

Aus dem
Charité Centrum 2 für Grundlagenmedizin,
Institut für Zell- und Neurobiologie
Direktor: Professor Dr. med. Robert Nitsch

Habilitationsschrift

Transporteigenschaften von mitochondrialen Entkopplerproteinen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach „Biophysik“

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Elena E. Pohl

Eingereicht:	April 2007
Dekan:	Professor Dr. med. M. Paul
Gutachter:	1. Professor Dr. A. Blume 2. Professor Dr. E. Bamberg

Man muss etwas Neues machen, um etwas Neues zu sehen

Georg Christoph Lichtenberg

MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT

МОИМ РОДИТЕЛЯМ С БЛАГОДАРНОСТЬЮ

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	5
I. Einleitung	6
I.1. Entkopplerprotein 1 (UCP1)	7
I.2. Mechanismus der UCP-Aktivierung durch langkettige Fettsäuren	8
I.3. Subfamilie der Entkopplerproteine	11
I.4. Ebene Lipidmembranen als Modell für die Untersuchung von UCP	15
I.4.1. Kurze Beschreibung der bislang verwendeten Systeme	15
I.4.2. Formierung ebener Lipidmembranen nach der Mueller-Methode und Rekonstitution von Fettsäuren	16
I.4.3. Formierung ebener Lipidmembranen aus Proteoliposomen nach der Schindler-Methode	17
I.4.4. Formierung der BLM mit der modifizierten Methode (Beck und Pohl).	17
I.4.5. Gewinnung des Proteins und Herstellung von Proteoliposomen	18
I.4.6. Erfassung verschiedener Membranparameter	18
II. Zielstellung der Arbeit	21
III. Ergebnisse	22
III.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	22
III.2. Änderungen der intrinsischen Membranpotentiale als Folge des Flip-Flops von langkettigen Fettsäuren	24
<i>Pohl, E. E., U. Peterson, Sun, J., Pohl P. (2000). Changes of intrinsic membrane potentials induced by flip-flop of long-chain fatty acids. Biochemistry, 39: 1834 – 1839.</i>	
III.3. Herkunft des Membrandipolpotentials: Beitrag von Fettsäureketten der Phospholipide	25
<i>Peterson U., Mannoek D. A., Lewis R. N. A. H., Pohl P., McElhaney R.N., Pohl E. E. (2002). Origin of membrane dipole potential: contribution of the phospholipid fatty acid chains. Chem. Phys. Lipids, 117: 21-29.</i>	
III.4. Transportkinetik der Entkopplerproteine: Analyse von in ebene Lipidmembranen rekonstituiertem UCP1	26
<i>Urbánková, E., Voltchenko, A., Pohl, P., Jezek, P., Pohl, E.E. Transport kinetics of</i>	

uncoupling proteins: Analysis of planar bilayers reconstituted with UCP1. (2003) J. Biol. Chem., 278: 32497-32500.

III.5. Flip-flop von Hydroxyfettsäuren über die Membran, erfasst mit protonensensitiven Mikroelektroden 27

Pohl E. E., Rupprecht A., Voltchenko A. M. (2008). Flip-flop of hydroxy fatty acids across the membrane as monitored by proton-sensitive microelectrodes. Biochim. Biophys. Acta. 1778(5):1292-7.

III.6. Neues automatisiertes Verfahren für die Rekonstitution von hydrophoben Proteinen in ebene Lipidmembranen. Rekonstitution des rekombinanten Entkopplerproteins 1. 28

Beck, V., Jaburek, M., Jezek, P., Pohl, E. E. A new automated technique for the reconstitution of hydrophobic proteins in planar bilayer membranes. Reconstitution of recombinant uncoupling protein 1(2006). Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics), 1757: 474-479.

III.7. Polyungesättigte Fettsäuren aktivieren die humanen Entkopplerproteine 1 und 2 in ebenen Lipidmembranen. 29

Beck, V., Jaburek, M., Demina, T., Rupprecht, A., Porter R. K., Jezek, P., Pohl, E. E. (2007). Polyunsaturated fatty acids activate human uncoupling proteins 1 and 2 in planar lipid bilayers. FASEB, 21: 1137-1144.

