen der Daten von Kcv_{NTS} in DPhPS enthaltenden Membranen zeigen, dass die Leitfähigkeit ab einer DPhPS - Konzentration von 50 mol% im Vergleich zu reinen DPhPC Membranen signifikant erhöht ist. (**Abbildung 60 C**). Es ist weiterhin zu erkennen, dass der Leitfähigkeitsanstieg nicht proportional zur DPhPS - Konzentration ansteigt, sondern in Form einer Sättigungskurve verläuft. (**Abbildung 60 C**).

Der Effekt des anionischen Lipids auf die mittlere Offenwahrscheinlichkeit manifestiert sich im Gegensatz zur mittleren Leitfähigkeit erst mit höheren Konzentrationen. Zu beachten ist, dass die Offenwahrscheinlichkeit des Kcv_{NTS} in reinen DPhPS Membranen schon über 90% liegt. Eine signifikante Steigerung dieser schon sehr hohen Offenwahrscheinlichkeit ist demnach höchst beachtlich (**Abbildung 59**; **Abbildung 60 B** und **D**). Die exakten Zahlenwerte sind der **Tabelle 6** am Ende des Kapitels zu entnehmen.

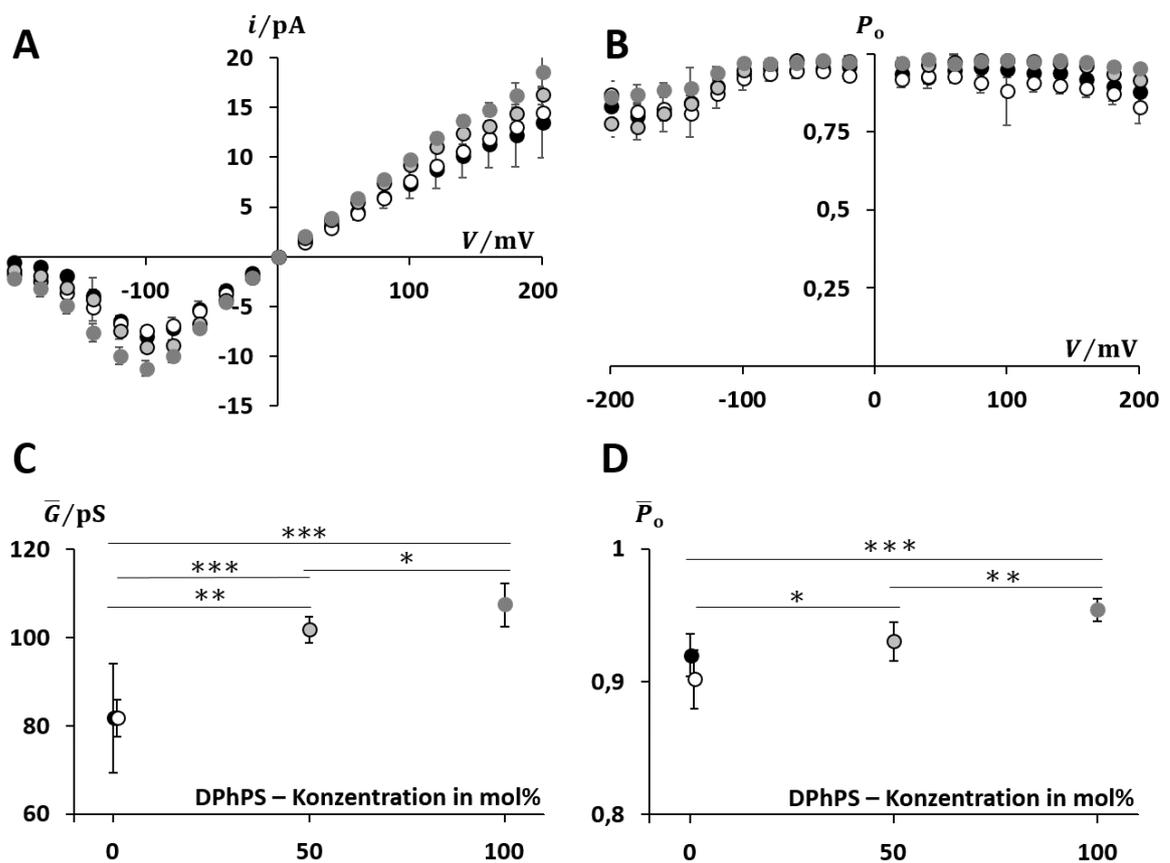


Abbildung 60: Kcv_{NTS} zeigt mit steigenden DPhPS Konzentrationen erhöhte Leitfähigkeiten und erhöhte mittlere Offenwahrscheinlichkeiten. A i/V Kurven. B Offenwahrscheinlichkeiten. C gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV, sowie die mittleren Offenwahrscheinlichkeiten (D) von Kcv_{NTS} in Membranen mit DPhPS Konzentrationen von 0 mol%, 1 mol%, 50 mol% und 100 mol%. Alle Datenreihen und Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen am Planaren Lipid *Bilayer*. Die Symbole in A und B entsprechen denen aus C und D.

Im Gegensatz zu den bisher in dieser Arbeit gefundenen, meist recht subtilen Effekten, ist der Effekt von DPhPS auf Kcv_S sehr deutlich. In **Abbildung 61** ist zu erkennen, dass sich der Phänotyp von Kcv_S in reinen Membranen aus DPhPS sehr stark dem von Kcv_{NTS} in reinem DPhPC gleicht.

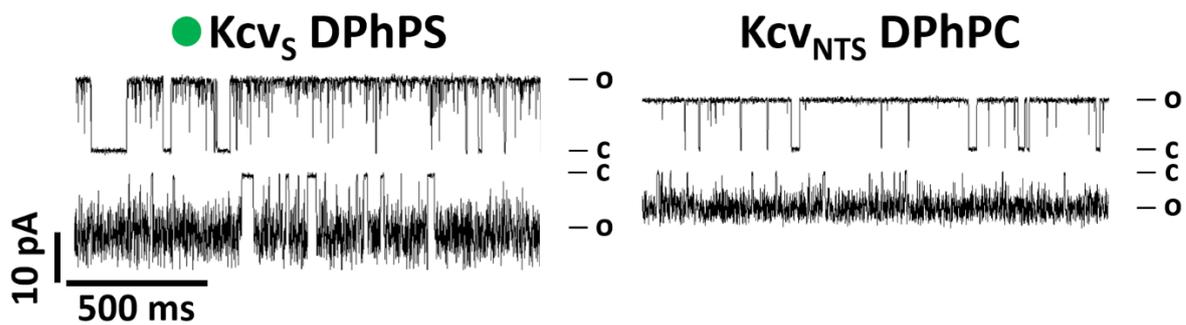


Abbildung 61: Kcv_S zeigt in reinen DPhPS Membranen (links) nahezu das gleiche *Gating*-Verhalten wie Kcv_{NTS} in DPhPC Membranen (rechts). Die repräsentativen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 120 mV mit der PLB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen-, o das Offenniveau des Kanals.

Aufgrund dieser starken Auswirkungen von DPhPS auf Kcv_S wurde die Empfindlichkeit dieses Kanals gegenüber DPhPS näher untersucht; die Dosis - Wirkungszusammenhänge sind in **Abbildung 62** bis **Abbildung 64** gezeigt.

Kcv_S wurde in Membranen aus DPhPC mit verschiedenen DPhPS - Konzentrationen (1 mol%, 5 mol%, 25 mol%, 50 mol%, 75 mol%) gemessen; die zugehörigen repräsentativen Stromspurenbilder sind in **Abbildung 62** abgebildet.

Zunächst fällt auf, dass ebenso wie bei Kcv_{NTS} 1 mol% DPhPS keine Auswirkungen auf die Funktion von Kcv_S hat. Ab einer Konzentration von 5 mol% werden die Geschlossenphasen von Kcv_S kürzer und seltener, was zu erhöhten Offenkanalzeiten führt. Die Offenkanalamplituden erhöhen sich ebenfalls mit steigenden DPhPS - Konzentrationen.

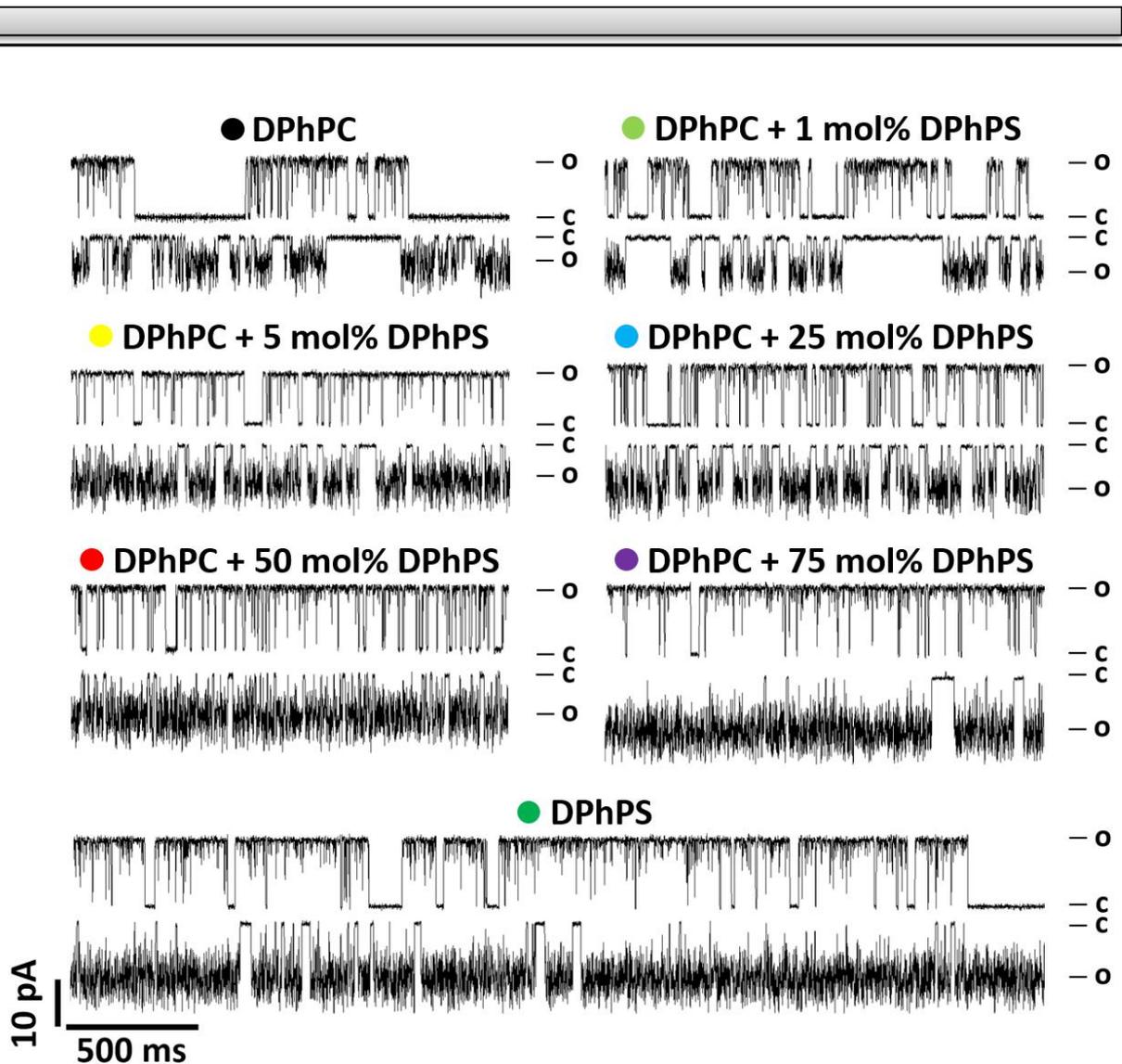


Abbildung 62: Kcv_S reagiert auf steigende DPhPS - Konzentrationen mit einem Anstieg der Offenkanalamplitude sowie einem Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit aufgrund von selteneren langen Geschlossenphasen. Die repräsentativen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 120 mV mit der PLB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen-, o das Offenniveau des Kanals.

Anhand der Leitfähigkeiten in **Abbildung 63 A** und **C** ist zu erkennen, dass DPhPS ab einer Konzentration von 25 mol% zu einem hoch signifikanten Anstieg der Leitfähigkeit führt (**Abbildung 63 C**). Jedoch kann diese Erhöhung nicht durch eine Sättigungskurve, sondern durch einen zweiphasigen Anstieg beschrieben werden.

In Bezug auf die Änderung der Offenwahrscheinlichkeit ähneln sich die Effekte von Kcv_{NTS} und Kcv_S nicht (Vgl. **Abbildung 60** und **Abbildung 63**). Während die Erhöhung der mittleren Offenwahrscheinlichkeit von Kcv_{NTS} mit höheren DPhPS - Konzentrationen deutlicher wurde (**Abbildung 60 D**), scheinen bei Kcv_S zwei unterschiedliche Effekte aufzutreten (**Abbildung 63 B** und **D**). Ein hochaffiner Effekt, der die mittlere Offenwahrscheinlichkeit

zwischen 1 mol% und 5 mol% stark ansteigen lässt, und ein niederaffiner Effekt, der anschließend zwischen 5 mol% und reinen DPhPS Membranen nur noch einen leichten aber dennoch signifikanten Anstieg bedingt (Abbildung 63 B und D). Die exakten Zahlenwerte sind der Tabelle 6 am Ende des Kapitels zu entnehmen.

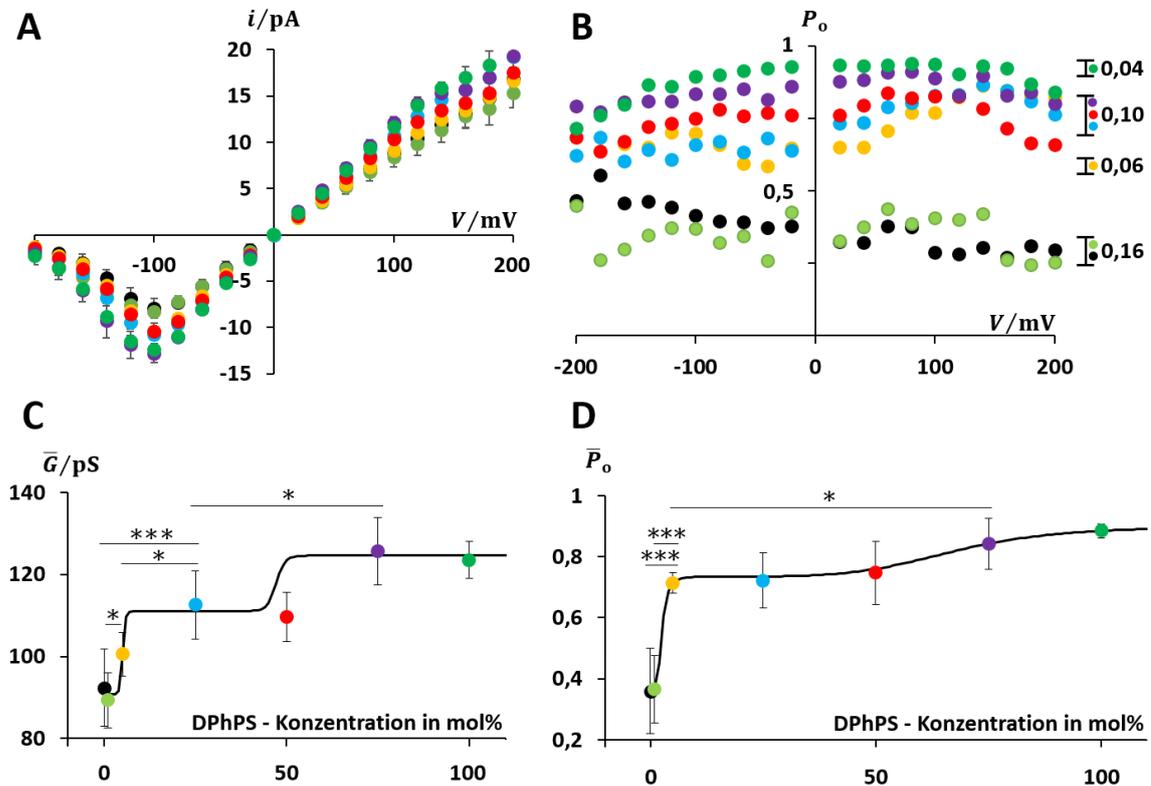


Abbildung 63: DPhPS erhöht die Leitfähigkeit und die mittlere Offenwahrscheinlichkeit von KcvS in zwei Schritten. **A** i/V Kurven. **B** Offenwahrscheinlichkeiten. **C** gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis $+60$ mV, sowie die mittleren Offenwahrscheinlichkeiten (**D**) von KcvS in Membranen mit DPhPS Konzentrationen von 0 mol%, 1 mol%, 5 mol%, 25 mol%, 50 mol%, 75 mol% und 100 mol%. Die Kurven aus **C** und **D** können mit einer Summe aus zwei Hill - Funktionen (schwarze Linien; Gleichung 3) beschrieben werden. Der Fit ergibt für die Erhöhung der Leitfähigkeit folgende Werte: $EC50_1 = 5$ mol% DPhPS; $EC50_2 = 47,1$ mol% DPhPS; $h_1 = 14,3$; $h_2 = 38,6$. Für die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit liefern die Berechnungen diese Werte: $EC50_1 = 2,6$ mol% DPhPS; $EC50_2 = 67,1$ mol% DPhPS; $h_1 = 4,3$; $h_2 = 5,7$. Alle Datenpunkte und Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen am Planaren Lipid *Bilayer*. Die Symbole in **A** und **B** entsprechen denen in **C** und **D**.

Der zweiphasige Verlauf der Dosis - Wirkungskurve der Leitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit in **Abbildung 63 D** lässt sich mit einer Summe aus zwei Hill - Funktionen beschreiben. Dabei steht x für die DPhPS - Konzentration, EC50 für die Konzentration, bei der der Effekt halbmaximal ist, h für den Hill - Koeffizienten und A als Parameter für die Aktivität in Form der mittleren Leitfähigkeit (**Abbildung 63 C**) oder der mittleren Offenwahrscheinlichkeit (**Abbildung 63 D**).

$$A = \frac{[x_{DPhPS}]^{h_1} \cdot (A_{max1} - A_{min1})}{(EC50_1^{h_1} + [x_{DPhPS}]^{h_1})} + A_{min1} + \frac{[x_{DPhPS}]^{h_2} \cdot (A_{max2} - A_{max1})}{(EC50_2^{h_2} + [x_{DPhPS}]^{h_2})} \quad (3)$$

Aus den *Fits* mit Hilfe von Gleichung 3 geht hervor, dass die halbmaximale Erhöhung der Leitfähigkeit (EC50₁) des hochaffinen Effekts (0 mol% - 25 mol%) bei einer Konzentration von 5 mol% DPhPS liegt und die des niederaffinen (EC50₂) bei 47,1 mol%. Die Hill - Faktoren der gezeigten Kurve betragen 14,3 (h₁) und 38,6 (h₂), besonders h₂ und EC50₂ sind jedoch aufgrund der wenigen Datenpunkte nur bedingt aussagekräftig. Für die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit ergeben die Berechnungen eine halbmaximale Erhöhung (EC50₁) des affinen Effekts (0 mol% - 5 mol%) bei einer Konzentration von 2,6 mol% und eine des niederaffinen Effekts (EC50₂) bei 67,1 mol%. Die Hill - Faktoren betragen 4,3 (h₁) für den ersten und 5,8 (h₂) für den zweiten Effekt auf die Offenwahrscheinlichkeit.

