

BMBF-Rahmenprogramm:“ Technische Anwendung der Selbstorganisation“

Titel des Verbundprojekts: Verwendung von Connexonen in künstlichen Lipidmembranen auf mikrostrukturierten Substraten als Methode, um elektrische Messungen an Zellen durchzuführen

FKZ: 13N9111

Thema des Teilprojekts: „Aufreinigung von Connexonen aus lebenden Zellen und quantitative in-vitro Charakterisierung von „gap junctions“ in polymerunterstützten Membranen“

Antragsteller: Prof. Dr. Motomu Tanaka, Biophysikalische Chemie II, Physikalisch-Chemisches-Institut der Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 253, 69120 Heidelberg, Tel.: 06221 544916, Fax: 06221 544918, e-mail: tanaka@uni-heidelberg.de, <http://www.pci.uni-heidelberg.de/bpc2/>

Ansprechpartner: Prof. Dr. Motomu Tanaka

Inhaltsverzeichnis

I. Kurze Darstellung	1
1. Aufgabenstellung	1
2. Voraussetzung unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	2
3. Planung und Ablauf des Vorhabens	2
4. Wissenschaftlicher und technischer Stand an den das Projekt angeknüpft wurde	3
5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	4
II. Eingehende Darstellung	5
1. Erzielte Ergebnisse	5
1.1. Expression und Reinigung des Zielproteins (Connexin 43) im HeLa Zellsystem	5
1.1.1. Hochskalierung der Zellkultur und Charakterisierung der Membranpräparationen	8
1.2. Physikalische Charakterisierung zwei-Dimensionaler Zellmembransysteme	9
1.3. Herstellung von Membran-Halbleiter Sensoren	11
1.4. Andere Strategie für die Expression und Reinigung des Zielproteins	13
1.5. Reinigung des Zielproteins	13
1.5.1. Reinigung des Zielproteins (Connexin 32) aus nativen Geweben (Leber)	13
1.5.2. Reinigung des Zielproteins (Connexin 43) aus IMR-32 Neuroblastom-Zellen	13
1.6. Probleme der Proteinexpression und Membranpräparation	15
1.7. Neue Strategie für reproduzierbare, kosteneffiziente Expression des Connexin 43 im Dictyostellium discoideum Zellsystem	16
1.7.1. Der Organismus Dictyostellium Discoideum	17
1.7.2. Transformationsstrategie	17
1.7.3. Ergebnis	17
1.7.4. Funktionaler Nachweis von Connexonen in <i>D. discoideum</i>	20
1.7.5. Praktische Probleme des <i>D. dictyostellium</i> Systems	23
1.7.6. Zusammenfassung des <i>D. dictyostellium</i> Systems	24
2. Vorrassichtlicher Nutzen	25
3. Fortschritt im internationalen Vergleich	26
III. Erfolgskontrollbericht	27
1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen des Programms	27
2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis	27
3. Fortschreibung des Verwertungsplans	28
4. Arbeiten die zu keiner Lösung geführt haben	28
5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer	28
6. Einhaltung der Ausgaben und Zeitplanung	28
IV. Projektbezogene Publikationen	30
V. Literaturverzeichnis	31

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Konkretes Ziel dieser Forschungsarbeiten ist die Entwicklung eines hochdurchsatzfähigen, elektrophysiologischen Analyseverfahrens für die Untersuchung von Ionenkanälen in Zellmembranen. Dazu werden Connexone, transmembrane porenbildende Komplexe aus jeweils sechs Connexin-Molekülen, verwendet. Zwei Connexone bilden einen Gap-Junction-Kanal, der die Membranen zweier aneinandergrenzender Zellen durchquert und so in vivo die Cytoplasmen benachbarter Zellen miteinander verbindet. Durch solchermassen gebildete Poren können Moleküle mit einer Größe von bis zu einem Molekulargewicht von 1000 Da diffundieren. Dieses biologische System sollte eingesetzt werden, um screening-fähige Zellen mit einer künstlichen Lipid-Membran zu verbinden um so eine direkte elektrische Ableitung von einem Kollektiv der Zellen zu ermöglichen. Das Hauptziel dieses Projekts ist die Entwicklung von in-vitro "gap junctions", basierend auf membranbeschichteten Oberflächen. Durch den Einbau funktioneller, biologisch steuerbarer Poren ("gap junctions, Connexone") sollte so eine biokompatible Plattform für die modellhafte Adhäsion von Zellen geschaffen werden. Die Steuerung dieser Poren geschieht entweder mit Hilfe von spezifischen Kinasen, die die Connexinmoleküle phosphorylieren (offen) (1), oder durch Zugabe (geschlossen) oder Entfernen (offen) von Ca^{2+} Ionen (2).