IV. Diskussion	30
V. Schlussfolgerungen und Ausblick	33
VI. Zusammenfassung	36
VII. Literatur	37
VIII. Danksagung	43
IX. Eidesstattliche Erklärung	45

Verzeichnis der Abkürzungen

Abkürzungen

BLM	Ebene Bilipidmembran
UCP	Entkopplerprotein, <i>uncoupling protein</i>
haUCP1	Entkopplerprotein 1, isoliert aus dem braunen Fettgewebe des Hamsters
hUCP1	humanes rekombinantes Entkopplerprotein 1
mUCP1	murines rekombinantes Entkopplerprotein 1
hUCP2	humanes rekombinantes Entkopplerprotein 2
FS	Fettsäure
FS _H	protonierte Form einer Fettsäure
FS ⁻	Anionform einer Fettsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokase
PIC	Phosphat-Transporter
AGC	Aspartat/Glutamat-Transporter
PUMP	pflanzliches Entkopplerprotein (plant UCP)
BMCP1	<i>brain mitochondrial carrier protein 1</i>
PN	Purinnukleotide
DPhPC	Diphytanoylphosphatidylcholin
PTFE	Polytetrafluorethylen
USL	ungerührte Schicht
IFC	Methode der Kompensation des intramembranen Feldes (<i>Inramembrane Field Compensation</i>)

I. Einleitung.

Entkopplerproteine (*uncoupling proteins*, UCPs) sind kernkodierte Transporter, die die Kopplung der mitochondrialen Respiration zur ATP-Synthese aufheben (Abb. 1.1), was zu ihrer Namensgebung geführt hat. Die Proteinsubfamilie gehört der großen Familie der mitochondrialen Aniontransporter an und schließt inzwischen mehrere Proteine ein, die in den letzten zehn Jahren entdeckt wurden (UCP1, UCP2, UCP3, UCP4, UCP5, PUMP, etc.). Sie sind in der inneren Membran von Mitochondrien verschiedener Gewebe lokalisiert.

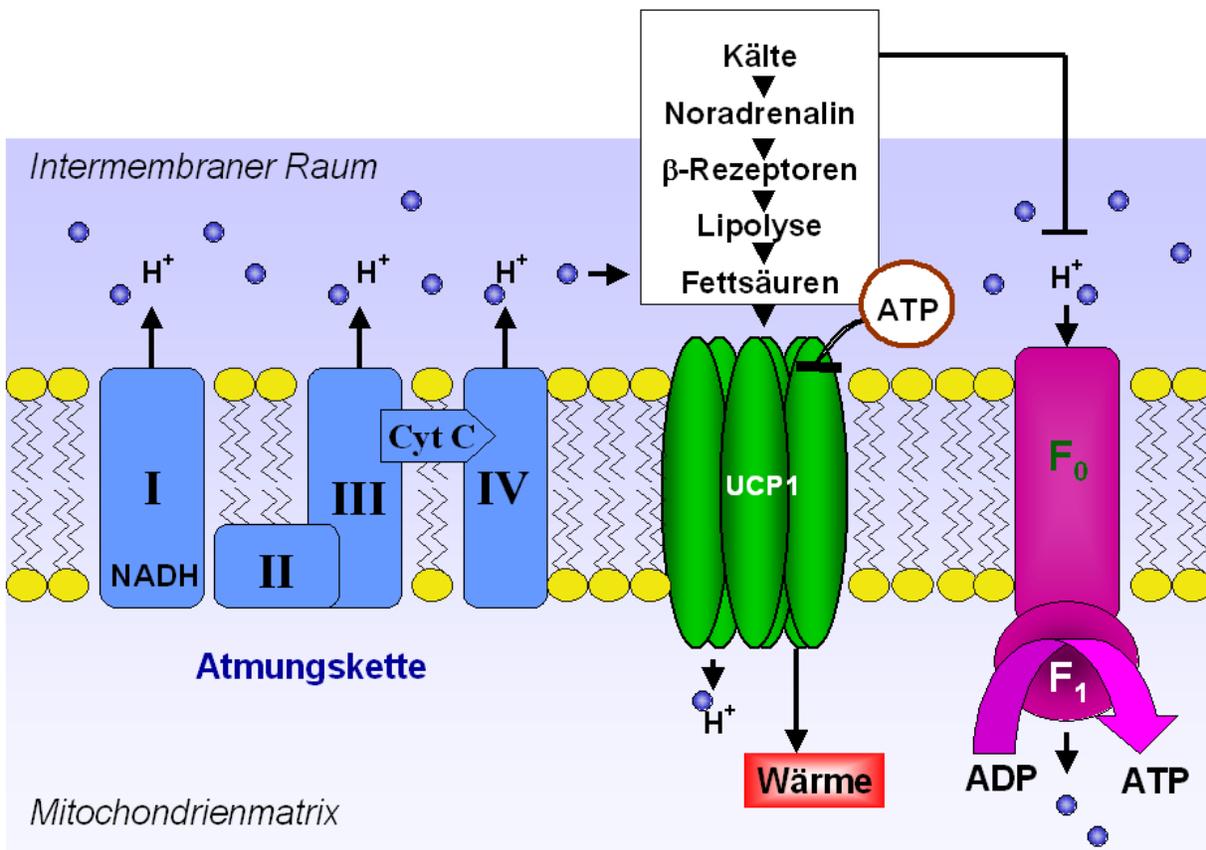


Abbildung 1.1. Lokalisation, Funktion und Regulierung der UCP1.