Da der Anstieg der mittleren Offenwahrscheinlichkeit sehr deutlich ist (**Abbildung 63 B und D**) und auch bereits in den Stromspuren zu erkennen ist, dass die für Kcv_S charakteristischen längeren Geschlossenzeiten unterrepräsentiert sind (**Abbildung 62**), wurden zusätzliche *Dwelltime* - Analysen durchgeführt (**Abbildung 64**). In **Abbildung 64 A** ist zu erkennen, dass Kcv_S drei Geschlossenzustände und einen Offenzustand besitzt (vgl. auch Kapitel 3.1.1). Befindet sich der Kanal in DPhPS Membranen (**Abbildung 64 B**), bleiben alle charakteristischen Zustände erkennbar, zeigen jedoch einige markante Veränderungen.

Anhand der Offenzeit - Histogramme in **Abbildung 64 A und B** rechts ist erkennbar, dass die Offenzeiten mit DPhPS in der Membran deutlich länger sind aber seltener auftreten als in reinen DPhPC Membranen. Dies ist auf die reduzierte Häufigkeit an kurzen Geschlossenereignissen (C2) zurückzuführen (**Abbildung 64 A und B links**). Die Geschlossenzeit - Histogramme auf der linken Seite in **Abbildung 64** verdeutlichen zudem, dass sich die durchschnittliche Dauer der drei Geschlossenzustände verkürzt. Dieser Umstand wird noch einmal in **Abbildung 64 C** verdeutlicht. Während die mittlere Lebensdauer (τ) jedes Geschlossenzustandes mit steigender DPhPS - Konzentration sinkt, steigt die Lebensdauer des Offenzustands. Wie bereits beschrieben ändert sich nicht nur die Dauer der Geschlossenzustände, sondern auch die

Häufigkeit deren Eintretens, was in einer fallenden Geschlossenwahrscheinlichkeit und einer steigenden Offenwahrscheinlichkeit resultiert (**Abbildung 64 D**).

Bringt man die Erkenntnis, dass anscheinend zwei unterschiedliche Effekte (Hillfunktionsanalyse) den Anstieg der mittleren Offenwahrscheinlichkeit bedingen (**Abbildung 63 D**) mit den *Dwelltime* - Analysen aus **Abbildung 64** zusammen, fällt auf, dass der erste hochaffine Effekt zwischen 1 mol% und 5 mol% ($EC_{50_1} = 2,6 \text{ mol\%}$) eindeutig der reduzierten Lebensdauer des dritten Geschlossenzustandes (**Abbildung 64 C**) und der reduzierten Wahrscheinlichkeit dessen geschuldet ist (**Abbildung 64 D**). Der zweite niederaffine Effekt mit einem EC_{50_2} - Wert von 67,1 mol% scheint durch den starken Abfall aller Geschlossenwahrscheinlichkeiten und dessen reduzierten Eintrittswahrscheinlichkeiten zwischen 50 mol% und 100 mol% bedingt zu sein (**Abbildung 64 C und D**).

Zur genaueren Analyse des ersten hochaffinen Effektes, der hauptsächlich den dritten Geschlossenzustand (**Abbildung 64 C und D**) betrifft, müssen in Zukunft weitere Versuche mit geringeren DPhPS - Konzentrationen zwischen 1 mol% und 5 mol% durchgeführt werden.

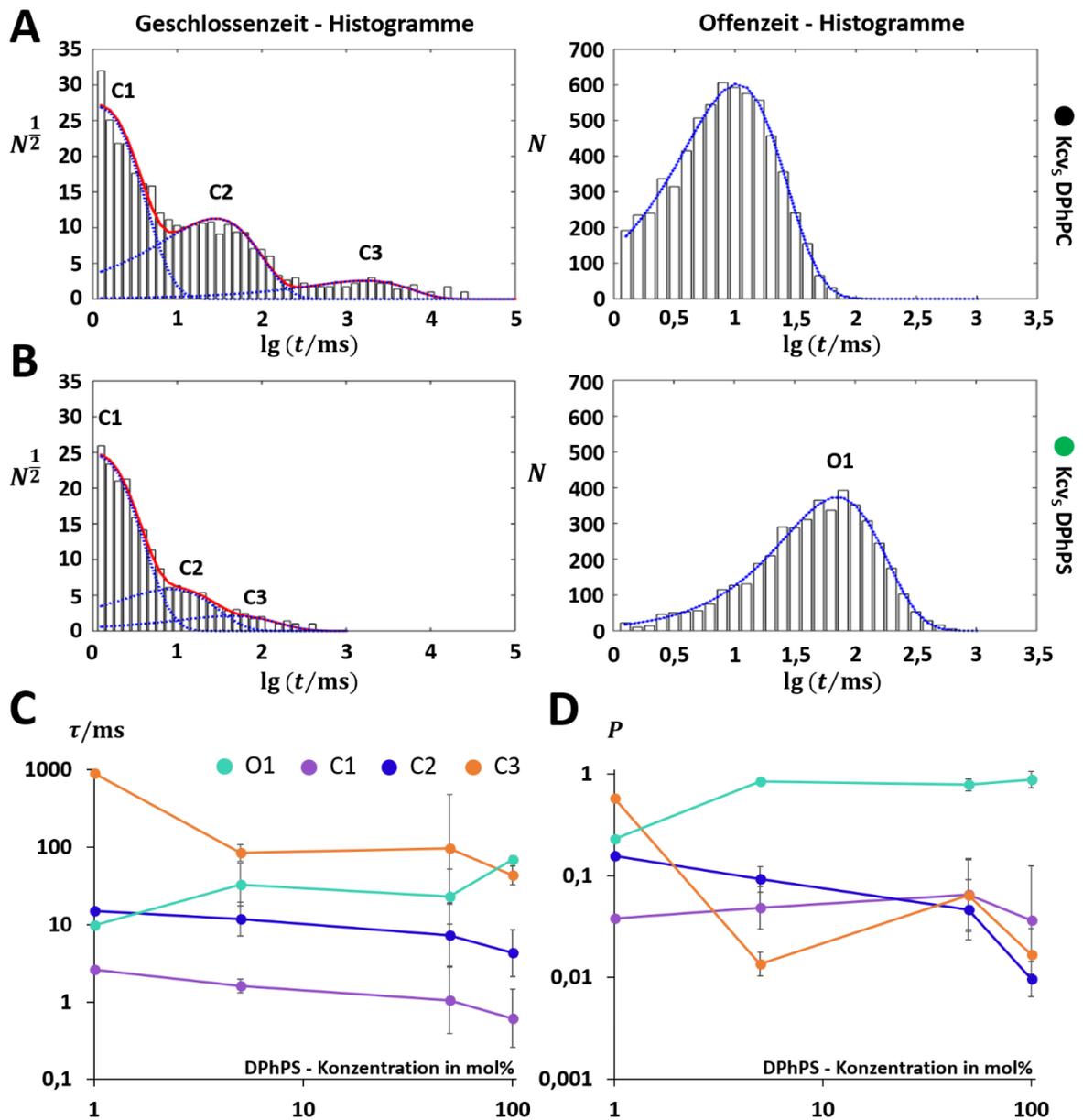


Abbildung 64: *Dwelltime*-Analysen von Kcv_5 in verschiedenen DPhPS Membranen (1 mol%, 5 mol%, 50 mol% und 100 mol%) zeigen, dass der hochaffine erste Effekt mit einer verkürzten Lebensdauer und Besetzungswahrscheinlichkeit des dritten Geschlossenzustandes einhergeht, während der zweite niederaffine Effekt hingegen durch alle drei Geschlossenzustände hervorgerufen wird. **A** Repräsentative Geschlossen- und Offenzeithistogramme von Kcv_5 in DPhPC Membranen. **B** Repräsentative Geschlossen- und Offenzeithistogramme von Kcv_5 in DPhPS Membranen. **C** Mittlere Lebensdauern der Geschlossen- und Offenzustände (doppelt logarithmisch aufgetragen). **D** Besetzungswahrscheinlichkeiten aller Geschlossen- und Offenzustände (doppelt logarithmisch aufgetragen). Die Analyse von 1 mol% DPhPS entstammt einer einzelnen Messung. Alle anderen Datenpunkte und deren Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen bei +120 mV am Planaren Lipid *Bilayer*. Die aufgetragenen Zustände aus C und D entsprechen denen in B.

DPhPS (Mitte) und DPhPG (rechts) haben auf alle Kanäle dieselben kanalspezifischen Auswirkungen (Abbildung 66).

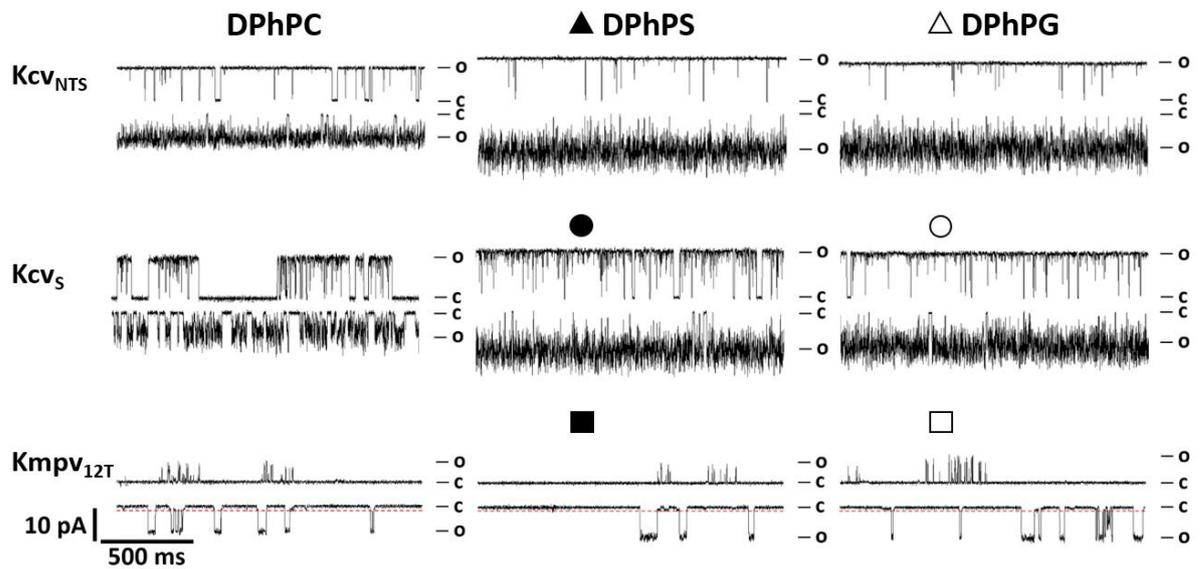


Abbildung 66: Kcv_{NTS} , Kcv_S und $Kmpv_{12T}$ weisen in reinen anionischen Membranen aus DPhPG oder DPhPS identische Eigenschaften auf. Die repräsentativen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 120 mV (Kcv - Kanäle) und ± 160 mV ($Kmpv_{12T}$) mit der PLB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen-, o das Offenniveau und die rote Linie die Unterleitfähigkeit des $Kmpv_{12T}$ Kanals.

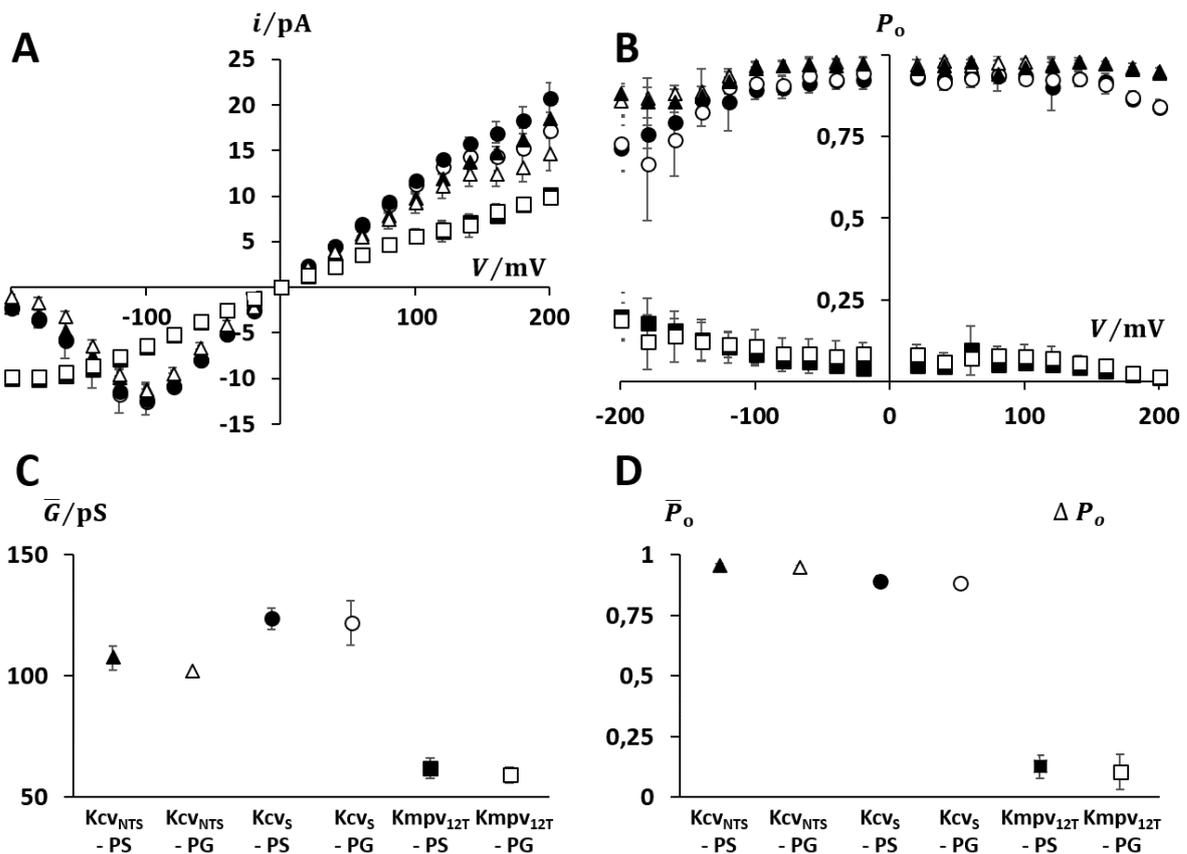


Abbildung 67: Die Leitfähigkeiten und mittleren Offenwahrscheinlichkeiten der einzelnen Kanäle sind in Membranen aus DPhPS und DPhPG nahezu identisch. A i/V Kurven. B Offenwahrscheinlichkeiten. C gemittelte Leitfähigkeiten aller Kanäle im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV. D gemittelte Offenwahrscheinlichkeiten von Kcv_{NTS} und Kcv_S , sowie die Differenz der Offenwahrscheinlichkeit zwischen -160 mV und +160 mV von $Kmpv_{12T}$ in DPhPS und DPhPG Membranen. Alle Datenpunkte und Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen am Planaren Lipid *Bilayer*. Die Symbole aus A und B entsprechen denen aus C und D.

Wie anhand **Abbildung 66** und **Abbildung 67** zu erkennen ist, haben DPhPG und DPhPS die gleichen Auswirkungen auf Kcv_{NTS} , Kcv_S und $Kmpv_{12T}$. Da die Wahrscheinlichkeit sehr gering ist, dass die DPhPS und die DPhPG Kopfgruppe ladungsunabhängig die gleichen Auswirkungen auf die untersuchten Kanäle haben, kann davon ausgegangen werden, dass dessen Ladung die veränderten Funktionseigenschaften der Kanäle bedingt. Die exakten Zahlenwerte sind der **Tabelle 6** am Ende des Kapitels zu entnehmen.

3.5.2 Die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit von Kcv_s ist spezifisch für monovalente anionische Lipide

Zellmembranen enthalten nicht nur Lipide mit einfachen Ladungen in der Kopfgruppe, sondern es existieren ebenso Lipide mit mehreren Ladungen wie beispielsweise das Signallipid PIP₂ (**Abbildung 78** im Anhang). Hierbei handelt es sich um ein anionisches Lipid mit einem Myoinositolring in der Kopfgruppe, welcher an drei potenziellen Stellen phosphoryliert werden kann und somit in der Lage ist, bis zu vier negative Ladungen zu tragen (Kapitel 1.1.2.1.1).

Nachdem die viralen Kaliumkanäle Kcv_{N_{TS}}, Kcv_s, und Kmpv_{12T} von monovalenten anionischen Lipiden (DPhPS und DPhPG) in der Kopfgruppe beeinflusst werden können, soll in einem weiteren Versuch untersucht werden, ob Mehrfachladungen an einem Lipid vergleichbare Auswirkungen auf Kcv_s haben. Aufgrund der niedrigen physiologischen Konzentration von PIP₂ wurden nur Konzentrationen von 0,1 mol% und 1 mol% verwendet. Bei dem hier verwendeten PIP₂ handelt es sich um L- α -phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, welches an Position vier und fünf des Myoinositolringes phosphoryliert ist und somit bei neutralem pH-Wert eine Nettoladung von -4 besitzt (Hilgemann, 2007).

Ebenso wie auch in DPhPS enthaltenden Membranen, lässt sich Kcv_s in Membranen untersuchen, die geringe PIP₂-Konzentrationen enthalten (**Abbildung 68**). Während Kcv_s nicht auf eine Konzentration von 0,1 mol% reagiert (**Abbildung 68** mitte), verringert eine PIP₂-Konzentration von 1 mol% die Offenkanalamplitude bei hohen positiven Spannungen gravierend (**Abbildung 68** rechts). Die Offenwahrscheinlichkeit scheint weitgehend unverändert zu bleiben.

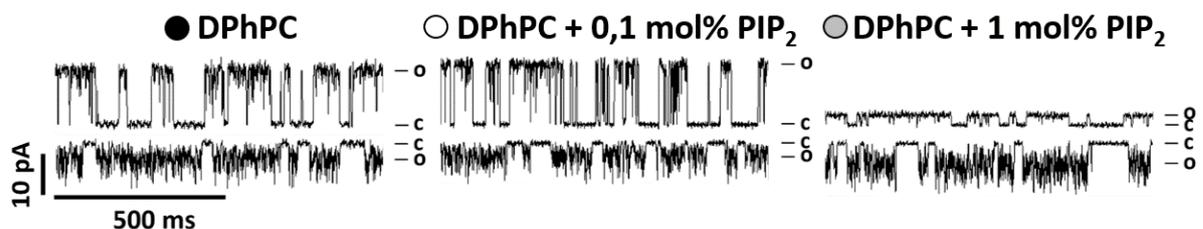


Abbildung 68: Kcv_s ist in Membranen mit geringen PIP₂-Konzentrationen messbar und reagiert auf 1 mol% PIP₂ bei hohen positiven Spannungen mit einer verringerten Offenkanalamplitude. Die charakteristischen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 160 mV mit der PLB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen- und o das Offenniveau des Kanals.

Die Offenwahrscheinlichkeit von Kcv_s bleibt in Membranen, die PIP₂ enthalten weitgehend unbeeinflusst (Abbildung 69 B und D). Die Leitfähigkeit hingegen ist bei 1 mol% PIP₂ durch einen geringeren Offenkanalamplitudenabfall bei niedrigen positiven Spannungen im Vergleich zur Leitfähigkeit in reinen DPhPC Membranen signifikant verringert (Abbildung 69 C). 1 mol% PIP₂ löst zudem einen starken Amplitudenabfall ab +80 mV aus (Abbildung 69 A). Die exakten Zahlenwerte sind der Tabelle 6 am Ende des Kapitels zu entnehmen.