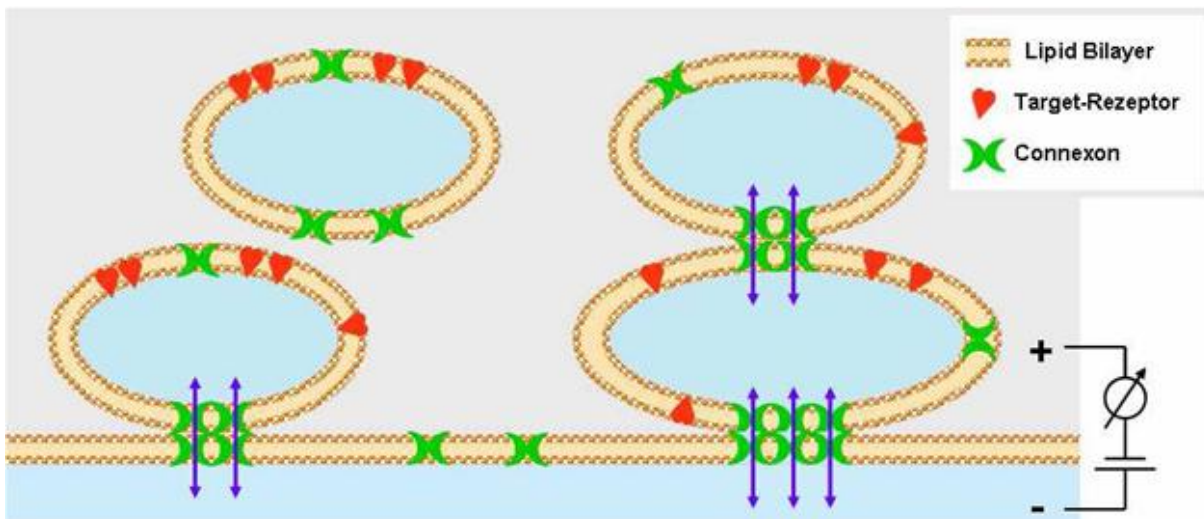


Abb. 1: Schema der elektrischen Kontaktierung von Zellen via aus Connexonen gebildeten Gap Junctions. Eine Lipidmembran trennt elektrisch zwei Kompartimente und wird mit Connexonen dotiert. Es werden dann Connexone (und Targetprotein) exprimierende Zellen einpipettiert, welche durch Gravitation auf die Lipidmembran absinken und sich gegenebenfalls in mehreren Schichten anlagern. Die Connexone in der Lipidmembran und in den Zellen bilden nun durch Selbstorganisation Gap Junctions aus und stellen so den elektrischen Zugang zum Zellinneren her. Diese Konfiguration entspricht topologisch der so genannten „Whole Cell“-Konfiguration des Patch Clamp und ermöglicht die direkte, simultane elektrophysiologische Messung an einem Kollektiv der Zellen.

2. Voraussetzung unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

A.) Die Übertragung von Membranen auf „polymer beschichtete Oberflächen“ wurde speziell in der AG Tanaka als ein neuartiges Konzept („polymer supported membranes“) entwickelt, um harte Oberflächen mit planaren Membranen durch weiche Abstandshalter getrennt von der Festkörperoberfläche zu beschichten. Dies verhindert unspezifische Adsorption und Denaturierung von Proteinen an der Kontaktfläche zu harten Materialien, wie z.B. Halbleitern (3-6).