Die Primärstruktur der Entkopplerproteine (Abb. 1.2) weist drei sich wiederholende homologe Regionen von ca. 100 Aminosäuren auf, welche jeweils zwei α -helikale hydrophobe Transmembrandomänen enthalten (Klingenberg and Huang, 1999). Letztere sind durch eine ca. 40 Aminosäuren lange hydrophile Matrixschleife miteinander verbunden. N- und C-Termini ragen in den Intermembranraum. Jede Matrixschleife enthält das kon-

servierte Motiv mitochondrialer Anionentransporter, das eine Zuordnung zu dieser Proteinfamilie erlaubt (Palmieri, 2004). Eine dreidimensionale Struktur ist derzeit für kein Protein der Subfamilie vorhanden. Basierend auf der hohen Homologie des UCP4 zum Adenin-Nukleotid-Transporter (ANT), dessen Röntgen-Struktur bekannt ist (Pebay-Peyroula et al., 2003), wurde vor kurzem ein dreidimensionales molekulares Modell für UCP4 (Abb. 1.3) vorgeschlagen (Liu et al., 2006).

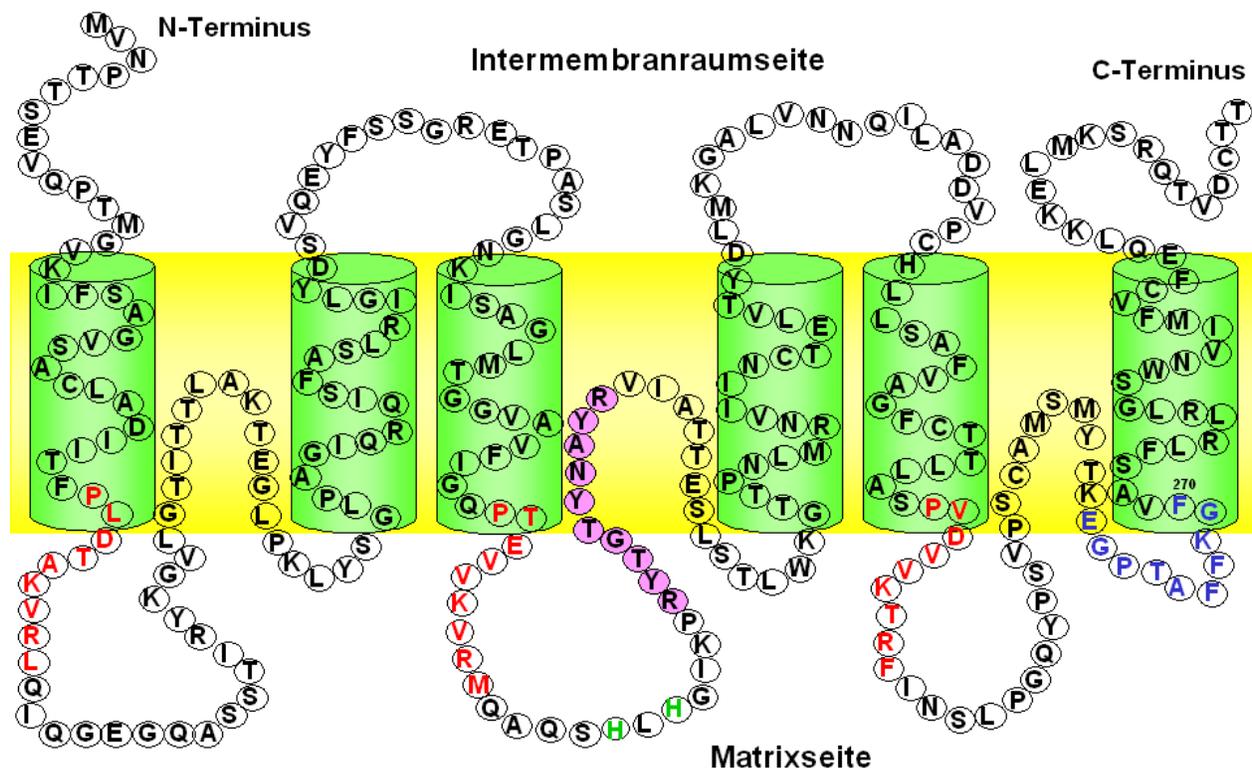


Abbildung 1.2. Primärstruktur des murinen UCP1. Die konservierten Motive der mitochondrialen Anionentransporter sind rot, die Nukleotidbindestelle blau und die hypothetische FS-Bindestelle lila markiert. Die sechs Transmembranhelices sind mit grünen Zylindern unterlegt. In Gelb ist die Lipidmembran dargestellt.