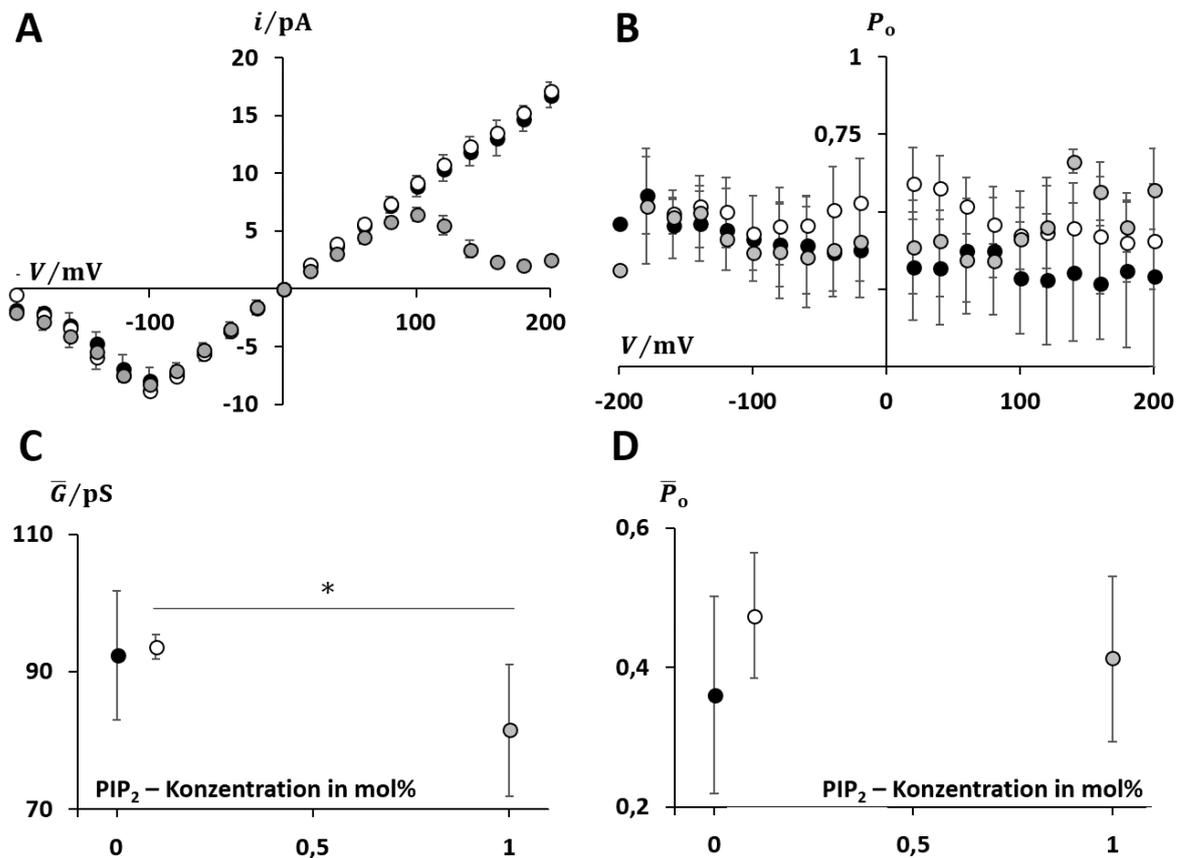


Abbildung 69: PIP₂ führt zu einem Amplitudenabfall bei Spannungen >80 mV, während die Offenwahrscheinlichkeit nicht beeinflusst wird. A i/V Kurven. B Offenwahrscheinlichkeiten. C gemittelte Leitfähigkeiten im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV sowie mittlere Offenwahrscheinlichkeiten (D) von Kcv_s in DPhPC Membranen die 0 mol%, 0,1 mol% und 1 mol% PIP₂ enthalten. Alle Datenpunkte und Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen am Planaren Lipid Bilayer. Die Symbole aus A und B entsprechen denen aus C und D.

Die Ergebnisse aus Abbildung 68 und Abbildung 69 zeigen das multivalente anionische Lipide wie PIP₂ nicht dieselben Auswirkungen auf Kcv_s haben wie monovalente anionische Lipide. Die erhöhte Leitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit durch DPhPS (DPhPG) sind demnach spezifisch für monovalente anionische Lipide.

3.5.3 Die Auswirkungen von DPhPS auf Kcv_S und Kcv_{NH} sind denen von einer Punktmutation am inneren *Gate* beider Kanäle sehr ähnlich

Wie bereits in Kapitel 3.1.1 beschrieben, unterscheiden sich Kcv_{NTS} und Kcv_S funktionell hauptsächlich in ihrer Offenwahrscheinlichkeit, die bei Kcv_{NTS} bei ungefähr 90% liegt und bei Kcv_S nur bei ungefähr 35%. Dieser Unterschied ist hauptsächlich dem dritten längeren Geschlossenzustand von Kcv_S zuzuschreiben, den Kcv_{NTS} nicht besitzt (Kapitel 3.1.1, **Abbildung 21**). Dieser Geschlossenzustand kommt durch eine Serin vermittelte Wasserstoffbrückenbindung (S77) zum Peptidrückgrat bzw. zu dessen Carbonylsauerstoffatomen der α -Helix von TM2 zustande, die einen Knick der inneren Transmembrandomäne (TM2) verursacht. Diese Konformationsänderung führt dazu, dass das Ringsystem des Phenylalanins an Position 78 als hydrophobe Barriere in die Kavität des tetrameren Kanals ragt und somit als inneres *Gate* den Ionenstrom blockieren kann (Rauh et al., 2017).

Aus vorangegangenen Studien (Rauh et al., 2017) geht hervor, dass ein einzelner Aminosäureaustausch an Position 77 von Kcv_S und Kcv_{NTS} zu einer Umwandlung des Phänotyps des einen Kanals in den jeweils anderen führt (**Abbildung 70 A**). Da der Verlust des Serins von Kcv_S an Position 77 zu einer Disruption der Wasserstoffbrücken führt, kann der lange Geschlossenzustand nicht mehr beobachtet werden (Rauh et al., 2017). Das innere *Gate* ist somit beeinträchtigt und Kcv_S S77G besitzt aufgrund des Verlustes des dritten Geschlossenzustandes (**Abbildung 70 B**) genau wie Kcv_{NTS} eine hohe Offenwahrscheinlichkeit von über 90% (**Abbildung 70 A**).

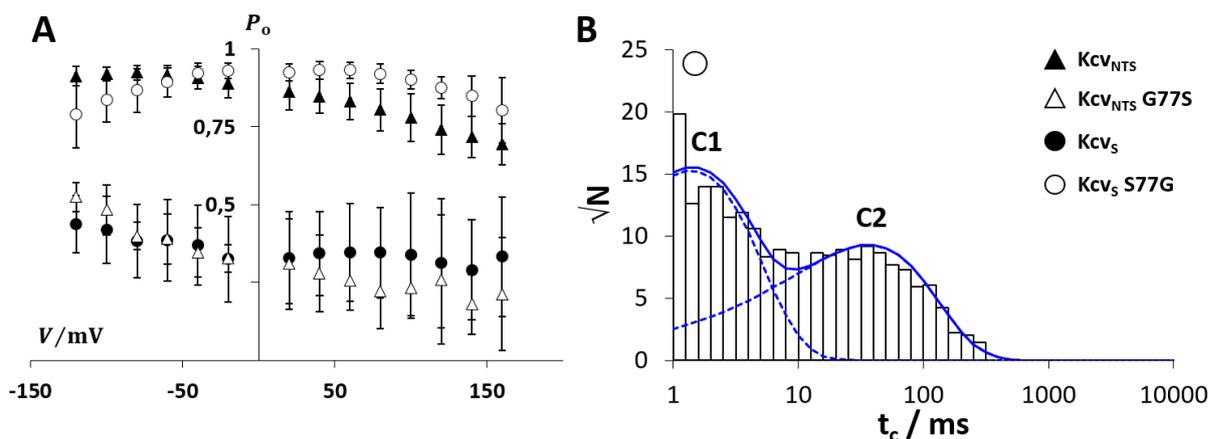


Abbildung 70: Die Mutante Kcv_S S77G verhält sich nahezu identisch zu Kcv_{NTS} und besitzt nur zwei sichtbare Geschlossenzustände. A Offenwahrscheinlichkeiten. **B** exemplarisches Geschlossenzeit - Histogramm der Mutante Kcv_S S77G bei +120 mV. Alle Datenpunkte und Standardabweichungen aus A stammen aus mind. drei unabhängigen Messungen am Planaren Lipid *Bilayer* (bereitgestellt von Oliver Rauh, verändert nach Rauh, 2018).

Da der dritte Geschlossenenzustand von Kcv_S mit der Funktion des inneren *Gates* einhergeht und reine DPhPS Membranen vor allem den dritten Geschlossenenzustand beeinflussen (**Abbildung 64**), liegt die Vermutung nahe, dass es sich ebenfalls um eine Beeinflussung des inneren *Gates* handelt. Gerade der hochaffine Effekt auf die Offenwahrscheinlichkeit zwischen 1 mol% und 5 mol% DPhPS betrifft den dritten Geschlossenenzustand deutlich.

Demnach stellt sich die Frage, ob eventuell die durch die Mutation (S77G) ausgelöste Konformationsänderung des Proteins auch durch die anionische Ladung der Membran ausgelöst werden kann und einem ähnlichen Mechanismus unterliegt.

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden zusätzliche Versuche mit einem weiteren Kcv - Kanal durchgeführt, in dem eine Mutation an Position 77 ebenfalls Auswirkungen auf seine Offenwahrscheinlichkeit und das innere *Gate* hat (Rauh, 2018).

3.5.3.1 DPhPS ruft die gleiche Spannungsabhängigkeit in Kcv_{NH} hervor wie die Mutation des inneren *Gates*

Neben Kcv_{NTS} und Kcv_S ist der Kanal Kcv_{NH} (New Hampshire) ein weiterer Vertreter der Kcv - Kanäle, welcher aus dem Lake Winnepesaukee in New Hampshire isoliert wurde. Er gehört wie auch Kcv_{NTS} und Kcv_S zu den Kcv_{ATCV-1} ähnlichen Kanälen, die von Phycodnaviren kodiert werden und einzellige Chlorellaalgen befallen (Siotto, 2017). In **Abbildung 71** ist zu erkennen, dass sich die Aminosäuresequenzen der drei Kcv - Kanäle bis auf 15 AS gleichen. Ebenso wie Kcv_S besitzt Kcv_{NH} an Position 77 ein Serin statt einem Glycin (rot markiert).

```

KcvNTS MLLLIHLSILVIFTAIYKMLPGGMFSNTDPTWVDCLYFSASTHTTVGYGDLTPKSPVAKLTATAHMLIVFAIVISGFTFPW 82
KcvS   MLLLLIHVGILVFFTTVYKMLPGGMFSNTDPSWVDCLYFSASTHTTVGYGDLTPKSPVAKLVATAHMMIVFAIVVSSFTFPW 82
KcvNH  MLLLIHICILVFFTTIVYKMLPGGMFSYADPSWVDCLYFSASTHTTVGYGDLTPKSAVAKLTATAHMLIVFAIVVSSFTFPW 82
      ****:**: ***. ** :***** :*:***:***** ***** :*****:*****:*.*****

```

Abbildung 71: Das Alignment von Kcv_{NTS}, Kcv_S und Kcv_{NH} zeigt die sequenzielle Ähnlichkeit der ATCV - ähnlichen Kanäle. Die rote Markierung hebt die Aminosäuren 77 hervor. Kcv_{NH} besitzt wie Kcv_S an Position 77 ein Serin statt eines Glycins. Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW2Ω hergestellt.

Das *Gating* - Verhalten von Kcv_{NH} ähnelt stark dem von Kcv_S weist jedoch zusätzlich sehr lange Inaktivitätsphasen auf (**Abbildung 72 B**), die durch ein zusätzliches *Gate* am äußeren Poreneingang verursacht werden, das Kcv_{NTS} und Kcv_S nicht besitzen. Die aktiven Phasen zwischen den inaktiven Phasen werden im weiteren Verlauf als *Bursts* bezeichnet. Ihr *Gating* wird im Wesentlichen durch das innere *Gate* bestimmt. Es lässt sich ebenso wie das *Gating* von Kcv_S mit drei Geschlossenenzuständen und einem Offenzustand beschreiben (**Abbildung 72 C**).

Die leichte Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit in **Abbildung 74 B** wird hauptsächlich durch das spannungsabhängige Auftreten der inaktiven Phasen bedingt.

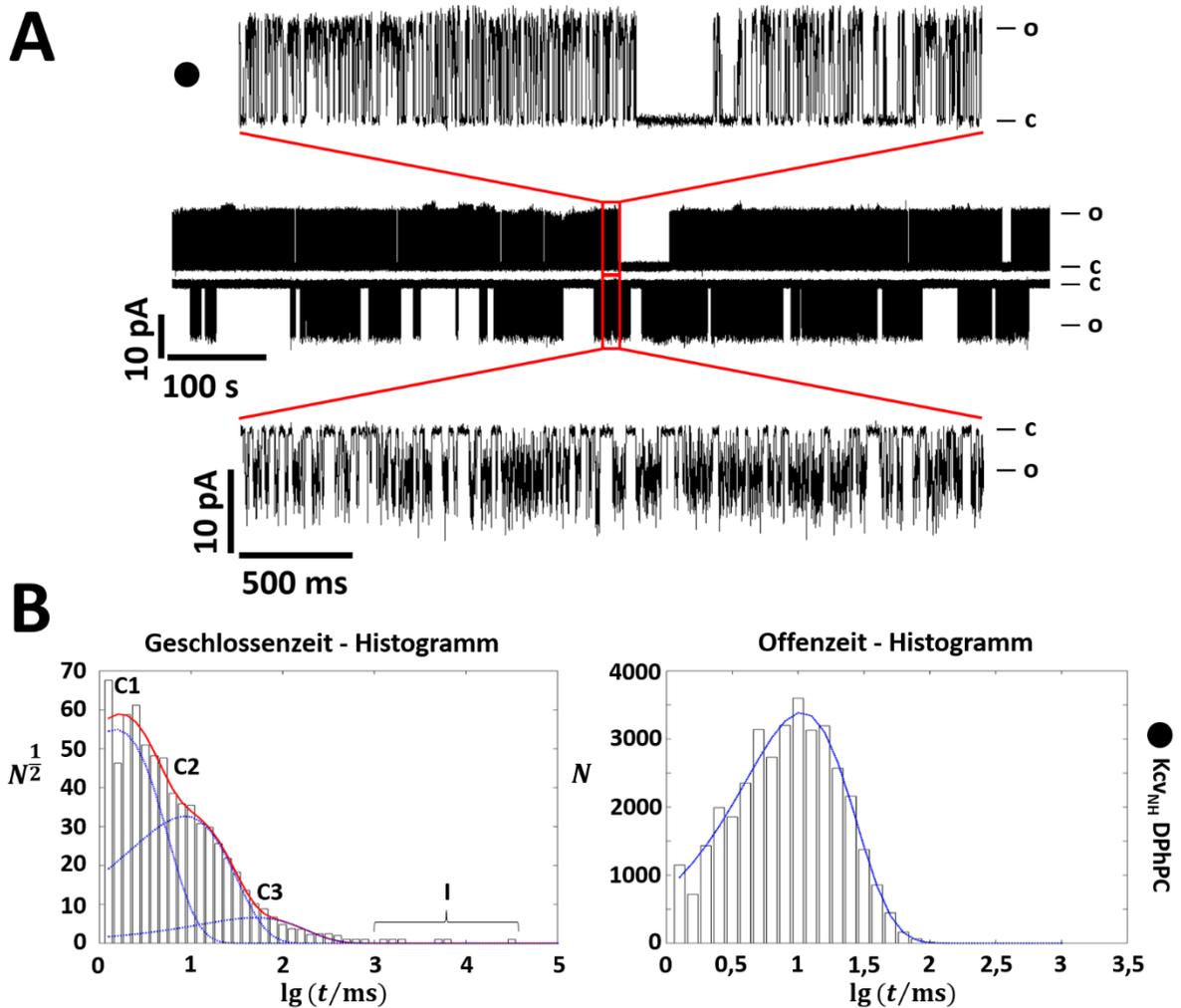


Abbildung 72: Kcv_{NH} besitzt in Membranen aus DPhPC innerhalb seiner *Gating - Bursts* genau wie Kcv_S drei Geschlossenzustände und weist zudem einen weiteren vierten inaktiven Zustand auf. **A** repräsentative Stromspuren von Kcv_{NH} bei ± 120 mV mit Vergrößerung der Aktivitäts - *Bursts*. **B** exemplarisches Geschlossenzeit - und Offenzeithistogramm bei +120 mV, zeigt drei gefittete Geschlossenzustände (C1, C2, C3) sowie einen Offenzustand (rechts). Im Geschlossenzeit - Histogramm ist anhand der seltenen langen Ereignisse zu erkennen, dass ein weiterer vierter Zustand (inaktiver Zustand; I) existiert, der sich aber aufgrund seiner Seltenheit nicht näher beschreiben lässt. Die repräsentativen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 120 mV mit der PLB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen-, o das Offenniveau des Kanals.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Mutation von KcV_{NH} an Position 77 (S77G) in Richtung KcV_{N_TS} eine deutlichere Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit induziert. Diese ist auf das Auftreten der inaktiven Phasen zurückzuführen. Das dazugehörige spannungsabhängige *Gate* ist am extrazellulären Poreneingang lokalisiert. Durch das Offenhalten des inneren *Gates* durch die Mutation tritt nun der Effekt des äußeren *Gates* stärker hervor (**Abbildung 74**) (Rauh, 2018). Die Mutante KcV_{NH} S77G weist zudem eine signifikant erhöhte Leitfähigkeit auf (**Abbildung 74 A und C**).

Die vergrößerten Ausschnitte in **Abbildung 73 A** (links) zeigen zusätzlich, dass das Schaltverhalten von KcV_{NH} innerhalb der *Bursts* nicht mehr dem von KcV_S sondern eher dem *Gating* von KcV_{N_TS} gleicht und daher innerhalb der *Bursts* eine hohe Offenwahrscheinlichkeit besitzt. Dies ist auch anhand der *Dwelltime* - Histogramme von KcV_{NH} S77G in **Abbildung 73 B** zu erkennen, da der dritte Geschlossenzustand von KcV_{NH} S77G wie auch schon bei KcV_S S77G aufgrund des Funktionsverlusts des inneren *Gates* nicht mehr zu erkennen ist.

Die S77G Mutation im KcV_S Kanal führt dazu, dass die Mutante sich in Bezug auf die Offenwahrscheinlichkeit nahezu identisch zu KcV_{N_TS} verhält (**Abbildung 70**). Die gleiche Mutation in KcV_{NH} induziert, wie gerade beschrieben und wie in **Abbildung 72** und **Abbildung 73 A** erkennbar, innerhalb der *Bursts* die gleiche Veränderung der *Gating* - Eigenschaften in Richtung KcV_{N_TS}.

Der mutierte KcV_{NH} Kanal eignet sich daher sehr gut, um zu prüfen ob negativ geladene Lipide das gleiche *Gate* wie im KcV_S Kanal beeinflussen.

Anhand **Abbildung 73 A** (rechts) ist anhand der vergrößerten Ausschnitte der Aktivitäts - *Bursts* zu erkennen, dass sich das *Gating* - Verhalten von KcV_{NH} in einer anionischen Membran tatsächlich verändert hat und somit seiner S77G Mutante sehr ähnlich sieht (**Abbildung 73 A rechts**).

Zur Verdeutlichung dieser Veränderung des *Gatings* können die exemplarischen *Dwelltime* - Histogramme von KcV_{NH} in DPhPC, KcV_{NH} S77G in DPhPC und KcV_{NH} in DPhPS verglichen werden (**Abbildung 72 C und Abbildung 73 C und D**).