B.) Präparation und Immobilisation nativer Membranen sind seit langer Zeit Techniken, die in der AG-Tanaka routinemässig durchgeführt werden. (z. B. Ery-Ghostmembranen, Membranen des Sarkoplasmatischen Retikulums, Membranen aus Zellkulturzellen wie HeLa-Zell, 3T3-Zellen etc.)

C.) Von der Arbeitsgruppe Willecke in Bonn wurden uns HeLa-Zelllinien zur Verfügung gestellt, die rekombinant transformiert wurden und zum einen Connexin 43 (Cx43), sowie ein Fusionsprotein bestehend aus Connexin 43 mit eGFP (Cx43-eGFP) exprimierten.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

1. Meilenstein, M12 „Bestandsaufnahme“: Zu diesem Zeitpunkt sollten wir die Zellkulturen der Cx43 exprimierenden Zellen so weit etabliert haben, dass wir in der Lage waren, alle, im Verbund teilnehmenden Gruppen sowohl mit connexinhaltigen Membranen, als auch mit aufgereinigtem Protein zu versorgen.

In dieser Phase gelang es uns die Cx43/Cx43-eGFP exprimierenden Zellen in Kultur zu halten und erste Charakterisierungen durchzuführen. Allerdings erkannten wir hier bereits eine Instabile Expression im HeLa-Zellsystem.

2. Meilenstein, M24 „Proof of Principle“: Zu diesem Zeitpunkt sollten Übertragung von Membranen auf Polymer beschichtete harte Oberflächen erfolgt sein und diese Beschichtung hinsichtlich ihrer Dichtigkeit optimiert werden.

In dieser Phase immobilisierten wir HeLa-Zellmembranen auf unsere polymerbeschichteten Oberflächen.

3. Meilenstein, M36 „Testsysteme im Labormaßstab“ Zu diesem Zeitpunkt sollte die molekularbiologische Optimierung der transmembranen Zielproteine erfolgt sein. Die Oberflächenbeschichtung sollte routinemässig erfolgen, die Connexone sollten elektrochemisch charakterisiert werden und die Zell-Membran Assoziation elektrisch nachgewiesen werden.

In dieser Phase gelangen es uns neue, vielversprechende membranbasierende Biosensoren auf GaAs und GaN herzustellen. Ausserdem gelang es uns Cx43/Cx43-eGFP in den Schleimpilz *Dictiostellium discoideum* zu klonieren.

Die Tabelle 1. Zeitlicher Arbeitsplan für das Teilprojekt.

AP	Jahr	06		2007				2008				2009				
		Quartal		3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3
1.1	Zellkultur (inkl. Upscaling), fraktionierende Membranpräparation															
1.2	Aufreinigung und biochemische Charakterisierung der Connexone															
1.3	Rekonstitution der Connexone in Lipidvesikel															
1.4	Rekonstitution der Connexone in Lipidvesikel															
1.5	molekularbiologische Optimierung der Connexine, biochemische Assays															
2	Entwicklung von Polymerauflagen zur Optimierung der Membranstruktur															
3.1	Etablieren von optischen und elektrochemischen Nachweismethoden															
3.2	Optischer Nachweis / Charakterisierung der Connexone															
3.3	Elektrochemischer Nachweis von in vitro Gap Junctions															
3.4	Hybridisierung mit High Mobility Transistors															
4	Bericht, Publikationen, IP gesichert															

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand an den das Projekt angeknüpft wurde

Künstliche Modelle der Zellmembranen sind schon seit den '50er Jahren ein Dauerthema der biophysikalischen Forschung. Phospholipide organisieren sich in wässrigen Medien spontan zu Doppelschicht-Strukturen, wie Vesikeln. Planare, künstliche Bilayer wurden über Öffnungen in einem Substrat aus Glas oder Polymer ausgebildet, so dass die elektrischen Eigenschaften der Membranen und darin integrierter Membranproteine gemessen werden konnten (z.B Einzelkanal-Messungen). Frei tragende Bilayer sind jedoch mechanisch fragil und damit für industrielle Messzwecke ungeeignet. Deshalb wird daran gearbeitet, Lipid-Bilayer auf Festkörpersubstraten (z.B. Metal, Glass, Halbleiter) zu stabilisieren. Grenzflächenwechselwirkungen zwischen Lipidmembranen und Festkörperober-