I.1 Entkopplerprotein 1 (UCP1).

Erstes und am besten untersuchtes Mitglied der UCP-Familie ist Mitte der siebziger Jahre in Mitochondrien des braunen Fettgewebes entdecktes UCP1, früher auch *Thermogenin* genannt (Ricquier and Kader, 1976; Heaton et al., 1978). Braunes Fettgewebe ist die Hauptquelle der „zitterfreien“ Thermogenese in Neugeborenen und in den Tieren, die einen Winterschlaf halten oder der Kälte ausgesetzt sind (Nicholls and Rial, 1999). Da-

bei führt die β -adrenerge Stimulierung zur raschen Hydrolyse der Triglyceride in den Adipozyten des braunen Fettgewebes. Die freigesetzten Fettsäuren aktivieren UCP1, was zu einer Wärmeproduktion führt (Abb. 1.1).

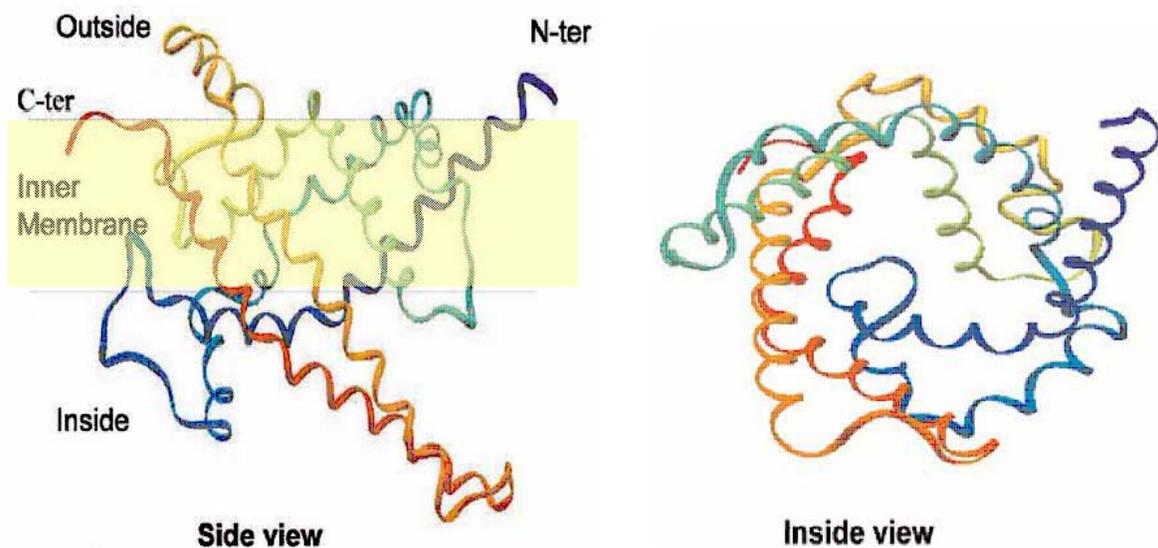


Abbildung 1.3. Molekulares Model der dreidimensionalen Struktur des UCP4 (modifiziert aus Liu et al., 2006).

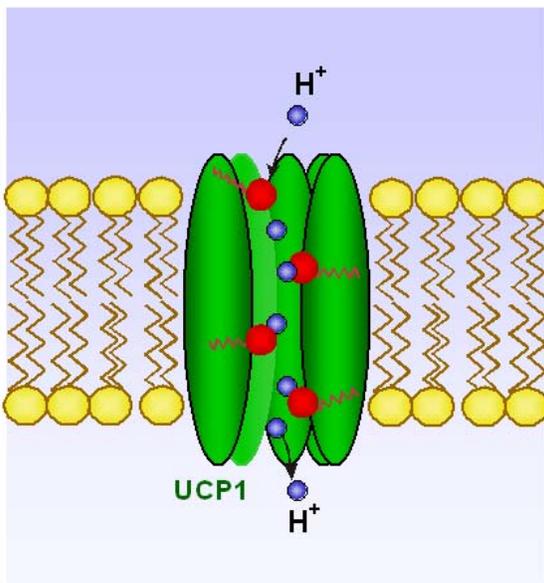
Es ist allgemein anerkannt, dass der Protonentransport ein zentrales Ereignis in der Aktivität von Entkopplerprotein 1 darstellt (Nicholls and Rial, 1999). UCP1 ist der einfachste der bekannten Protonentransporter, weil es keine komplizierte ATP-Abhängigkeit zeigt und weder einen Cotransport von Substrat und Proton, noch einen Protonen-Natrium- bzw. Protonen-Kalzium-Antiport ausführt. Der Protonentransport wird allein durch das Membranpotential gesteuert.