Ebenso wie schon bei KcV_S führt DPhPS im Gegensatz zur KcV_{NH} S77G Mutation nicht zu einem Verlust des dritten Geschlossen (**Abbildung 73 C und D links**). Das anionische Lipid vermindert jedoch die Häufigkeit mit der dieser Geschlossenzustand auftritt. Zudem wird auch die Häufigkeit der beiden kürzeren Geschlossenzeiten verringert, was wiederum zu einer Verlängerung der mittleren Offenzeiten führt (**Abbildung 73 D rechts**).

Durch DPhPS wird ebenso wie durch die Mutation S77G eine deutliche Spannungsabhängigkeit induziert (**Abbildung 73**) (Rauh, 2018).

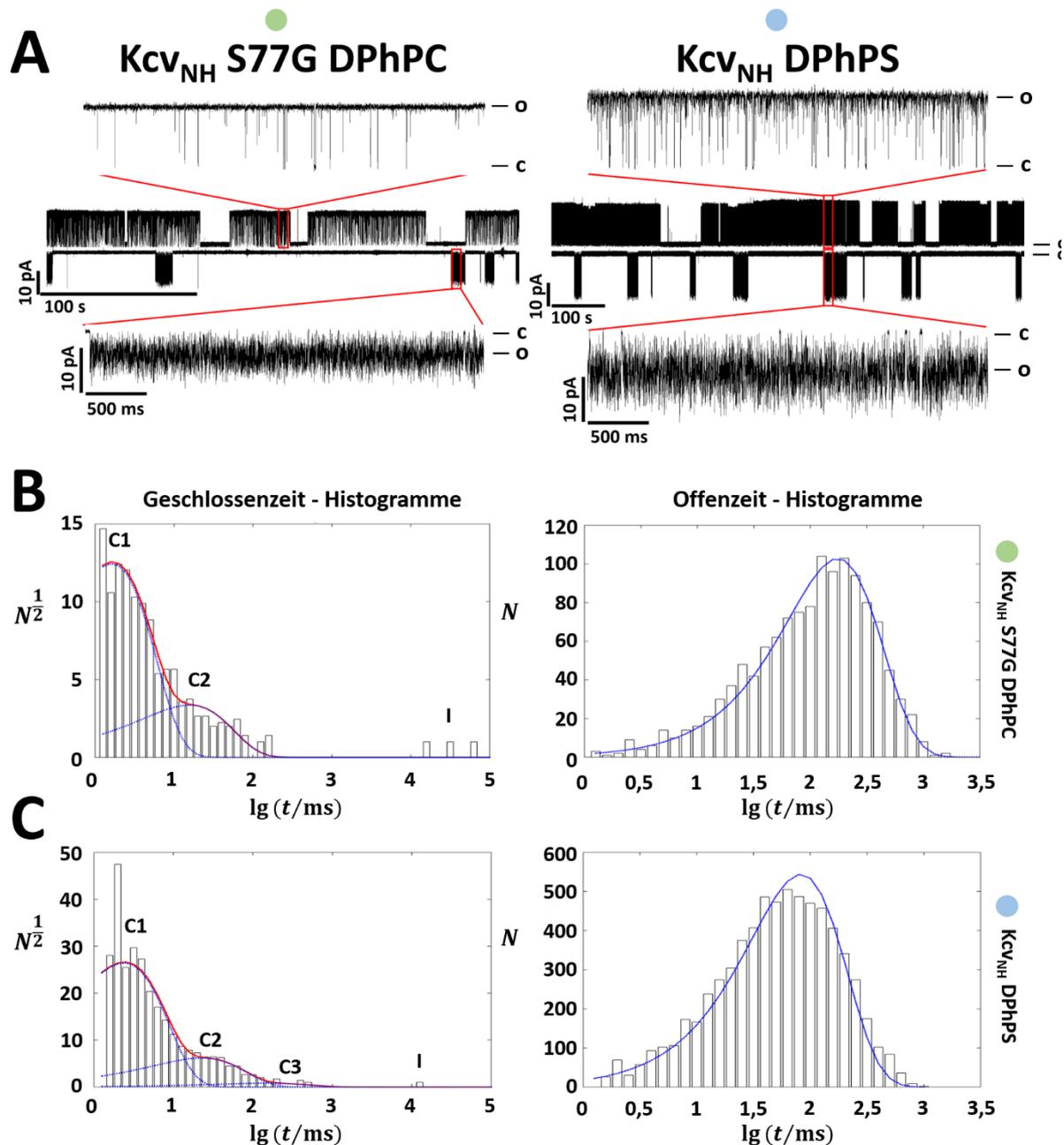


Abbildung 73: Kcv_{NH} S77G zeigt innerhalb der *Gating-Bursts* wie Kcv_{NH} nur zwei Geschlossenzustände, während der Wildtyp Kcv_{NH} in DPhPS zwar noch alle drei Geschlossenzustände besitzt jedoch durch deren seltene Besetzung, das *Gating* ebenfalls dem von Kcv_{NH} und dem von Kcv_{NH} S77G ähnelt. A repräsentative Stromspuren von Kcv_{NH} S77G (links) und Kcv_{NH} in DPhPS (rechts) bei ±120 mV mit Vergrößerung der *Bursts*. B exemplarisches Geschlossenzeit - und Offenzeithistogramm von Kcv_{NH} S77G in DPhPC bei +140 mV, zeigt zwei gefittete Geschlossenzustände (links) sowie einen Offenzustand (rechts) (Daten bereitgestellt von Oliver Rauh). C exemplarisches Geschlossenzeit - und Offenzeithistogramm von Kcv_{NH} in DPhPS bei +120 mV, zeigt drei gefittete Geschlossenzustände (links) sowie einen Offenzustand (rechts). Die repräsentativen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ±120 mV mit der PLB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen-, o das Offenniveau des Kanals.

Die Ergebnisse der Messungen von $K_{CV_{NH}}$ und $K_{CV_{NH}} S77G$ in DPhPC und $K_{CV_{NH}}$ in DPhPS wurden graphisch in **Abbildung 74** dargestellt. Aus den Daten ist zu entnehmen, dass DPhPS wie schon bei $K_{CV_{NTS}}$ und K_{CV_S} die Leitfähigkeit von $K_{CV_{NH}}$ signifikant erhöht (**Abbildung 74 A und C**). Die spannungsabhängigen Offenwahrscheinlichkeiten von $K_{CV_{NH}} S77G$ in DPhPC und $K_{CV_{NH}}$ in DPhPS sind fast deckungsgleich (**Abbildung 74 B**). Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass die DPhPS Membran eine ähnliche molekulare Änderung im Wildtypkanal $K_{CV_{NH}}$ hervorruft, wie sie durch die Mutation von Serin zu Glycin an Position 77 entsteht. Die Kurven beider Offenwahrscheinlichkeiten wurden mit einer Boltzmannfunktion beschrieben.

$$P_o = \frac{(P_{o_{max}} - P_{o_{min}})}{1 + e^{\frac{zF}{RT}(V_{1/2} - V)}} + P_{o_{min}} \quad (4)$$

Daraus ergibt sich für $K_{CV_{NH}} S77G$ eine halbmaximale Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit bei -37 mV und für den Wildtyp in DPhPS bei -67 mV. ($z_{K_{CV_{NH}S77G}} = 0,8$ und $z_{K_{CV_{NH}}}$ in DPhPS = 0,78).

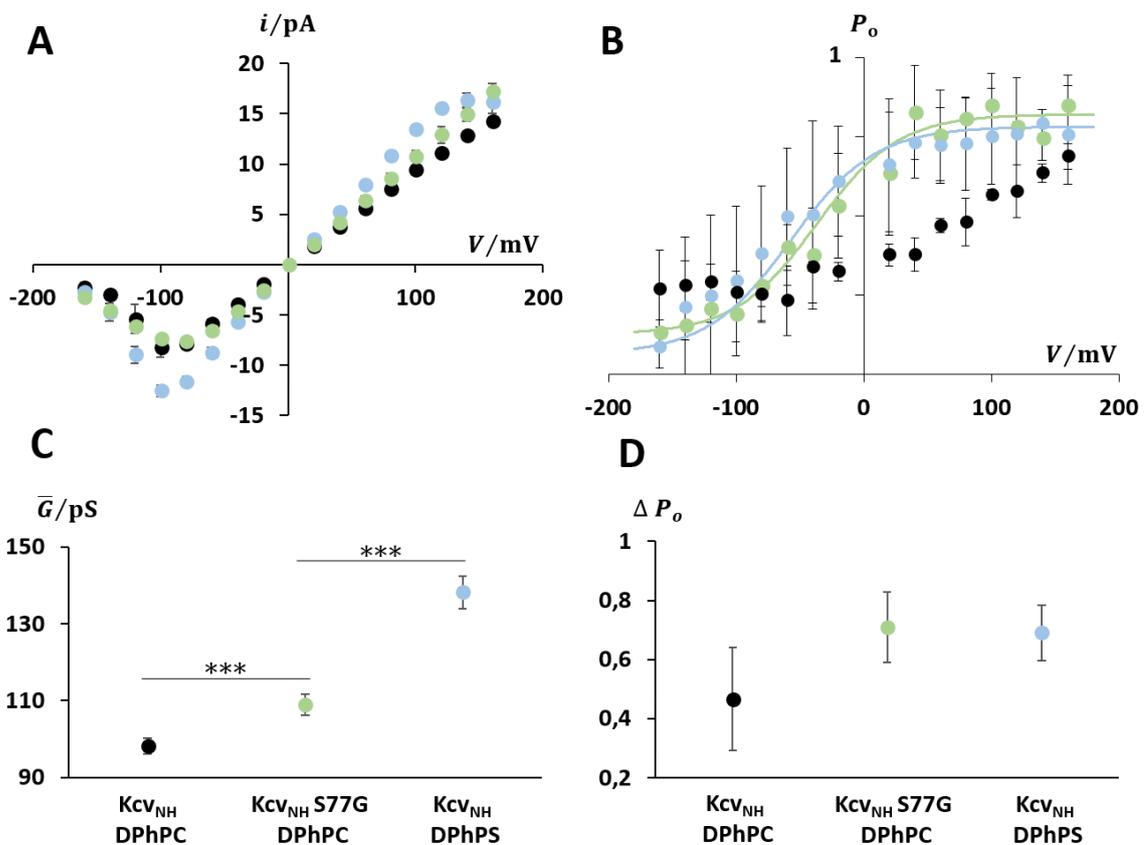


Abbildung 74: DPhPS verursacht die gleiche Spannungsabhängigkeit bei Kcv_{NH} wie dessen S77G Mutation und erhöht DPhPS - typisch die Leitfähigkeit des Kanals. A i/V Kurven. B Offenwahrscheinlichkeiten. C gemittelte Leitfähigkeiten von Kcv_{NH} (schwarz) in DPhPC, Kcv_{NH} S77G (grün) und Kcv_{NH} in DPhPS (blau) im linearen Spannungsbereich von -60 mV bis +60 mV. D gemittelte Offenwahrscheinlichkeiten von Kcv_{NH} in DPhPC, Kcv_{NH} S77G und Kcv_{NH} in DPhPS. Alle Datenpunkte und Standardabweichungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen am Planaren Lipid *Bilayer*. Die Symbole aus A und B entsprechen denen aus C und D (die Daten der Kcv_{NH} S77G Mutante wurden von Oliver Rauh bereitgestellt).

Die Versuche mit Kcv_{NH} bestätigen, dass die anionischen Lipide höchstwahrscheinlich auf das innere *Gate* von Kcv_S und Kcv_{NH} wirken und dabei die Funktion der Aminosäure Glycin im Kcv_{NTS} Kanal übernehmen. Es kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass genau die gleichen molekularen Vorgänge vonstattengehen, da anhand der *Dwelltime* - Analysen von Kcv_S und Kcv_{NH} (innerhalb der *Bursts*) in reinen DPhPS Membranen der dritte Geschlossenzustand weiterhin zu erkennen ist und nicht wie bei Kcv_S S77G verschwindet.

Anionische Lipide haben zwei verschiedene Auswirkungen auf K_{cv} ; einen hochaffinen Effekt bei niedrigen und einen niederaffinen Effekt bei höheren DPhPS - Konzentrationen. Diese Effekte lassen sich anhand der mittleren Leitfähigkeit, sowie der mittleren Offenwahrscheinlichkeit erkennen. Beide Kurven können mit der Summe aus zwei Hill - Funktionen beschrieben werden, dessen Parameter ähnlich sind. Da die Auswirkungen von DPhPS auf die Offenwahrscheinlichkeit von K_{cv} gravierender sind, und sich durch die *Dwelltime* - Analysen besser untersuchen lassen, wird im Folgenden nur anhand der Offenwahrscheinlichkeit diskutiert, welche Ursachen für die beiden Effekte in Frage kommen.

Der hochaffine Effekt von DPhPS auf die Offenwahrscheinlichkeit von K_{cv} ist wahrscheinlich auf eine direkte Protein-Lipid-Interaktion zurückzuführen

Da der hochaffine Effekt von DPhPS auf K_{cv} schon bei niedrigen anionischen Lipidkonzentrationen auftritt (**Abbildung 63 D**), bei denen die physikalischen Eigenschaften der Membran noch nicht gravierend verändert sein sollten, kann eine direkte Protein-Lipid-Interaktion in Betracht gezogen werden. Unter der Annahme, dass die anionischen Lipide aufgrund ihrer Ladung an den Kanal binden, können sie dadurch auf das Wasserstoffbrücken - Netzwerk des Serins an Position 77 wirken und somit die Funktion des inneren *Gates* beeinflussen. Dies wird auch durch die genaueren *Dwelltime* - Analysen von K_{cv} in **Abbildung 64 C** und **D** deutlich, da zwischen 1 mol% und 5 mol% die deutlichsten Auswirkungen auf den dritten Geschlossenzustand und somit das innere *Gate* zu tragen kommen. Um dies weiter zu untersuchen, ist es vonnöten zusätzliche niedrige DPhPS - Konzentrationen zwischen 1 mol% und 5 mol% auf den Kanal zu untersuchen.

Der niederaffine Effekt auf die Offenwahrscheinlichkeit von K_{cv} kann durch eine Vielzahl von physikalischen Membraneigenschaften hervorgerufen werden

Monovalent anionische Lipide haben diverse Auswirkungen auf die physikalischen Eigenschaften einer Membran. Wie in Kapitel 1.1.2.1 der Einleitung beschrieben, bilden sie elektrische Felder nahe der Membranoberfläche, verschieben das laterale Druckprofil einer Membran und erhöhen die Membrandicke konzentrationsabhängig.

Des Weiteren kann aufgrund der begrenzten *Bilayer* - Fläche der Messmethoden und der Abstoßungskräfte der anionischen Lipide kann davon ausgegangen werden, dass sich die Netto - Ladung der Membran ab einer bestimmten Konzentration nicht weiter erhöht, sondern in Sättigung übergeht. Daher sollten alle physikalischen Effekte wie auch die Abstoßung der

Leaflets und somit die Verdickung der Membran in Sättigung über (Vgl. Sättigung der Leitfähigkeitserhöhung) und haben daher nur geringfügige niederaffine Auswirkungen auf K_{cv} s (**Abbildung 63 D**).

Da sich die physikalischen Änderungen der Membran mit elektrophysiologischen Methoden nicht gut untersuchen lassen, wurde im nächsten Kapitel ein größeres Augenmerk auf den ersten affinen Effekt gelegt und dessen Angriffsstelle unter Verwendung asymmetrischer CBB Membranen aus DPhPC und DPhPS näher eingegrenzt.

Tabelle 6: Gemittelte Leitfähigkeiten von $K_{cv_{NTS}}$, K_{cv_S} , $K_{cv_{NH}}$ und $K_{mpv_{12T}}$ in verschiedenen anionischen Membranen; mittlere Offenwahrscheinlichkeiten von $K_{cv_{NTS}}$ und K_{cv_S} sowie die Offenwahrscheinlichkeitsdifferenz zwischen -160 mV und +160 mV von $K_{cv_{NH}}$ und $K_{mpv_{12T}}$ in verschiedenen anionischen Membranen. Alle Daten stammen aus mind. drei unabhängigen Messungen der PLB Methode. Die Markierungen der Membranzusammensetzungen entsprechen den Symbolen der Graphen in den zugehörigen Abbildungen.

$K_{cv_{Next\ to\ Smith}}$		
Membranzusammensetzung (PLB)	\bar{G}/pS	\bar{P}_o
● DPhPC (n = 6)	81,7 ± 12,3	0,92 ± 0,02
○ 1 mol% DPhPS (n = 8)	81,7 ± 4,1	0,9 ± 0,02
○ 50 mol% DPhPS (n = 7)	101,8 ± 2,9	0,93 ± 0,01
●▼ DPhPS (n = 7)	107,4 ± 4,9	0,95 ± 0,01
▽ DPhPG (n = 7)	101,6 ± 0,01	0,95 ± 0,01
$K_{cv_{Smith}}$		
Membranzusammensetzung (PLB)	\bar{G}/pS	\bar{P}_o
● DPhPC (n = 10)	92,4 ± 9,4	0,36 ± 0,14
● 1 mol% DPhPS (n = 6)	89,4 ± 6,7	0,37 ± 0,11
● 5 mol% DPhPS (n = 4)	100,6 ± 5,3	0,71 ± 0,03
● 25 mol% DPhPS (n = 7)	112,6 ± 8,3	0,72 ± 0,01
● 50 mol% DPhPS (n = 7)	109,6 ± 5,9	0,75 ± 0,09
● 75 mol% DPhPS (n = 5)	125,7 ± 8,2	0,84 ± 0,08
●▼ DPhPS (n = 9)	123,5 ± 4,5	0,89 ± 0,02
▽ DPhPG (n = 5)	121,7 ± 9,3	0,88 ± 0,02
○ 0,1 mol% PIP ₂ (n = 7)	93,6 ± 1,7	0,47 ± 0,01
○ 1 mol% PIP ₂ (n = 3)	81,4 ± 9,5	0,41 ± 0,11
$K_{mpv_{12T}}$		
Membranzusammensetzung (PLB)	\bar{G}/pS	$\Delta P_o (-160 - (+160))$
● DPhPC (n = 10)	36,6 ± 5	0,18 ± 0,13
○ 1 mol% DPhPS (n = 5)	38,8 ± 2	0,08 ± 0,04
○ 50 mol% DPhPS (n = 7)	51,5 ± 3	0,25 ± 0,17
●▼ DPhPS (n = 4)	61,8 ± 4	0,12 ± 0,05
▽ DPhPG (n = 9)	59 ± 3,2	0,1 ± 0,07
$K_{cv_{NH}}$		
Membranzusammensetzung (PLB)	\bar{G}/pS	$\Delta P_o (-160 - (+160))$
● DPhPC (n = 3)	98,3 ± 2,1	0,47 ± 0,17
● DPhPS (n = 3)	138,2 ± 4,2	0,69 ± 0,1
● $K_{cv_{NH}}$ S77G DPhPC (n = 3)	108,9 ± 2,8	0,71 ± 0,12

3.5.4 Lokalisationsuntersuchungen eines potenziellen Wirkungsbereichs von DPhPS auf Kcv - Kanäle

Bisher wurde gezeigt, dass der Effekt von DPhPS auf die untersuchten Kanäle Kcv_{NTS} , Kcv_S und Kmp_{V12T} nicht spezifisch für die Serinkopfgruppe ist. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Auswirkungen von DPhPS höchstwahrscheinlich durch die Ladung der Kopfgruppe hervorgerufen werden. Die Daten von Kcv_S zeigen ferner, dass DPhPS einen hoch- und einen niederaffinen Effekt auf die Offenwahrscheinlichkeit auslöst. Durch *Dwelltime* - Analysen und zusätzliche Versuche mit Kcv_{NH} konnte gezeigt werden, dass DPhPS bei Kcv_S und Kcv_{NH} höchstwahrscheinlich das innere *Gate* beeinflusst. Da diese starke Beeinflussung schon bei geringen DPhPS - Konzentrationen (hochaffiner Effekt) eintritt, ist eine direkte Protein-Lipid-Interaktion die wahrscheinlichste Ursache. Um diesen Gedankengang weiterzuführen, wurde mithilfe asymmetrischer CBB Membranen untersucht, ob der Kanal seitenspezifisch (extrazellulär oder intrazellulär) auf DPhPS reagiert. Damit sollte es möglich sein den Wirkungsbereich von DPhPS einzugrenzen und eine eventuelle Bindestelle zu lokalisieren.