I. 2. Mechanismus der UCP-Aktivierung durch langkettige Fettsäuren.

Als Cofaktoren für den UCP1-vermittelten H^+ -Transport werden von den meisten Forschergruppen langkettige Fettsäuren (FS) akzeptiert (Garlid et al., 2000). Allerdings widerspricht die vor kurzem gezeigte Fettsäureunabhängigkeit des Protonentransports, bei unveränderter Regulation durch Retinoide (Rial and Gonzalez-Barroso, 2001), diesen Ergebnissen (Jaburek et al., 1999; Echtay et al., 2001; Zackova and Jezek, 2002). Die Rolle, die die FS im Transportprozess spielen, ist auch umstritten. Zur Zeit existieren diesbezüglich zwei einander widersprechende Hypothesen (Abb. 1.4):

Fatty acid buffering

Klingenberg et al.



Fatty acid cycling

Skulachev, Garlid, Jezek et al.

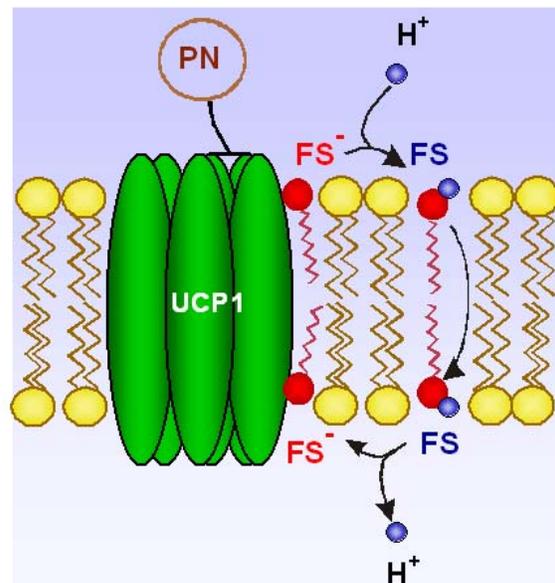


Abbildung 1.4. Die Rolle von Fettsäuren im UCP-vermittelten Protonentransport. FS – protonierte Fettsäure, FS^- - Fettsäureanion, UCP1 – Entkopplerprotein 1 (uncoupling protein 1), PN - Purinnukleotide.

(I) "Fatty acid cycling"- Hypothese.

Die Hypothese wurde von Skulachev 1991 vorgeschlagen (Skulachev, 1991) und hat durch Jezek, Garlid et al. experimentelle Unterstützung erfahren (Garlid et al., 1996). Es wird angenommen, dass UCP1 den unidirektionalen Transport von Fettsäureanionen

vermittelt (Abb. 1.4). Das führt automatisch zur Entkopplung, da die protonierte FS durch einen Flip-Flop Mechanismus (Kamp and Hamilton, 1992) zurückkehrt. Dabei wird jeweils ein Proton transportiert. Es wird davon ausgegangen, dass UCP1 selbst keine Protonen leitet.

Garlid, Jezek et al. haben sowohl an Mitochondrien als auch an Proteoliposomen demonstriert, dass langkettige Alkylsulfonate den UCP1-vermittelten H^+ -Transport nicht aktivieren (Jezek et al., 1994), da sie als starke Säuren einen niedrigen pK-Wert haben und daher nicht spontan durch die Membran diffundieren können. Allerdings werden auch Alkylsulfonate bei hohen Konzentrationen durch UCP1 transportiert und inhibieren kompetitiv den FS-induzierten H^+ -Transport. Diese Experimente sind auch deshalb von geringer Beweiskraft für die Unterstützung von Skulachev-Modell, da eine Komplexbildung zwischen Fettsäureanionen und Valinomycin, das für die Generierung des Transmembranpotentials verwendet wird, sehr wahrscheinlich ist (Klingenberg and Huang, 1999). Erst Experimente an ionophorfreien Systemen werden die Kritik ausräumen können.

Parallelen zwischen der Fähigkeit verschiedener FS-Derivate zum Flip-Flop über die Membran und zur Aktivierung des UCP-vermittelten H^+ -Transports wurden zugunsten der Theorie von Skulachev ausgelegt (Jezek et al., 1997). In Anwesenheit „inaktiver“, d. h. nicht zum Flip-Flop fähiger Fettsäuren (z. B. 12-Hydroxylaurilsäure), wurde eine Reduzierung des Protonentransportes beobachtet. Allerdings sind diese Ergebnisse umstritten, da eine andere Forschergruppe einen, durch „inaktive“ Fettsäuren getriggerten, Protonentransport registrieren konnte (Klingenberg and Huang, 1999).

(II) „Fatty acid buffering“-Hypothese.

Die von Klingenberg et al. (Klingenberg and Huang, 1999) vorgeschlagene Hypothese sieht vor, dass der Protonentransport nach dem Mechanismus der Grotthuss-Leitfähigkeit erfolgt (Abb. 1.4). Langkettige FS, die an UCP binden aber nicht durch UCP transportiert werden, ermöglichen, zusammen mit UCP-eigenen Aminosäuren (Aspartat, Glutamat), die schnelle Protonenleitung, indem sie ihre Karboxylgruppen als Akzeptor/Donor zur Verfügung stellen. Die letzten Donorgruppen, die Protonen in das Cytosol weiterleiten, stammen vom Histidin. Experimente mit Punktmutanten zeigten, dass nur

zwei Histidinreste His¹⁴⁵ und His¹⁴⁷ (Abb. 1.2) von Bedeutung für den UCP1 vermittelten H⁺-Transport sind (Bienengraeber et al., 1998). Dieses Modell stimmt mit dem Strukturmodell des Proteins gut überein, da die drei vorhandenen Aminosäureschleifen den „Protonenpfad“ gewährleisten können (Klingenberg and Huang, 1999). Die Transportaktivierung durch FS-Derivate wie z.B. ω -Glucopyranoside-Palmitat, die die Membran nicht passieren können, spricht ebenfalls für diesen Mechanismus (Klingenberg and Huang, 1999). Allerdings kann diese Hypothese den Transport von Alkylsulfonaten und anderen monovalenten Ionen durch UCP nicht erklären. Darüber hinaus ist die Histidinbeteiligung an der Protonenleitung in UCP1 umstritten, da derartige Aminosäurereste in entsprechenden Positionen in UCP2, UCP3 und PUMP fehlen, obwohl ein FS-abhängiger Protonentransport beobachtet werden konnte (Garlid et al., 1998).

I.3. Subfamilie der Entkopplerproteine.

Protein	Homologie zu UCP1	Entdeckung	Lokalisierung
UCP 1	---	Ricquier & Kader, 1976 Heaton et al. , 1978	Braunes Fettgewebe der Neugeborenen und winterschlafhaltenden Tieren
UCP2	59%	Fleury et al. 1997	Gehirn, Rückenmark, Magen, Lunge, Milz, Darm, Makrophagen, weißes Fettgewebe
UCP3	57%	Boss et al. 1997	Skelettmuskel, Herz
UCP4	30%	Mao et al. 1999 Yu et al. 2000	Gehirn
UCP5 (BMCP)	30%	Sanchis et al., 1998	Gehirn, Hoden, Leber
PUMP	---	Laloi et al., 1997	Pflanzliche Mitochondrien
Fisch UCP (UCP2)	60%	Stuart et al., 1999	Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>), Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)

Tabl. 1. Subfamilie der Entkopplerproteine.

Seit 1997 wurden mehrere mitochondriale Proteine (UCP2, UCP3, UCP4, BMCP, PUMP) beschrieben, die eine hohe Homologie zu UCP1 aufweisen (Tabelle 1, Abb. 1.5, Abb. 1. 6). Im Kontrast zu UCP1, das sich nur im braunen Fettgewebe befindet, wurde z. B. UCP2 in verschiedenen Organen, unter anderem auch im Gehirn nachgewiesen (Fleury et al., 1997). Obwohl die Fähigkeit von UCP2 zum Protonentransport in Liposomen gezeigt wurde (Jaburek et al., 1999; Echtay et al., 2001; Zackova and Jezek, 2002), mehren sich die Zweifel an einer dem UCP1 ähnlichen Rolle in der Thermogenese. Überraschend wurde eine Beteiligung von UCP2 an Diabetes (Chan et al., 2001; Lameloise et al., 2001; Zhang et al., 2001; Chan, 2002) und Apoptose (Baffy et al., 2002) nachgewiesen.