Für diesen Versuchsaufbau wurden Liposomen aus reinem DPhPC und reinem DPhPS in 100 mM KCl Lösung, sowie Kcv_S in Nanodisks verwendet. Das Lipid DPhPC befand sich in dem linken *Bubble*, das mit der Erdelektrode verbunden ist, in konventionellen *Bilayer* - Messungen entspricht das dem *trans* - Kompartiment (extrazellulär). Die Membranseite mit DPhPS ist dementsprechend zum *cis* - Kompartiment (intrazellulär) ausgerichtet. Das Kanalprotein befand sich in beiden *Bubbles*, um die Chance zu erhöhen, dass sich ein Kanal in die Membran einbaut.

Beim Kontakt der *Bubbles* entsteht demnach ein asymmetrischer *Bilayer* aus DPhPC und DPhPS. Prinzipiell können sich die Kanäle bei diesem experimentellen Ansatz in beide Richtungen einbauen. Als Referenz für die Orientierung wird dabei die Konfiguration angesehen, bei der die Seite, die bei einer Expression in Zellen dem Außenmedium zugewandt ist zur *trans* - Seite (in den Abbildungen rot und blau gekennzeichnet) hin orientiert ist. Diese Orientierung lässt sich leicht daran erkennen, dass das schnelle *Gating* des Kanals mit der resultierenden negativen Kennlinie in der i/V - Kurve bei negativen Spannungen auftritt (**Abbildung 75**).

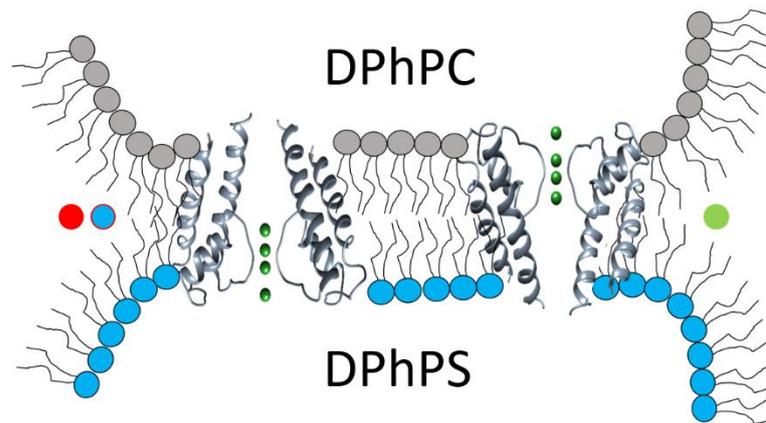


Abbildung 75: Schematische Darstellung einer asymmetrischen CBB Membran mit unterschiedlicher Orientierung der eingebauten Ionenkanäle. Die farblichen Markierungen rechts und links kennzeichnen im weiteren Verlauf die Orientierung des Proteins.

Zur Kontrolle wurden zunächst symmetrische CBB Membranen aus reinem DPhPC und reinem DPhPS gebildet und Kcv_s in diesen symmetrischen *Bilayern* untersucht. In **Abbildung 76** und **Abbildung 77 A** (schwarze (DPhPC) und weiße Symbole (DPhPS)) ist erkennbar, dass die typische Offenwahrscheinlichkeitserhöhung des Kcv_s auch in Membranen die mit der *Contact Bubble Bilayer* Methode gebildet werden auftritt; die Nutzung der Methode für asymmetrische Messungen ist daher gerechtfertigt.

Abbildung 76 zeigt exemplarische Stromspuren von Kcv_s der sich anhand dieses Kriteriums in unterschiedlichen Richtungen in den asymmetrischen *Bilayer* eingebaut hat (rechts intrazelluläres DPhPS; links extrazelluläres DPhPS). Zur Identifizierung der Einbaurichtung des Kanals ist die Orientierung farblich in **Abbildung 75** und **Abbildung 76** gekennzeichnet. Die grün markierten Messspuren stammen demnach von Kanälen die DPhPS auf ihrer intrazellulären Seite am C - und N - Terminus haben; die rot und blau markierten Kanäle sind andersherum in den *Bilayer* eingebaut, sodass sich das DPhPS auf der extrazellulären Seite der Proteine befindet (**Abbildung 75**).

Es fällt auf, dass nur die Kanäle deren intrazelluläre Seite DPhPS ausgesetzt ist, keine langen Geschlossenzeiten mehr zeigen. Damit ähneln sie in ihrem Schaltverhalten den Kcv_s Kanälen, die in reinen DPhPS Membranen gemessen wurden (**Abbildung 76** rechts). Die Kanalproteine, die sich in der entgegengesetzten Orientierung in den *Bilayer* eingebaut haben, weisen deutlich längere Geschlossenphasen als in Kontrollmessungen aus DPhPS auf (**Abbildung 76** links).

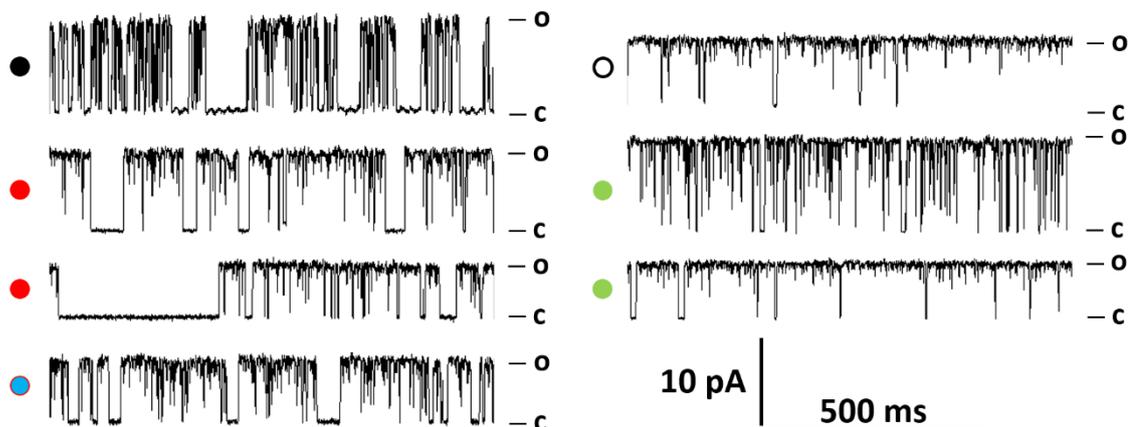


Abbildung 76: Schwarz (DPhPC) und Weiß (DPhPS) zeigen lipidtypisch geringe und hohe Offenwahrscheinlichkeiten für Kcv_5 in reinen CBB Membranen, während asymmetrische CBB Membranen aus DPhPC und DPhPS (Rot, Blau und Grün) verschiedene Auswirkungen auf dessen *Gating*-Verhalten haben. Die repräsentativen Einzelkanalströme wurden bei einer angelegten Haltespannung von ± 120 mV mit der CBB Methode aufgenommen. Die Stromantworten wurden digital mit 500 Hz gefiltert. c beschreibt das Geschlossen-, o das Offenniveau des Kanals.

Abbildung 77 zeigt die mittleren Offenwahrscheinlichkeiten aus Messungen von Kcv_5 in reinen Membranen aus DPhPC (schwarze Symbole) oder DPhPS (weiße Symbole) mit der CBB Methode. Es ist erkennbar, dass auch mit dieser Methode die Offenwahrscheinlichkeit von Kcv_5 durch DPhPS hochsignifikant über der in DPhPC liegt (**Abbildung 77 C**). Wird Kcv_5 in asymmetrischen Membranen aus DPhPC und DPhPS untersucht, zeigen alle Kanäle die DPhPS auf der intrazellulären Seite besitzen (grüne Symbole) eine hohe Offenwahrscheinlichkeit, die der von Messungen in reinen DPhPS Membranen entspricht (weiße Symbole) (**Abbildung 77**).

Die Kanäle, bei denen DPhPS auf der extrazellulären Seite vorliegt, zeigen in zwei von drei Fällen eine geringere Offenwahrscheinlichkeit (rote Symbole). Nur in einem Fall wurden auch in dieser Konfiguration eine hohe Offenwahrscheinlichkeit (blaue Symbole) beobachtet. Die exakten Zahlenwerte sind der **Tabelle 7** am Ende des Kapitels zu entnehmen.

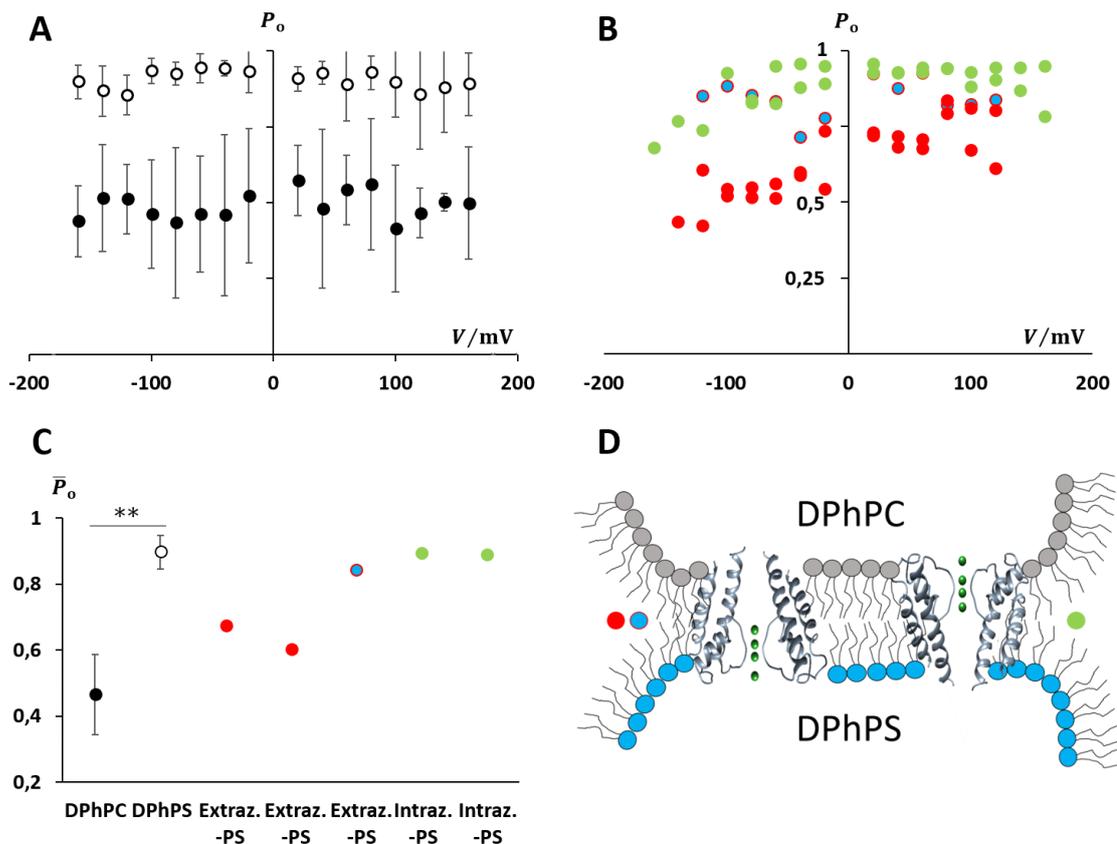


Abbildung 77: DPhPS erhöht in CBB Membranen ebenso wie in PLB Membranen die Offenwahrscheinlichkeit von Kcv_S , während asymmetrische Membranen orientierungsabhängig die Offenwahrscheinlichkeit von Kcv_S verändern. A Offenwahrscheinlichkeiten der symmetrischen DPhPC (Schwarz) und DPhPS (Weiß) Messungen. B Offenwahrscheinlichkeiten der asymmetrischen DPhPC / DPhPS Messungen verschiedener Kanalorientierungen C gemittelte Offenwahrscheinlichkeiten von Kcv_S in reinen DPhPC und DPhPS sowie asymmetrischen Membranen aus beiden Lipiden. D schematische Darstellung der asymmetrischen CBB Membran mit verschiedenen orientierten Kanalproteinen. Alle Datenpunkte und Standardabweichungen der symmetrischen Messungen entstammen aus mind. drei unabhängigen Messungen der CBB Methode, während die mittleren Offenwahrscheinlichkeiten der asymmetrischen Messungen einzeln aufgetragen sind. Die Symbole aus A und B entsprechen denen aus C.

Die heterogenen Ergebnisse geben keine eindeutige Antwort auf die Frage, ob anionische Lipide nur auf einer Seite der Membran das Kanalprotein beeinflussen, oder auf beiden Seiten aktiv sind. Dennoch sprechen die Daten dafür, dass die Kanalfunktionen durch anionische Lipide auf der cytosolischen Seite moduliert werden. Dies wird dadurch gezeigt, dass in allen Fällen, in denen das anionische Lipid auf der cytosolischen Seite vorhanden war, die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals hoch war.

Die Tatsache, dass in einer Messung die Offenwahrscheinlichkeit auch hoch war obwohl das anionische Lipid auf der extrazellulären Seite vorhanden war, lässt sich möglicherweise

dadurch erklären, dass schon eine geringe Konzentration an anionischen Lipiden ausreicht, um die Offenwahrscheinlichkeit zu erhöhen. Es wäre möglich, dass in der kritischen Messung die Separation der beiden *Leaflets* nicht perfekt war und bei der Membranausbildung eine ungewollte Kontamination der DPhPC Membran durch anionisches Lipid stattgefunden hat. Wegen der geringen Konzentration an anionischen Lipiden, die für die Offenwahrscheinlichkeitserhöhung notwendig ist (5 mol%), könnte die geringfügige Kontamination ausreichen, um den Effekt zu bewirken.

Tabelle 7: Mittlere Offenwahrscheinlichkeiten von K_{cvS} in reinen DPhPC und DPhPS CBB Membranen sowie deren asymmetrische Messungen. Die Markierungen der Membranzusammensetzungen entsprechen den Symbolen der Graphen in den zugehörigen Abbildungen.

$K_{cvS_{Smith}}$	
Membranzusammensetzung (CBB)	\bar{P}_o / P_o
● DPhPC (n = 3)	$0,47 \pm 0,12$
○ DPhPS (n = 3)	$0,9 \pm 0,05$
● DPhPS extrazellulär (n = 2)	$0,67 / 0,6$
● DPhPS extrazellulär (n = 1)	$0,84$
● DPhPS intrazellulär (n = 2)	$0,89 / 0,89$

3.5.5 Zusammenfassung

In Kapitel 3.5 wurden die Auswirkungen von anionischen Lipiden auf die viralen Kaliumkanäle KcV_{N_TS}, KcV_S, KcV_{N_H} und KmpV_{12T} untersucht. Es wurde festgestellt, dass monovalente anionische Lipide (DPhPS und DPhPG) und multivalente anionische Lipide (PIP₂) unterschiedliche Auswirkungen auf die Kanalfunktion der untersuchten Kanäle haben. Nähere Untersuchungen der Einflüsse von monovalenten anionischen Lipiden zeigen, dass die Ladung und nicht die Kopfgruppe die Effekte bedingt.

Eine Phospholipidladung kann auf zwei verschiedene Weisen auf Membranproteine wirken; direkt über eine Bindung zwischen Protein und Lipid, oder indirekt über die Änderung der physikalischen Eigenschaften der Membran. Die zusammengefassten Ergebnisse dieses Kapitels zeigen, dass wahrscheinlich beide Interaktionsarten Auswirkungen auf die Kanalfunktion der untersuchten Kanäle haben. Bei niedrigen anionischen Lipidkonzentrationen kommt es bereits zu einer direkten hochaffinen Protein-Lipid-Interaktion, die wahrscheinlich von intrazellulärer Membranseite aus wirkt und das innere *Gate*, sofern vorhanden, beeinflusst (KcV_S und KcV_{N_H}). Bei höheren anionischen Konzentrationen kommt es zu physikalischen Änderungen der Membraneigenschaften die sich schwächer, aber dennoch sichtbar auf die Kanalfunktion aller Kanäle auswirken.

Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass schon geringe Konzentrationsveränderungen innerhalb der Lipidzusammensetzung gravierende Auswirkung auf Ionenkanäle haben. Setzt man dies in einen größeren Kontext, kann dadurch die Gesamtleitfähigkeit / Funktion einer Zellmembran verändert werden. Dies führt zu veränderten Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb einer Zelle, wodurch weitere Proteine und zelluläre Vorgänge beeinflusst oder gestört werden.

Die hier erbrachten Ergebnisse zeigen weiterhin, dass eine Veränderung der Membranzusammensetzung nahezu die gleichen Folgen haben kann wie die Punktmutation eines Proteins. Betrachtet man diesen Aspekt von der anderen Seite, kann eventuell auch die Auswirkung einer Punktmutation durch eine gezielt veränderte Membranzusammensetzung rückgängig gemacht werden und das Gleichgewicht einer Zelle / einer Zellmembran dadurch wiederhergestellt werden.

4 Fazit

Um die Auswirkungen von Membranen auf die Funktion von Ionenkanälen zu untersuchen wurden in dieser Arbeit die Kcv - Kanäle, Kcv_{NTS} und Kcv_S und Kmp_{V12T} in diversen artifiziellen Membranen der PLB und CBB Methode untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die *in vitro* Expressionsmethode mit Nanodisks hervorragend eignet, um die Kanäle korrekt zu exprimieren und sie anschließend auf Protein-Lipid-Interaktionen zu untersuchen.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die hier untersuchten Kaliumkanäle sehr robust gegenüber diversen chemisch - physikalischen Eigenschaften von Membranen sind. Die einzige Ausnahme bildet Kcv_S, dessen Offenwahrscheinlichkeit durch monovalent anionische Lipide von 35% auf 90% erhöht wird. Es konnte festgestellt werden, dass dies durch eine Konformationsänderung des Proteins zustande kommt, die die Funktion des inneren *Gates* beeinträchtigt und somit nahezu mit der Konformationsänderung einer Mutation an Position 77 (S77G) gleichzusetzen ist. In einem größeren Kontext bedeutet dies, dass die Auswirkungen von Punktmutationen durch eine bestimmte Membranzusammensetzung aufgehoben werden können.

Ebenso konnte in Zusammenarbeit mit der Universität Mailand gezeigt werden, dass Kcv_{NTS} in der Lage ist eine Phasentrennung von cholesterolhaltigen Membranen zu induzieren und sich somit seine favorisierte Membrenumgebung von 20 mol% selbst zu schaffen.