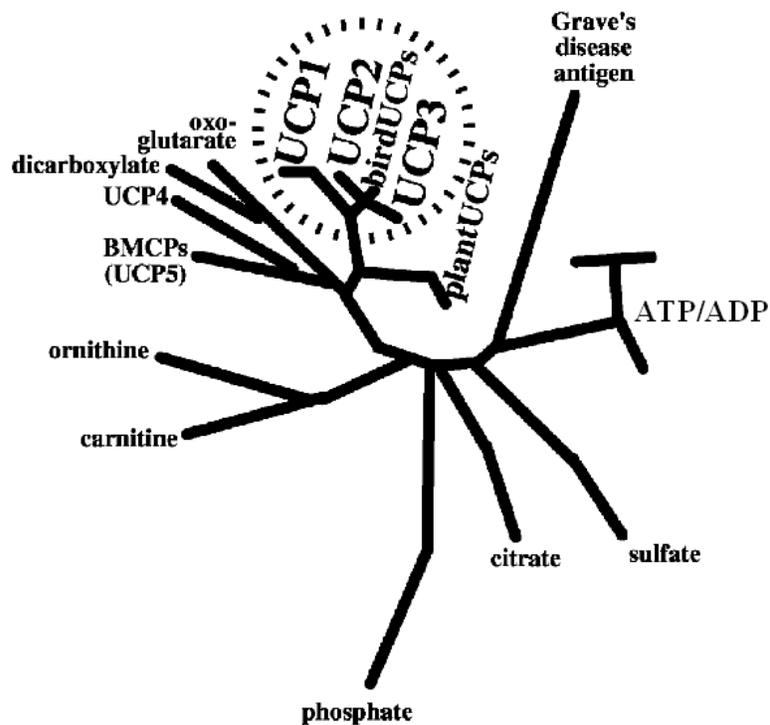


Abbildung 1.5. Position der Entkoppler-Proteine in der mitochondrialen Aniontransporterfamilie (aus Nedergaard & Cannon, 2003).

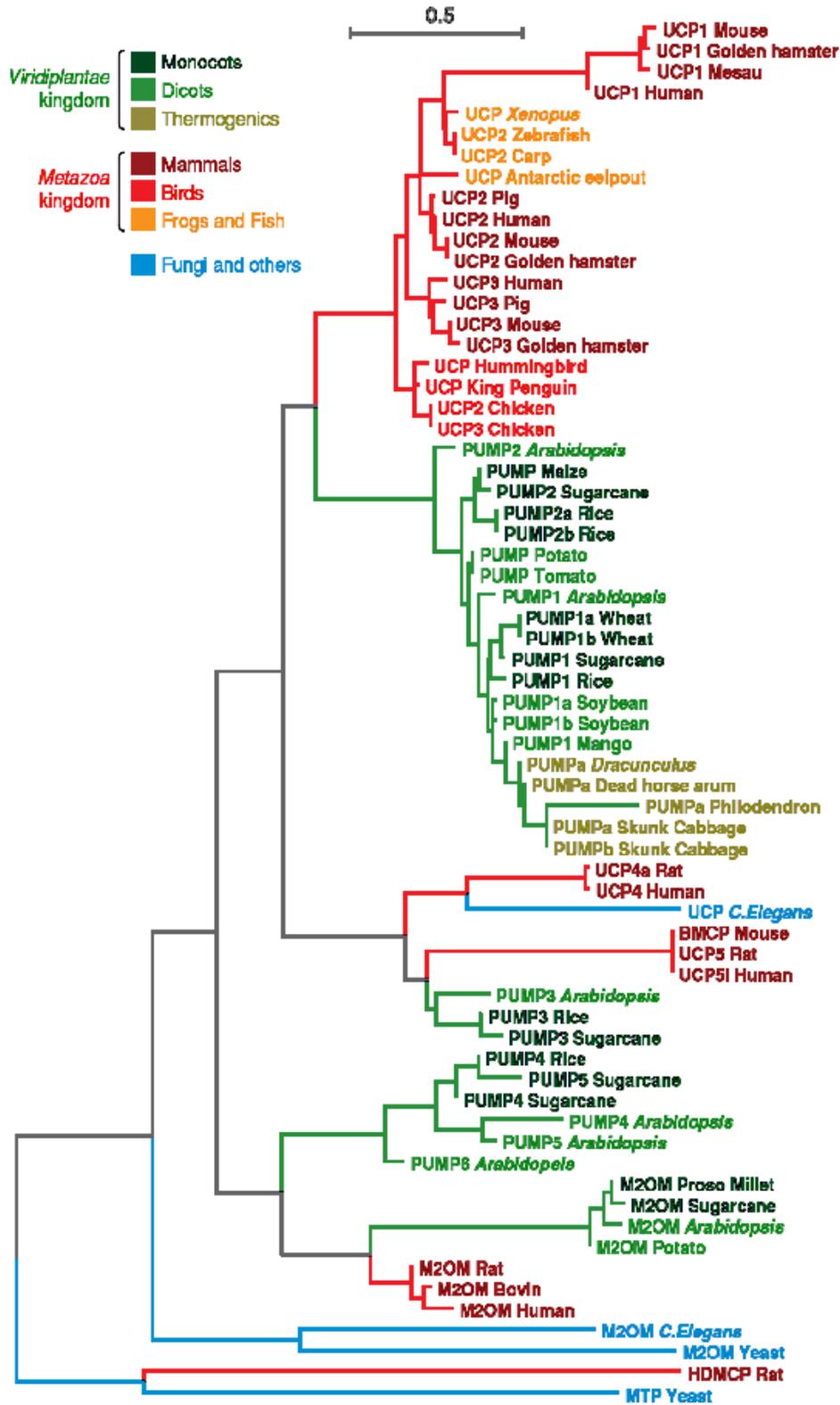


Abbildung 1.6. Phylogenetischer Baum der UCP - Subfamilie (aus Vercesi et al., 2006).