Literaturverzeichnis

- Abenavoli, A., DiFrancesco, M. L., Schroeder, I., Epimashko, S., Gazzarrini, S., Hansen, U. P., . . . Moroni, A. (2009). Fast and slow gating are inherent properties of the pore module of the K⁺ channel Kcv. *J Gen Physiol*, *134*(3), 219-229. doi:10.1085/jgp.200910266
- Adam G., Läuger P., Stark G. (2009) *Physikalische Chemie und Biophysik*, 5. überarbeitete Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg, S.360f.
- Armstrong, C. M., & Taylor, S. R. (1980). Interaction of barium ions with potassium channels in squid giant axons. *Biophys J*, *30*(3), 473-488. doi:10.1016/s0006-3495(80)85108-3
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, *22*(2), 195-201. doi:10.1093/bioinformatics/bti770
- Ashcroft, F. M (2000) Ion Channels and Disease. *Academic Press*.
- Ashcroft, F. M. (2006). From molecule to malady. *Nature*, *440*(7083), 440-447. doi:10.1038/nature04707
- Ashrafuzzaman, M., Tseng, C. Y., Kapy, J., Mercer, J. R., & Tuszynski, J. A. (2013). A computationally designed DNA aptamer template with specific binding to phosphatidylserine. *Nucleic Acid Ther*, *23*(6), 418-426. doi:10.1089/nat.2013.0415
- Balss, J., Papatheodorou, P., Mehmel, M., Baumeister, D., Hertel, B., Delaroque, N., . . . Thiel, G. (2008). Transmembrane domain length of viral K⁺ channels is a signal for mitochondria targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(34), 12313-12318. doi:10.1073/pnas.0805709105
- Barrantes, F. J. (2004). Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function. *Brain Res Brain Res Rev*, *47*(1-3), 71-95. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.06.008
- Bayburt, T. H., Carlson, J. W., & Sligar, S. G. (1998). Reconstitution and imaging of a membrane protein in a nanometer-size phospholipid bilayer. *J Struct Biol*, *123*(1), 37-44. doi:10.1006/jsbi.1998.4007
- Bayley, H., Cronin, B., Heron, A., Holden, M. A., Hwang, W. L., Syeda, R., . . . Wallace, M. (2008). Droplet interface bilayers. *Mol Biosyst*, *4*(12), 1191-1208. doi:10.1039/b808893d
- Bernsdorff, C., & Winter, R. (2003). Differential Properties of the Sterols Cholesterol, Ergosterol, β Sitosterol, trans-7-Dehydrocholesterol, Stigmasterol and Lanosterol on DPPC Bilayer Order. *The Journal of Physical Chemistry B*, *107*(38), 10658-10664. doi:10.1021/jp034922a
- Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, *361*(6410), 315-325. doi:10.1038/361315a0
- Binda, A., Rivolta, I., Villa, C., Chisci, E., Beghi, M., Cornaggia, C. M., . . . Combi, R. (2018). A Novel KCNJ2 Mutation Identified in an Autistic Proband Affects the Single Channel Properties of Kir2.1. *Front Cell Neurosci*, *12*, 76. doi:10.3389/fncel.2018.00076
- Braun, C. J., Baer, T., Moroni, A., & Thiel, G. (2014). Pseudo painting/air bubble technique for planar lipid bilayers. *J Neurosci Methods*, *233*, 13-17. doi:10.1016/j.jneumeth.2014.05.031
- Braun, C. J., Lachnit, C., Becker, P., Henkes, L. M., Arrigoni, C., Kast, S. M., . . . Schroeder, I. (2014). Viral potassium channels as a robust model system for studies of membrane-protein interaction. *Biochim Biophys Acta*, *1838*(4), 1096-1103. doi:10.1016/j.bbame.2013.06.010
- Brockman, H. L., Applegate, K. R., Momsen, M. M., King, W. C., & Glomset, J. A. (2003). Packing and electrostatic behavior of sn-2-docosahexaenoyl and -arachidonoyl phosphoglycerides. *Biophys J*, *85*(4), 2384-2396. doi:10.1016/s0006-3495(03)74662-1
- Brown, D. A., & London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *14*, 111-136. doi:10.1146/annurev.cellbio.14.1.111
- Brown, D. A., & London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, *275*(23), 17221-17224. doi:10.1074/jbc.R000005200

- Bukiya, A. N., Durdagi, S., Noskov, S., & Rosenhouse-Dantsker, A. (2017). Cholesterol up-regulates neuronal G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channel activity in the hippocampus. *J Biol Chem*, 292(15), 6135-6147. doi:10.1074/jbc.M116.753350
- Bukiya, A. N., Osborn, C. V., Kuntamallappanavar, G., Toth, P. T., Baki, L., Kowalsky, G., . . . Rosenhouse-Dantsker, A. (2015). Cholesterol increases the open probability of cardiac KACH currents. *Biochim Biophys Acta*, 1848(10 Pt A), 2406-2413. doi:10.1016/j.bbamem.2015.07.007
- Cantor, R. S. (1997). The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia. *Biochemistry*, 36(9), 2339-2344. doi:10.1021/bi9627323
- Chen, F.-Y., Lee, M.-T., & Huang, H. W. (2002). Sigmoidal Concentration Dependence of Antimicrobial Peptide Activities: A Case Study on Alamethicin. *Biophys J*, 82(2), 908-914. doi:https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75452-0
- Chen, F., & Suttle, C. A. (1996). Evolutionary relationships among large double-stranded DNA viruses that infect microalgae and other organisms as inferred from DNA polymerase genes. *Virology*, 219(1), 170-178. doi:10.1006/viro.1996.0234
- Choe, S. (2002). Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci*, 3(2), 115-121. doi:10.1038/nrn727
- Choi, K. L., Aldrich, R. W., & Yellen, G. (1991). Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(12), 5092-5095.
- Colquhoun, D., & Hawkes, A. G. (1983). The Principles of the Stochastic Interpretation of Ion-Channel Mechanisms. In B. Sakmann & E. Neher (Eds.), *Single-Channel Recording* (pp. 135-175). Boston, MA: Springer US.
- Colquhoun, D., & Sigworth, F. J. (1983). Fitting and Statistical Analysis of Single-Channel Records. In B. Sakmann & E. Neher (Eds.), *Single-Channel Recording* (pp. 191-263). Boston, MA: Springer US.
- Cordero-Morales, J. F., Jogini, V., Lewis, A., Vásquez, V., Cortes, D. M., Roux, B., & Perozo, E. (2007). Molecular driving forces determining potassium channel slow inactivation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14, 1062. doi:10.1038/nsmb1309 <https://www.nature.com/articles/nsmb1309#supplementary-information>
- Criado, M., Eibl, H., & Barrantes, F. J. (1982). Effects of lipids on acetylcholine receptor. Essential need of cholesterol for maintenance of agonist-induced state transitions in lipid vesicles. *Biochemistry*, 21(15), 3622-3629.
- Dart, C. (2010). Lipid microdomains and the regulation of ion channel function. *J Physiol*, 588(Pt 17), 3169-3178. doi:10.1113/jphysiol.2010.191585
- de Planque, M. R., & Killian, J. A. (2003). Protein-lipid interactions studied with designed transmembrane peptides: role of hydrophobic matching and interfacial anchoring. *Mol Membr Biol*, 20(4), 271-284. doi:10.1080/09687680310001605352
- Demel, R. A., Geurts van Kessel, W. S., Zwaal, R. F., Roelofsen, B., & van Deenen, L. L. (1975). Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochim Biophys Acta*, 406(1), 97-107.
- Dopico, A. M., Bukiya, A. N., & Singh, A. K. (2012). Large conductance, calcium- and voltage-gated potassium (BK) channels: regulation by cholesterol. *Pharmacol Ther*, 135(2), 133-150. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.05.002
- Dufourc, E. J. (2008). Sterols and membrane dynamics. *J Chem Biol*, 1(1-4), 63-77. doi:10.1007/s12154-008-0010-6
- Eckert, D. (2018) Analyse von zwei strukturell ähnlichen aber funktionell unterschiedlichen viralen K⁺-Kanälen: Strukturelle Ursache der inhärenten Einwärtsgleichrichtung. Dissertation an der Technischen Universität Darmstadt
- Elliott, J. R., Needham, D., Dilger, J. P., & Haydon, D. A. (1983). The effects of bilayer thickness and tension on gramicidin single-channel lifetime. *Biochim Biophys Acta*, 735(1), 95-103.
- Freeman, E. C., Najem, J. S., Sukharev, S., Philen, M. K., & Leo, D. J. (2016). The mechano-electrical response of droplet interface bilayer membranes. *Soft Matter*, 12(12), 3021-3031. doi:10.1039/c5sm02779a

- Gallová, J., Uhríková, D., Hanulová, M., Teixeira, J., & Balgavý, P. (2004). Bilayer thickness in unilamellar extruded 1,2-dimyristoleoyl and 1,2-dierucoyl phosphatidylcholine vesicles: SANS contrast variation study of cholesterol effect. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 38(1), 11-14. doi:https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.07.012
- Gallová, J., Uhríková, D., Kučerka, N., Teixeira, J., & Balgavý, P. (2008). Hydrophobic thickness, lipid surface area and polar region hydration in monounsaturated diacylphosphatidylcholine bilayers: SANS study of effects of cholesterol and β sitosterol in unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(11), 2627-2632. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.009
- Gazzarrini, S., Abenavoli, A., Gradmann, D., Thiel, G., & Moroni, A. (2006). Electrokinetics of miniature K⁺ channel: open-state V sensitivity and inhibition by K⁺ driving force. *J Membr Biol*, 214(1), 9-17. doi:10.1007/s00232-006-0024-3
- Gazzarrini, S., Kang, M., Abenavoli, A., Romani, G., Olivari, C., Gaslini, D., . . . Moroni, A. (2009). Chlorella virus ATCV-1 encodes a functional potassium channel of 82 amino acids. *Biochem J*, 420(2), 295-303. doi:10.1042/bj20090095
- Goetz, R., and R. Lipowsky. 1998. Computer simulations of bilayer membranes: self-assembly and interfacial tension. *J. Chem. Phys.* 108:7397-7409.
- Greiner (2011) Characterization of novel potassium transport proteins from Chlorella viruses. Dissertation at the Technische Universität Darmstadt.
- Gulbis, J. M., Zhou, M., Mann, S., & MacKinnon, R. (2000). Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. *Science*, 289(5476), 123-127.
- Gullingsrud, J., & Schulten, K. (2004). Lipid bilayer pressure profiles and mechanosensitive channel gating. *Biophys J*, 86(6), 3496-3509. doi:10.1529/biophysj.103.034322
- Hamacher, K., Greiner, T., Ogata, H., Van Etten, J. L., Gebhardt, M., Villarreal, L. P., . . . Thiel, G. (2012). Phycodnavirus potassium ion channel proteins question the virus molecular piracy hypothesis. *PLoS One*, 7(6), e38826. doi:10.1371/journal.pone.0038826
- Hansen, S. B. (2015). Lipid agonism: The PIP2 paradigm of ligand-gated ion channels.
- Hanke W. and Schlue W.-R. (1993) *Planar Lipid Bilayers – Methods and Applications*, Academic Press Inc., San Diego (CA, USA) *Biochim Biophys Acta*, 1851(5), 620-628. doi:10.1016/j.bbalip.2015.01.011
- Harroun, T. A., Heller, W. T., Weiss, T. M., Yang, L., & Huang, H. W. (1999). Experimental Evidence for Hydrophobic Matching and Membrane-Mediated Interactions in Lipid Bilayers Containing Gramicidin. *Biophys J*, 76(2), 937-945. doi:https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77257-7
- Heginbotham, L., Kolmakova-Partensky, L., & Miller, C. (1998). Functional reconstitution of a prokaryotic K⁺ channel. *J Gen Physiol*, 111(6), 741-749.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., & MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J*, 66(4), 1061-1067. doi:10.1016/s0006-3495(94)80887-2
- Hertel, B., Tayefeh, S., Mehmel, M., Kast, S. M., Van Etten, J., Moroni, A., & Thiel, G. (2006). Elongation of outer transmembrane domain alters function of miniature K⁺ channel Kcv. *J Membr Biol*, 210(1), 21-29. doi:10.1007/s00232-005-7026-4
- Hilgemann, D. W. (2007). Local PIP(2) signals: when, where, and how? *Pflugers Arch*, 455(1), 55-67. doi:10.1007/s00424-007-0280-9
- Hilgemann, D. W., & Ball, R. (1996). Regulation of cardiac Na⁺,Ca²⁺ exchange and KATP potassium channels by PIP2. *Science*, 273(5277), 956-959.
- Hille, B. (1978) Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. *Biophys. J.* 22(2): 283-294
- Hille, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3. Auflage, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hoshi, T., Zagotta, W. N., & Aldrich, R. W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science*, 250(4980), 533-538.
- Huang, C. L., Feng, S., & Hilgemann, D. W. (1998). Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma. *Nature*, 391(6669), 803-806. doi:10.1038/35882

- Hunte, C., & Richers, S. (2008). Lipids and membrane protein structures. *Curr Opin Struct Biol*, 18(4), 406-411. doi:10.1016/j.sbi.2008.03.008
- Huster, D., Arnold, K., & Gawrisch, K. (1998). Influence of docosahexaenoic acid and cholesterol on lateral lipid organization in phospholipid mixtures. *Biochemistry*, 37(49), 17299-17308. doi:10.1021/bi980078g
- Hwang, W. L., Chen, M., Cronin, B., Holden, M. A., & Bayley, H. (2008). Asymmetric droplet interface bilayers. *J Am Chem Soc*, 130(18), 5878-5879. doi:10.1021/ja802089s
- Iwamoto, M., & Oiki, S. (2015). Contact bubble bilayers with flush drainage. *Sci Rep*, 5, 9110. doi:10.1038/srep09110
- Iwamoto, M., & Oiki, S. (2018). Constitutive boost of a K(+) channel via inherent bilayer tension and a unique tension-dependent modality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(51), 13117-13122. doi:10.1073/pnas.1812282115
- Jiang, Q. X., & Gonen, T. (2012). The influence of lipids on voltage-gated ion channels. *Curr Opin Struct Biol*, 22(4), 529-536. doi:10.1016/j.sbi.2012.03.009
- Jiang, Y., & MacKinnon, R. (2000). The barium site in a potassium channel by x-ray crystallography. *J Gen Physiol*, 115(3), 269-272.
- Kang, M., Graves, M., Mehmel, M., Moroni, A., Gazzarrini, S., Thiel, G., . . . Van Etten, J. L. (2004). Genetic diversity in chlorella viruses flanking *kcv*, a gene that encodes a potassium ion channel protein. *Virology*, 326(1), 150-159. doi:10.1016/j.virol.2004.05.023
- Kang, M., Moroni, A., Gazzarrini, S., DiFrancesco, D., Thiel, G., Severino, M., & Van Etten, J. L. (2004). Small potassium ion channel proteins encoded by chlorella viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(15), 5318-5324. doi:10.1073/pnas.0307824100
- Kara, S., Afonin, S., Babii, O., Tkachenko, A. N., Komarov, I. V., & Ulrich, A. S. (2017). Diphytanoyl lipids as model systems for studying membrane-active peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(10), 1828-1837. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.06.003
- Killian, J. A. (1998). Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1376(3), 401-415.
- Killian, J. A. (2003). Synthetic peptides as models for intrinsic membrane proteins. *FEBS Lett*, 555(1), 134-138.
- Kim, T., Lee, K. I., Morris, P., Pastor, R. W., Andersen, O. S., & Im, W. (2012). Influence of hydrophobic mismatch on structures and dynamics of gramicidin a and lipid bilayers. *Biophys J*, 102(7), 1551-1560. doi:10.1016/j.bpj.2012.03.014
- Korade, Z., & Kenworthy, A. K. (2008). Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology*, 55(8), 1265-1273.
- Kucerka, N., Nagle, J. F., Sachs, J. N., Feller, S. E., Penczer, J., Jackson, A., & Katsaras, J. (2008). Lipid bilayer structure determined by the simultaneous analysis of neutron and X-ray scattering data. *Biophys J*, 95(5), 2356-2367. doi:10.1529/biophysj.108.132662
- Kučerka, N., Nagle, J. F., Sachs, J. N., Feller, S. E., Penczer, J., Jackson, A., & Katsaras, J. (2008). Lipid Bilayer Structure Determined by the Simultaneous Analysis of Neutron and X-Ray Scattering Data. *Biophys J*, 95(5), 2356-2367. doi:10.1529/biophysj.108.132662
- Kucerka, N., Nieh, M. P., & Katsaras, J. (2011). Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochim Biophys Acta*, 1808(11), 2761-2771. doi:10.1016/j.bbamem.2011.07.022
- Kuo, A., Gulbis, J. M., Antcliff, J. F., Rahman, T., Lowe, E. D., Zimmer, J., . . . Doyle, D. A. (2003). Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science*, 300(5627), 1922-1926. doi:10.1126/science.1085028
- Kurata, H. T., & Fedida, D. (2006). A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol*, 92(2), 185-208. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2005.10.001
- Lemmon, M. A. (2003). Phosphoinositide recognition domains. *Traffic*, 4(4), 201-213.
- Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2), 99-111. doi:10.1038/nrm2328
- Levental, I., Janmey, P. A., & Cebers, A. (2008). Electrostatic contribution to the surface pressure of charged monolayers containing polyphosphoinositides. *Biophys J*, 95(3), 1199-1205. doi:10.1529/biophysj.107.126615

- Levental, I., Janmey, P. A., & Cēbers, A. (2008). Electrostatic contribution to the surface pressure of charged monolayers containing polyphosphoinositides. *Biophys J*, 95(3), 1199-1205. doi:10.1529/biophysj.107.126615
- Levitan, I., Fang, Y., Rosenhouse-Dantsker, A., & Romanenko, V. (2010). Cholesterol and ion channels. *Subcell Biochem*, 51, 509-549. doi:10.1007/978-90-481-8622-8_19
- Levitan, I., Singh, D. K., & Rosenhouse-Dantsker, A. (2014). Cholesterol binding to ion channels. *Front Physiol*, 5, 65. doi:10.3389/fphys.2014.00065
- Lindahl, E., and O. Edholm. 2000. Spatial and energetic-entropic decomposition of surface tension in lipid bilayers from molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* 113:3882–3893.
- Lindsey, H., Petersen, N. O., & Chan, S. I. (1979). Physicochemical characterization of 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in model membrane systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 555(1), 147-167. doi:https://doi.org/10.1016/0005-2736(79)90079-8
- Long, S. B., Campbell, E. B., & Mackinnon, R. (2005). Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science*, 309(5736), 903-908. doi:10.1126/science.1116270
- Lüttge, Kluge, Thiel (2010) Botanik: Die umfassende Biologie der Pflanze. 1. Ausgabe, Wiley-VCH.
- Lundbaek, J. A., & Andersen, O. S. (1994). Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers. *J Gen Physiol*, 104(4), 645-673.
- Lundbaek, J. A., & Andersen, O. S. (1999). Spring constants for channel-induced lipid bilayer deformations. Estimates using gramicidin channels. *Biophys J*, 76(2), 889-895.
- Lundbaek, J. A., Birn, P., Girshman, J., Hansen, A. J., & Andersen, O. S. (1996). Membrane stiffness and channel function. *Biochemistry*, 35(12), 3825-3830. doi:10.1021/bi952250b
- Luzzati, V., & Husson, F. (1962). The structure of the liquid-crystalline phase of lipid-water systems. *J Cell Biol*, 12, 207-219.
- MacKinnon, R. (2003). Potassium channels. *FEBS Lett*, 555(1), 62-65.
- Marsh, D., & Barrantes, F. J. (1978). Immobilized lipid in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(9), 4329-4333.
- McGuire, H., & Blunck, R. (2015). Studying Clustering of KcsA Channels using Single-Channel Voltage-Clamp Fluorescence Imaging. *Biophys J*, 108(2, Supplement 1), 440a. doi:https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.11.2404
- McIntosh, T. J. (1978). The effect of cholesterol on the structure of phosphatidylcholine bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 513(1), 43-58. doi:https://doi.org/10.1016/0005-2736(78)90110-4
- McKersie, B. D., & Thompson, J. E. (1979). Influence of Plant Sterols on the Phase Properties of Phospholipid Bilayers. *Plant Physiology*, 63(5), 802. doi:10.1104/pp.63.5.802
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A., & Murray, D. (2002). PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 31, 151-175. doi:10.1146/annurev.biophys.31.082901.134259
- Montal, M., & Mueller, P. (1972). Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69(12), 3561-3566.
- Morais-Cabral, J. H., Zhou, Y., & MacKinnon, R. (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature*, 414(6859), 37-42. doi:10.1038/35102000
- Nakano, M., Fukuda, M., Kudo, T., Endo, H., & Handa, T. (2007). Determination of interbilayer and transbilayer lipid transfers by time-resolved small-angle neutron scattering. *Phys Rev Lett*, 98(23), 238101. doi:10.1103/PhysRevLett.98.238101
- Pasenkiewicz-Gierula, M., Subczynski, W. K., & Kusumi, A. (1991). Influence of phospholipid unsaturation on the cholesterol distribution in membranes. *Biochimie*, 73(10), 1311-1316. doi:https://doi.org/10.1016/0300-9084(91)90094-H
- Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res*, 47(7), 1597-1598. doi:10.1194/jlr.E600002-JLR200

- Pike, L. J. (2009). The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res*, 50 Suppl, S323-328. doi:10.1194/jlr.R800040-JLR200
- Platre, M. P., & Jaillais, Y. (2017). Anionic lipids and the maintenance of membrane electrostatics in eukaryotes. *Plant Signal Behav*, 12(2), e1282022. doi:10.1080/15592324.2017.1282022
- Plesnar, E., Subczynski, W. K., & Pasenkiewicz-Gierula, M. (2012). Saturation with cholesterol increases vertical order and smoothes the surface of the phosphatidylcholine bilayer: A molecular simulation study. *Biochim Biophys Acta*, 1818(3), 520-529.
- Plugge, B., Gazzarrini, S., Nelson, M., Cerana, R., Van Etten, J. L., Derst, C., . . . Thiel, G. (2000). A potassium channel protein encoded by chlorella virus PBCV-1. *Science*, 287(5458), 1641-1644.
- Rauh, O. 2014 Mutationsstudien zur Struktur-Funktions-Korrelation der viralen Kaliumkanäle Kcv_S und Kcv_{NTS}. Masterarbeit an der Technischen Universität Darmstadt
- Rauh, O., Urban, M., Henkes, L. M., Winterstein, T., Greiner, T., Van Etten, J. L., . . . Schroeder, I. (2017). Identification of Intrahelical Bifurcated H-Bonds as a New Type of Gate in K(+) Channels. *J Am Chem Soc*, 139(22), 7494-7503. doi:10.1021/jacs.7b01158
- Rauh, O. (2018) Molecular explanations for gating in simple model K⁺ channels. Dissertation an der Technischen Universität Darmstadt
- Redwood, W. R., Pfeiffer, F. R., Weisbach, J. A., & Thompson, T. E. (1971). Physical properties of bilayer membranes formed from a synthetic saturated phospholipid in n-decane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 233(1), 1-6. doi:https://doi.org/10.1016/0005-2736(71)90351-8
- Rietveld, A., & Simons, K. (1998). The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim Biophys Acta*, 1376(3), 467-479.
- Ritchie, T. K., Grinkova, Y. V., Bayburt, T. H., Denisov, I. G., Zolnerciks, J. K., Atkins, W. M., & Sligar, S. G. (2009). Chapter 11 - Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs. *Methods Enzymol*, 464, 211-231. doi:10.1016/s0076-6879(09)64011-8
- Roux, B., & MacKinnon, R. (1999). The cavity and pore helices in the KcsA K⁺ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science*, 285(5424), 100-102.
- Sansom, M. S., Shrivastava, I. H., Bright, J. N., Tate, J., Capener, C. E., & Biggin, P. C. (2002). Potassium channels: structures, models, simulations. *Biochim Biophys Acta*, 1565(2), 294-307.
- Schlee, L. 2016 Einflüsse verschiedener Membranen auf den viralen Kaliumkanal Kcv_{NTS}. Masterarbeit an der Technischen Universität Darmstadt
- Schroeder, I., & Hansen, U. P. (2006). Strengths and limits of Beta distributions as a means of reconstructing the true single-channel current in patch clamp time series with fast gating. *J Membr Biol*, 210(3), 199-212. doi:10.1007/s00232-006-0858-8
- Schroeder, I., & Hansen, U. P. (2007). Saturation and microsecond gating of current indicate depletion-induced instability of the MaxiK selectivity filter. *J Gen Physiol*, 130(1), 83-97. doi:10.1085/jgp.200709802
- Shaikh, S. R., Cherezov, V., Caffrey, M., Stillwell, W., & Wassall, S. R. (2003). Interaction of cholesterol with a docosahexaenoic acid-containing phosphatidylethanolamine: trigger for microdomain/raft formation? *Biochemistry*, 42(41), 12028-12037. doi:10.1021/bi034931+
- Silvius, J. R. (2003). Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim Biophys Acta*, 1610(2), 174-183.
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569-572. doi:10.1038/42408
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(1), 31-39. doi:10.1038/35036052
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720-731.

- Singh, D. K., Shentu, T. P., Enkvetchakul, D., & Levitan, I. (2011). Cholesterol regulates prokaryotic Kir channel by direct binding to channel protein. *Biochim Biophys Acta*, 1808(10), 2527-2533. doi:10.1016/j.bbamem.2011.07.006
- Siotto, F., Martin, C., Rauh, O., Van Etten, J. L., Schroeder, I., Moroni, A., & Thiel, G. (2014). Viruses infecting marine picoplankton encode functional potassium ion channels. *Virology*, 466-467, 103-111. doi:10.1016/j.virol.2014.05.002
- Siotto, F. (2017) Mining and analysis of new viral potassium channel proteins. Dissertation an der Technischen Universität Darmstadt
- Steinberg, S. F. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev*, 88(4), 1341-1378. doi:10.1152/physrev.00034.2007
- Stockton, G. W., & Smith, I. C. (1976). A deuterium nuclear magnetic resonance study of the condensing effect of cholesterol on egg phosphatidylcholine bilayer membranes. I. Perdeuterated fatty acid probes. *Chem Phys Lipids*, 17(2-3 spec no), 251-263.
- Suh, B. C., & Hille, B. (2008). PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annu Rev Biophys*, 37, 175-195. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.125859
- Tayefeh, S., Kloss, T., Kreim, M., Gebhardt, M., Baumeister, D., Hertel, B., . . . Kast, S. M. (2009). Model development for the viral Kcv potassium channel. *Biophys J*, 96(2), 485-498. doi:10.1016/j.bpj.2008.09.050
- Taylor, G., Nguyen, M. A., Koner, S., Freeman, E., Collier, C. P., & Sarles, S. A. (2019). Electrophysiological interrogation of asymmetric droplet interface bilayers reveals surface-bound alamethicin induces lipid flip-flop. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1861(1), 335-343. doi:10.1016/j.bbamem.2018.07.001
- Templer, R. H., Castle, S. J., Curran, A. R., Rumbles, G., & Klug, D. R. (1998). Sensing isothermal changes in the lateral pressure in model membranes using di-pyrenyl phosphatidylcholine. *Faraday Discuss*(111), 41-53; discussion 69-78.
- Thiel, G., Baumeister, D., Schroeder, I., Kast, S. M., Van Etten, J. L., & Moroni, A. (2011). Minimal art: or why small viral K(+) channels are good tools for understanding basic structure and function relations. *Biochim Biophys Acta*, 1808(2), 580-588. doi:10.1016/j.bbamem.2010.04.008
- Tillman, T. S., & Cascio, M. (2003). Effects of membrane lipids on ion channel structure and function. *Cell Biochem Biophys*, 38(2), 161-190. doi:10.1385/cbb:38:2:161
- Tristram-Nagle, S., Kim, D. J., Akhunzada, N., Kučerka, N., Mathai, J. C., Katsaras, J., . . . Nagle, J. F. (2010). Structure and water permeability of fully hydrated diphytanoylPC. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163(6), 630-637. doi:https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.04.011
- Valiyaveetil, F. I., Zhou, Y., & MacKinnon, R. (2002). Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K⁺ channel. *Biochemistry*, 41(35), 10771-10777.
- Van Etten, J. L., Lane, L. C., & Dunigan, D. D. (2010). DNA viruses: the really big ones (giruses). *Annu Rev Microbiol*, 64, 83-99. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134338
- van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2), 112-124. doi:10.1038/nrm2330
- Verdiá-Báguena, C., Nieto-Torres, J. L., Alcaraz, A., DeDiego, M. L., Enjuanes, L., & Aguilera, V. M. (2013). Analysis of SARS-CoV E protein ion channel activity by tuning the protein and lipid charge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(9), 2026-2031. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.008
- Waters, R. E., Chan, A. T. (1982) *Micromonas pusilla* Virus: the Virus Growth Cycle and Associated Physiological Events Within the Host Cells; Host Range Mutation. *J. gen. Virol.* 1982, 63, 188-206.
- White, S. H. (1976). The lipid bilayer as a "solvent" for small hydrophobic molecules. *Nature*, 262(5567), 421-422.
- Wimley, W. C., & Thompson, T. E. (1990). Exchange and flip-flop of dimyristoyl phosphatidylcholine in liquid-crystalline, gel and two-component, two-phase large unilamellar vesicles. *Biochemistry*, 29(5), 1296-1303. doi:10.1021/bi00457a027

-
- Winterstein, L. M., Kukovetz, K., Rauh, O., Turman, D. L., Braun, C., Moroni, A., . . . Thiel, G. (2018). Reconstitution and functional characterization of ion channels from nanodiscs in lipid bilayers. *J Gen Physiol*, 150(4), 637-646. doi:10.1085/jgp.201711904
- Wood, W. G., Igbavboa, U., Muller, W. E., & Eckert, G. P. (2011). Cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes. *J Neurochem*, 116(5), 684-689. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07017.x
- Worcester, D. L., & Franks, N. P. (1976). Structural analysis of hydrated egg lecithin and cholesterol bilayers II. Neutron diffraction. *Journal of Molecular Biology*, 100(3), 359-378. doi:https://doi.org/10.1016/S0022-2836(76)80068-X
- Wu, Y., He, K., Ludtke, S. J., & Huang, H. W. (1995). X-ray diffraction study of lipid bilayer membranes interacting with amphiphilic helical peptides: diphytanoyl phosphatidylcholine with alamethicin at low concentrations. *Biophys J*, 68(6), 2361-2369. doi:https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80418-2
- Xiang, T. X., & Anderson, B. D. (1994). Molecular distributions in interphases: statistical mechanical theory combined with molecular dynamics simulation of a model lipid bilayer. *Biophys J*, 66(3 Pt 1), 561-572.
- Yeagle, P. L. (1985). Cholesterol and the cell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 822(3), 267-287. doi:https://doi.org/10.1016/0304-4157(85)90011-5
- Yeagle, P. L. (1991). Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie*, 73(10), 1303-1310.
- Yellen, G. (1998). The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q Rev Biophys*, 31(3), 239-295.
- Yellen, G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419(6902), 35-42. doi:10.1038/nature00978
- Yuan, C., O'Connell, R. J., Feinberg-Zadek, P. L., Johnston, L. J., & Treistman, S. N. (2004). Bilayer thickness modulates the conductance of the BK channel in model membranes. *Biophys J*, 86(6), 3620-3633. doi:10.1529/biophysj.103.029678
- Zagotta, W. N., Hoshi, T., & Aldrich, R. W. (1990). Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science*, 250(4980), 568-571.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Membranlipiden und ihrer Zusammenlagerung zu einer Doppellipidmembran.	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Sphingolipids und eines Phospholipids; die zwei häufigsten Lipidarten einer natürlichen Doppellipidmembran.	2
Abbildung 3: Struktur von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP ₂).	5
Abbildung 4: Schematische Einlagerung von Sterolen in eine Doppellipidmembran (A) aufgrund ihrer polaren chemischen Eigenschaften (B).	7
Abbildung 5: Schematischer Aufbau von Cholesterol und dessen Einlagerung in Doppellipidmembranen.	8
Abbildung 6: Schematische Darstellung diverser Membranproteine.	12
Abbildung 7: Ionenkanäle verringern die freie Energie, die für den Übertritt eines Ions über eine biologische Membran nötig ist und können somit als Katalysatoren angesehen werden.	15
Abbildung 8: Ionenkanäle können durch ihren Einbau in eine Membran einen negativen (A) oder positiven <i>Mismatch</i> (B) bedingen.	17
Abbildung 9: Aufbau verschiedener Kaliumkanäle.	20
Abbildung 10: MD-Simulation des viralen Kaliumkanals Kcv _{ATCV-1} in DMPC (A)- und POPC-Membranen (B).	22
Abbildung 11: Sequenzalignment diverser viraler Kaliumkanäle.	23
Abbildung 12: Schematische Darstellung des Aufbaus der viralen Kaliumkanäle Kcv _{NTS} und Kcv _S am Beispiel des Homologiemodells des viralen Kaliumkanals Kcv _{NTS} sowie das Sequenzalignment beider Kanäle.	24
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Aufbaus des viralen Kaliumkanals Kmpv _{12T} sowie seine Aminosäuresequenz.	25
Abbildung 14: Schematische Darstellung einer Nanodisk.	27
Abbildung 15: Schematische Darstellung einer Messkammer der planaren Lipid <i>Bilayer</i> Methode (A), sowie der Pseudo - Painting Technik (B).	29
Abbildung 16: Prinzip der <i>Contact Bubble Bilayer</i> Methode.	31
Abbildung 17: Die Bildung eines <i>Bilayers</i> ist am angelegten Spannungsprotokoll erkennbar.	33

Abbildung 18: Stromantwort des Testprotokolls auf einen <i>Bilayer</i> mit inseriertem Kanalprotein.....	34
Abbildung 19: Kcv _{NTS} und Kcv _S zeigen bei negativen Spannungen das für Kcv - Kanäle typische Flicker - <i>Gating</i> und unterscheiden sich anhand der langen Geschlossenzeiten von Kcv _S	38
Abbildung 20: Charakterisierung des Kcv _{NTS} und Kcv _S in Membranen aus DPhPC auf Einzelkanalbasis am Planaren Lipid <i>Bilayer</i>	39
Abbildung 21: Charakterisierung der Geschlossen- und Offenzeiten von Kcv _{NTS} und Kcv _S mithilfe von <i>Dwelltime</i> - Analysen.	40
Abbildung 22: Kmp _{V12T} besitzt eine Unterleitfähigkeit und zeigt ein spannungsabhängiges <i>Gating</i> - Verhalten.	41
Abbildung 23: Charakterisierung des Kmp _{V12T} in Membranen aus DPhPC auf Einzelkanalbasis am Planaren Lipid <i>Bilayer</i>	42
Abbildung 24: Mögliche Einbauarten eines Kanals der zuvor in Nanodisks exprimiert wurde in den <i>Bilayer</i>	44
Abbildung 25: Kcv _{NTS} konnte erfolgreich in verschiedenen Nanodisks exprimiert werden und zeigt identisches Schaltverhalten in DPhPC Membranen der <i>Contact Bubble Bilayer</i> Methode.	45
Abbildung 26: Die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kaliumkanals Kcv _{NTS} (CBB) verändern sich nicht durch die Art der Nanodisk (MM, DMPC, DMPG und POPC), in der er exprimiert wurde.	46
Abbildung 27: Der humane Kaliumkanal Kir _{2.1} aus MM Disks ist funktionell.	47
Abbildung 28: Der humane Kaliumkanal Kir _{2.1} aus MM Disks verhält sich aufgrund fehlenden Magnesiums oder Spermidin in der Messlösung nicht einwärtsgleichrichtend und besitzt eine hohe Offenwahrscheinlichkeit.	48
Abbildung 29: Repräsentative Einzelkanalströme des bakteriellen Modellkanals KcsA E71A aus vier verschiedenen Nanodisks, zeigen kaum Unterschiede im Schaltverhalten.	49
Abbildung 30: Direkter Kanaleinbau des viralen Kaliumkanals Kcv _{NTS} nach Expression in den <i>Bubbles</i> der CBB Methode.	50
Abbildung 31: Beide Kcv - Kanäle sind mit der Planaren Lipid und der <i>Contact Bubble Bilayer</i> Methode messbar und zeigen vergleichbare Schaltverhalten.....	51

Abbildung 32: Die elektrophysiologischen Eigenschaften der beiden Kcv - Kanäle Kcv _{N_TS} und Kcv _S sind in planaren Lipid <i>Bilayern</i> (schwarz) und <i>Contact Bubble Bilayern</i> (weiß) ähnlich..	53
Abbildung 33: Kmp _{V₁₂T} ist mit der Planaren Lipid und der <i>Contact Bubble Bilayer</i> Methode messbar zeigt jedoch unterschiedliches Schaltverhalten.	54
Abbildung 34: Kmp _{V₁₂T} zeigt in CBB Membranen eine deutliche Einwärtsgleichrichtung in der Strom – Spannungsbeziehung sowie eine Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit in beiden Messsystemen.	55
Abbildung 35: Kcv _{N_TS} ist in Soja -Lecithin Membranen messbar und zeigt ähnliches Schaltverhalten mit erhöhter Offenkanalamplitude..	58
Abbildung 36: Die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kcv _{N_TS} in ungeladenen Soja – Lecithin Membranen zeigen eine erhöhte Leitfähigkeit.	59
Abbildung 37: Kcv _S ist in Soja -Lecithin Membranen messbar und zeigt ähnliches Schaltverhalten mit erhöhter Leitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit.	60
Abbildung 38: Die elektrophysiologischen Messergebnisse des Kcv _S in Soja – Lecithin Membranen zeigen eine deutlich erhöhte Offenwahrscheinlichkeit, sowie eine in geringem Maße erhöhte Leitfähigkeit.	61
Abbildung 39: Kmp _{V₁₂T} ist in Soja -Lecithin Membranen messbar und zeigt ähnliches Schaltverhalten mit geringeren Offenwahrscheinlichkeiten.	62
Abbildung 40: Repräsentative Einzelkanalströme des Kmp _{V₁₂T} zeigen eine erhöhte Leitfähigkeit in Soja – Lecithin Membranen.	63
Abbildung 41: Kcv _{N_TS} lässt sich in symmetrischen POPC sowie in asymmetrischen DPhPC/POPC Membranen messen und zeigt in letzteren eine erhöhte Offenkanalamplitude bei +160 mV.	65
Abbildung 42: Kcv _{N_TS} zeigt einen erhöhten Stromfluss bei hohen positiven Spannungen in asymmetrischen POPC / DPhPC <i>Bilayern</i> (CBB), während eine reine Membran aus POPC keine veränderte Funktion des Kanals hervorruft.	66
Abbildung 43: Kcv _S ist in Membranen aus POPC messbar und zeigt verringerte Offenkanalamplituden und häufigere Geschlossenphasen.	67
Abbildung 44: Kcv _S besitzt eine niedrigere Leitfähigkeit sowie eine deutlich verringerte Offenwahrscheinlichkeit in reinen POPC Membranen unter Verwendung der CBB - Methode.	68

Abbildung 45: Kmp _{V12T} ist in Membranen aus POPC messbar, zeigen jedoch kein verändertes Schaltverhalten im Vergleich zu DPhPC Membranen.....	68
Abbildung 46: Membranen aus POPC haben keinen Einfluss auf den viralen Kaliumkanal Kmp _{V12T}	69
Abbildung 47: Kcv _{NTS} ist in cholesterolhaltigen Membranen messbar und zeigt ähnliches Schaltverhalten mit erhöhten Offenkanalamplituden bei positiven Spannungen.	74
Abbildung 48: Die Leitfähigkeit von Kcv _{NTS} ist in Membranen mit Cholesterolanteilen erhöht, während die Offenwahrscheinlichkeit unverändert bleibt.	75
Abbildung 49: Kcv _S ist in cholesterolhaltigen Membranen messbar und zeigt ein verändertes Schaltverhalten was zu höheren Offenwahrscheinlichkeiten führt. .	76
Abbildung 50: Kcv _S zeigt eine erhöhte Leitfähigkeit in Membranen aus DPhPC mit 30 mol% Cholesterol, während die Offenwahrscheinlichkeiten nur mit 10 mol% Cholesterol deutlich ansteigt.	77
Abbildung 51: Kmp _{V12T} ist in cholesterolhaltigen Membranen funktionell und zeigt mit steigenden Cholesterolkonzentrationen verlängerte Offenzeiten.....	78
Abbildung 52: Die Leitfähigkeiten von Kmp _{V12T} sind in Membranen mit einem Cholesterolanteil von 30 mol% erhöht, während die Offenwahrscheinlichkeiten mit allen Konzentrationen deutlich ansteigen.	79
Abbildung 53: Das Prinzip der Braggschen Interferenz und die zugehörige Bragg Gleichung.	82
Abbildung 54: Die Insertion von Kcv _{NTS} führt in Membranen mit verschiedenen Cholesterolkonzentrationen zu einer Phasentrennung und damit zu unterschiedlichen Membrandicken.	83
Abbildung 55: Kcv _{NTS} ist in cholesterolhaltigen DPPC Membranen funktionell und zeigt identisches Schaltereignisse in allen Membranen.	84
Abbildung 56: Die Leitfähigkeit von Kcv _{NTS} liegt in Membranen aus DPPC mit verschiedenen Cholesterolanteilen zwischen denen in reinen DPPC und DPhPC Membranen, während die Offenwahrscheinlichkeiten nur bei hohen positiven Spannungen variieren.....	85
Abbildung 57: DPhPS führt mit steigender Konzentration zu vergrößerten Offenkanalamplituden, während die Offenwahrscheinlichkeiten mit 1 mol% und in reinen DPhPS Membranen verringert sind, in Membranen aus 50 mol% jedoch erhöht sind.	90

Abbildung 58: Die Leitfähigkeiten von Kmpv _{12T} sind in Membranen mit steigenden DPhPS - Konzentrationen erhöht, während die Auswirkungen auf die Offenwahrscheinlichkeiten divers sind.	91
Abbildung 59: DPhPS führt mit steigender Konzentration zu vergrößerten Offenkanalamplituden von Kcv _{NTS} , während die Geschlossenphasen mit 1 mol% vermehrt auftreten und in Membranen über 50 mol% jedoch noch seltener auftreten als in reinen DPhPC Membranen.....	92
Abbildung 60: Kcv _{NTS} zeigt mit steigenden DPhPS Konzentrationen erhöhte Leitfähigkeiten und erhöhte mittlere Offenwahrscheinlichkeiten.	93
Abbildung 61: Kcv _S zeigt in reinen DPhPS Membranen (links) nahezu das gleiche <i>Gating</i> - Verhalten wie Kcv _{NTS} in DPhPC Membranen (rechts).....	94
Abbildung 62: Kcv _S reagiert auf steigende DPhPS - Konzentrationen mit einem Anstieg der Offenkanalamplitude sowie einem Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit aufgrund von selteneren langen Geschlossenphasen.	95
Abbildung 63: DPhPS erhöht die Leitfähigkeit und die mittlere Offenwahrscheinlichkeit von Kcv _S in zwei Schritten..	96
Abbildung 64: <i>Dwelltime</i> - Analysen von Kcv _S in verschiedenen DPhPS Membranen (1 mol%, 5 mol%, 50 mol% und 100 mol%) zeigen, dass der hochaffine erste Effekt mit einer verkürzten Lebensdauer und Besetzungswahrscheinlichkeit des dritten Geschlossenzustandes einhergeht, während der zweite niederaffine Effekt hingegen durch alle drei Geschlossenzustände hervorgerufen wird.	99
Abbildung 65: Schematische Darstellung der anionischen Kopfgruppen von DPhPS (links) und DPhPG (rechts).	100
Abbildung 66: Kcv _{NTS} , Kcv _S und Kmpv _{12T} weisen in reinen anionischen Membranen aus DPhPG oder DPhPS identische Eigenschaften auf.	101
Abbildung 67: Die Leitfähigkeiten und mittleren Offenwahrscheinlichkeiten der einzelnen Kanäle sind in Membranen aus DPhPS und DPhPG nahezu identisch.	102
Abbildung 68: Kcv _S ist in Membranen mit geringen PIP ₂ - Konzentrationen messbar und reagiert auf 1 mol% PIP ₂ bei hohen positiven Spannungen mit einer verringerten Offenkanalamplitude.	103
Abbildung 69: PIP ₂ führt zu einem Amplitudenabfall bei Spannungen >80 mV, während die Offenwahrscheinlichkeit nicht beeinflusst wird.	104

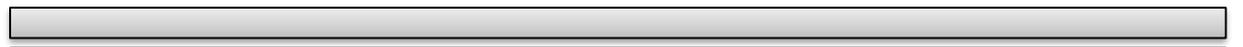


Abbildung 70: Die Mutante Kcv _S S77G verhält sich nahezu identisch zu Kcv _{N_{TS}} und besitzt nur zwei sichtbare Geschlossenzustände.	105
Abbildung 71: Das Alignment von Kcv _{N_{TS}} , Kcv _S und Kcv _{N_H} zeigt die sequenzielle Ähnlichkeit der ATCV - ähnlichen Kanäle.	106
Abbildung 72: Kcv _{N_H} besitzt in Membranen aus DPhPC innerhalb seiner <i>Gating-Bursts</i> genau wie Kcv _S drei Geschlossenzustände und weist zudem einen weiteren vierten inaktiven Zustand auf.	107
Abbildung 73: Kcv _{N_H} S77G zeigt innerhalb der <i>Gating-Bursts</i> wie Kcv _{N_{TS}} nur zwei Geschlossenzustände, während der Wildtyp Kcv _{N_H} in DPhPS zwar noch alle drei Geschlossenzustände besitzt jedoch durch deren seltene Besetzung, das <i>Gating</i> ebenfalls dem von Kcv _{N_{TS}} und dem von Kcv _{N_H} S77G ähnelt.	109
Abbildung 74: DPhPS verursacht die gleiche Spannungsabhängigkeit bei Kcv _{N_H} wie dessen S77G Mutation und erhöht DPhPS - typisch die Leitfähigkeit des Kanals.	111
Abbildung 75: Schematische Darstellung einer asymmetrischen CBB Membran mit unterschiedlicher Orientierung der eingebauten Ionenkanäle.	116
Abbildung 76: Schwarz (DPhPC) und Weiß (DPhPS) zeigen lipidtypisch geringe und hohe Offenwahrscheinlichkeiten für Kcv _S in reinen CBB Membranen, während asymmetrische CBB Membranen aus DPhPC und DPhPS (Rot, Blau und Grün) verschiedene Auswirkungen auf dessen <i>Gating</i> -Verhalten haben.	117
Abbildung 77: DPhPS erhöht in CBB Membranen ebenso wie in PLB Membranen die Offenwahrscheinlichkeit von Kcv _S , während asymmetrische Membranen orientierungsabhängig die Offenwahrscheinlichkeit von Kcv _S verändern.	118
Abbildung 78: Schematische Darstellung aller verwendeter Lipide (Avanti Lipids).....	XXVI

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mittlere Leitfähigkeiten und mittlere Offenwahrscheinlichkeiten von $K_{CV_{NTS}}$ und K_{CV_S} , sowie mittlere Leitfähigkeiten und Offenwahrscheinlichkeitsdifferenzen von $K_{mpV_{12T}}$ in reinen DPhPC Membranen der PLB Methode.	42
Tabelle 2: Mittlere Leitfähigkeiten und mittlere Offenwahrscheinlichkeiten von $K_{CV_{NTS}}$ aus verschiedenen Nanodisks.	47
Tabelle 3: Mittlere Leitfähigkeiten und mittlere Offenwahrscheinlichkeiten von $K_{CV_{NTS}}$ und K_{CV_S} , sowie mittlere Leitfähigkeiten und Offenwahrscheinlichkeitsdifferenzen von $K_{mpV_{12T}}$ in reinen DPhPC Membran der PLB und CBB Methode.	57
Tabelle 4: Mittlere Leitfähigkeiten und mittlere Offenwahrscheinlichkeiten von $K_{CV_{NTS}}$ und K_{CV_S} , sowie mittlere Leitfähigkeiten und Offenwahrscheinlichkeitsdifferenzen von $K_{mpV_{12T}}$ in reinen DPhPC, Soja - Lecithin und POPC Membranen der PLB und CBB Methode.	72
Tabelle 5: Gemittelte Leitfähigkeiten von $K_{CV_{NTS}}$, K_{CV_S} und $K_{mpV_{12T}}$ in verschiedenen Membranen mit diversen Cholesterolkonzentrationen; mittlere Offenwahrscheinlichkeiten von $K_{CV_{NTS}}$ und K_{CV_S} sowie die Offenwahrscheinlichkeitsdifferenz zwischen -160 mV und +160 mV von $K_{mpV_{12T}}$ in verschiedenen Membranen mit diversen Cholesterolkonzentrationen.	88
Tabelle 6: Gemittelte Leitfähigkeiten von $K_{CV_{NTS}}$, K_{CV_S} , $K_{CV_{NH}}$ und $K_{mpV_{12T}}$ in verschiedenen anionischen Membranen; mittlere Offenwahrscheinlichkeiten von $K_{CV_{NTS}}$ und K_{CV_S} sowie die Offenwahrscheinlichkeitsdifferenz zwischen -160 mV und +160 mV von $K_{CV_{NH}}$ und $K_{mpV_{12T}}$ in verschiedenen anionischen Membranen.	114
Tabelle 7: Mittlere Offenwahrscheinlichkeiten von K_{CV_S} in reinen DPhPC und DPhPS CBB Membranen sowie deren asymmetrische Messungen.	119

Abkürzungsverzeichnis

bzw.	beziehungsweise
bspw.	beispielsweise
ca.	circa
c	Geschlossenzustand
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPhPC	1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DPhPG	1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
DPhPS	1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
KCl	Kaliumchlorid
Kcv	K^+ channel <i>chlorella virus</i>
Kmpv	K^+ channel <i>micromonas pussilla</i>
n	Anzahl
NH	<i>New Hampshire</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NTS	<i>Next-to-Smith</i>
o	Offenzustand
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
P-Loop	Porenloop
P_o	Offenwahrscheinlichkeit
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
RT	Raumtemperatur
S	<i>Smith</i>
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TM	Transmembrandomäne
V	Membranspannung
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

Einheiten

%	1 % = 0,01
°C	Grad Celsius
A	Ampere
Å	Ångström
F	Farad
g	Gramm
Hz	Hertz [1Hz = 1s ⁻¹]
m	Meter
min	Minute
mol	Stoffmenge [1 mol = 6,022·10 ²³]
M	molar
s	Sekunde
V	Volt

Präfixe

k	kilo	10 ³
m	milli	10 ⁻³
μ	micro	10 ⁻⁶
n	nano	10 ⁻⁹
p	pico	10 ⁻¹²
f	femto	10 ⁻¹⁵

Anhang

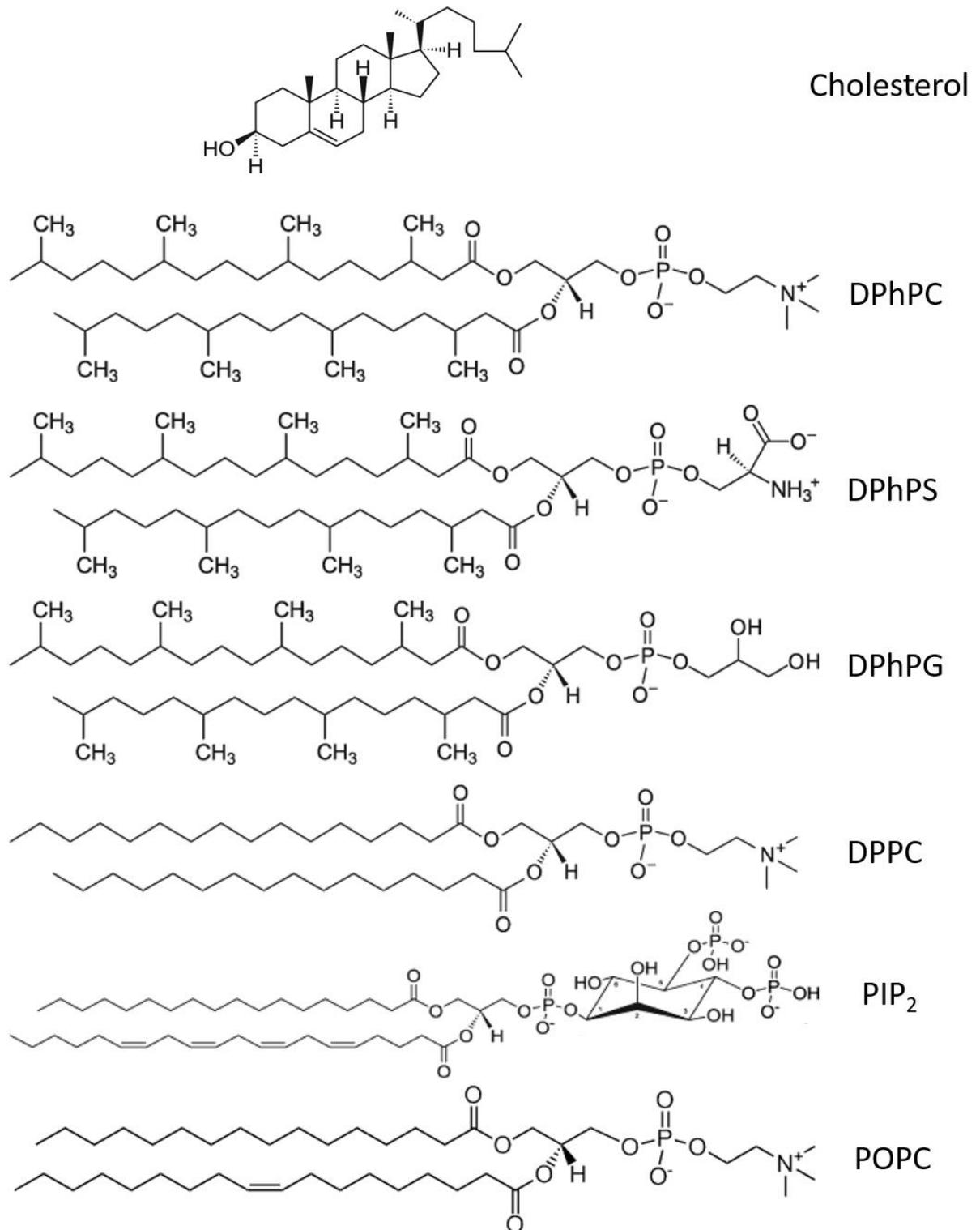


Abbildung 78: Schematische Darstellung aller verwendeter Lipide (Avanti Lipids). Alle verwendeten Lipide wurden von Avanti Polar Lipids (Inc, Alabaster, AL, USA) bezogen.

Eigene Arbeit

Alle Experimente, die Datenanalysen sowie Dokumentation wurden von mir selbst durchgeführt, ausgenommen:

- Die Einzelkanalmessungen von $K_{mpV_{12T}}$ in DPhPC und POPC mit der *Contact Bubble Bilayer* Methode, sowie die Einzelkanalmessungen von $K_{mpV_{12T}}$ in Soja - Lecithin (PLB) wurden unter meiner Anleitung im Rahmen eines Praktikums von Maike Schott (Bachelorstudentin) durchgeführt
- Die Einzelkanalmessungen von $K_{mpV_{12T}}$ in Membranen mit Cholesterolanteilen von 10 mol% und 20 mol% wurden unter meiner Anleitung im Rahmen einer Bachelorarbeit von Bernhard Schmidt durchgeführt.
- Die Daten der K_{cvS} S77G, K_{cvNTS} G77S und K_{cvNH} S77G Mutanten wurden von Oliver Rauh generiert und bereitgestellt.
- Die Daten sowie die Diagramme aus Abbildung 70 (K_{cvNTS} , K_{cvS} , K_{cvNTS} G77S, K_{cvS} S77G) wurden von Oliver Rauh generiert und bereitgestellt.
- Die Dwelltimeanalysen der Wildtypen K_{cvNTS} und K_{cvS} (Abbildung 21) sowie der K_{cvNH} S77G und K_{cvS} S77G Mutanten wurden von Oliver Rauh durchgeführt und die Abbildungen bereitgestellt.
- Die Veränderung der Membrandicke mit und ohne Cholesterol sowie mit und ohne Kanalprotein wurden mit der SAXS - Methode durch die Arbeitsgruppe von Laura Cantu (Universität Mailand) durchgeführt.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den

.....

Laura-Marie Winterstein

Lebenslauf und Publikationen

Persönliche Informationen

Name	Winterstein, geb. Schlee
Vorname	Laura-Marie
Geburtsdatum	22.08.1990
Geburtsort	Darmstadt
Nationalität	deutsch

Ausbildung

seit 03/2016	Doktorandin an der TU Darmstadt in der Arbeitsgruppe Membranbiophysik von Prof. Dr. Gerhard Thiel Betreuerin: Dr. Indra Schröder
2016	Masterarbeit an der TU Darmstadt Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thiel, Membranbiophysik
10/2014 - 02/2016	Masterstudium: Technische Biologie, TU Darmstadt
2014	Bachelorarbeit an der TU Darmstadt Arbeitsgruppe Prof. Dr. Layer, Entwicklungsbiologie und Neurogenetik
10/2011 - 09/2014	Bachelorstudium: Biologie, TU Darmstadt
09/2010 - 09/2011	Freiwilliges soziales Jahr im Zoo Vivarium, Darmstadt
2000 - 2010	Abitur an der Lichtenbergschule, Darmstadt

Publikationen

05/2018	Winterstein, L. M. , Kukovetz, K., Rauh, O., Turman, D. L., Braun, C., Moroni, A., Schroeder, I., Thiel, G. (2018). Reconstitution and functional characterization of ion channels from nanodiscs in lipid bilayers. <i>J Gen Physiol</i> , 150(4), 637-646. doi:10.1085/jgp.201711904
04/2018	Rondelli, V., Del Favero, E., Brocca, P., Fragneto, G., Trapp, M., Mauri, L., Ciampa, MG., Romani, G., Braun, CJ., Winterstein, L. , Schroeder, I., Thiel, G., Moroni, A., Cantu, L. (2018). Directional K(+) channel insertion in a single phospholipid bilayer: Neutron reflectometry and electrophysiology in the joint exploration of a model membrane functional platform. <i>Biochim Biophys Acta Gen Subj</i> , 1862(8), 1742-1750. doi:10.1016/j.bbagen.2018.05.007

Danksagung

Vielen Dank an alle, die mich während dieser Zeit begleitet haben. Im Besonderen danke ich:

Gerd, für die Möglichkeit in deiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen, sowie dein Engagement und das angenehme Arbeitsverhältnis.

Indra, für die gute Betreuung und fachliche Hilfe zu jeder Zeit.

Domi, Tobi, Oli und **Kerri**, für die fachlichen Räte und die vielen gemeinsamen lustigen Stunden während und neben der Arbeit sowie die entstandenen guten Freundschaften. Zusätzlich an **Kerri** für unsere unvergesslichen Chai Latte Sessions ☺ und **Oli** für dein Wissen und deine stets hilfsbereite Art.

Rene, ... du weißt für was ☺.

Sebastian, für den Musikfreitag, den Mettwoch und die entspannte Bürostimmung, durch deine immergute Laune.

Nicolai für einfach alles was du die letzten Jahre für mich gemacht hast.