Es gibt Hinweise, dass eine UCP2-Überproduktion in einem Zusammenhang mit lipid-vermitteltem oxidativen Stress steht (Pecqueur et al., 2001). Eine Reihe von Arbeiten verbindet UCP2 mit Adipositas (Esterbauer et al., 2001), einer direkten Stimulation von β 2-adrenergischen Rezeptoren (Nagase et al., 2001) und der Regulierung des Herzstoffwechsels (Noma et al., 2001). UCP2 ist auch in Neuronen der subkortikalen Gehirnregion gesunder Probanden vorhanden (Andrews et al., 2005). Im Gehirn wurde seine protektive Rolle sowohl bei Gehirnläsionen als auch bei Erhöhung der Alkohol- und Schmerztoleranzgrenze demonstriert (Horvath et al., 2002; Bechmann et al., 2002).

Die erstaunliche Beteiligung von UCP2 an verschiedenen Prozessen in unterschiedlichen Organen hat bisher keine Erklärung auf molekularem Niveau gefunden (Nedergaard and Cannon, 2003). Es existieren Meinungsunterschiede sowohl in Bezug auf die transportierten Ionen bzw. Moleküle als auch auf die, für den Transport erforderlichen Cofaktoren, wie z. B. in Hinblick auf die stimulierende Rolle von Coenzym-Q (Echtay et al., 2001; Zackova and Jezek, 2002) und von Superoxiden (Echtay et al., 2002). Die Demonstration des UCP2-vermittelten Protonentransports (Jaburek et al., 1999) ist umstritten, da der beobachtete H^+ -Transport das Ergebnis der Diffusion des FS-Valinomycin- K^+ -Komplexes sein könnte, die durch den K^+ -Gradienten induziert wurde (Klingenberg and Echtay, 2001). Ebenso ist unklar, ob (analog zu UCP1) langkettige Fettsäuren als Cofaktoren für den H^+ -Transport notwendig sind. Die fehlende Abhängigkeit des Protonentransports von Fettsäuren bei unveränderter Regulation durch Retinoide (Rial and Gonzalez-Barroso, 2001) widerspricht den Ergebnissen anderer Gruppen (Jaburek et al., 1999; Echtay et al., 2001; Zackova and Jezek, 2002). Die eindeutige Klärung dieser Frage würde mögliche Unterschiede im Transportmechanismus zwischen UCP2 und UCP1 aufdecken. Die Anwesenheit von UCP2 in Geweben unterschiedlicher Genese wirft die Frage auf, ob sich seine Transportfunktion auf Membranniveau entsprechend seiner Funktion auf dem Organniveau ändert.

I.4. Ebene Lipidmembranen als Modell für die Untersuchung von UCP.

I.4.1. Kurze Beschreibung der bislang verwendeten Systeme.

Die in der Einleitung beschriebenen widersprüchlichen Ergebnisse könnten ihre Wurzeln in der Komplexität der Untersuchungssysteme haben, in denen die Transportfunktion der Entkopplerproteine unter unphysiologischen Bedingungen erforscht wird. So werden isolierte Mitochondrien im Experiment meistens einem osmotischen Schock in Anwesenheit verschiedener Salze oder eines Kaliumgradienten ausgesetzt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass ungesättigte Fettsäuren als Kalium/Proton-Antiporter selbst in Abwesenheit von UCP1 fungieren können. Ein wesentlicher Nachteil der Experimente an Liposomen ist, dass der Flip-Flop von FS nicht direkt gemessen werden kann, d.h. es werden Indikator-moleküle (z. B. Pyranin) sowie fluoreszenzmarkierte oder an Protein gebundene FS verwendet. Das führt zwingend zur Notwendigkeit, zusätzliche, z.B. proteinrelevante Parameter zu berücksichtigen. Ferner kann auch ein transmembranes Potential nur mit Hilfe von Ionophoren (z. B. Valinomycin) appliziert werden, womit elektrostatische Wechselwirkungen mit FS bis hin zur Komplexbildung wahrscheinlich werden. Eine weitere Limitierung für das Liposomenmodell ist auch die Tatsache, dass man mit dem Kaliumgradienten das Potential nur auf maximal 180 mV erhöhen kann.

Die Untersuchungen des Fettsäuretransports und der UCP-Transporteigenschaften wurden in der vorliegenden Arbeit am überschaubaren Modell ebener Lipidmembranen durchgeführt. Je nach experimentellem Ziel wurden in den vorgestellten Arbeiten verschiedene Modellmembranen verwendet. Sie werden generell in zwei Gruppen, lösungsmittelhaltige und lösungsmittelfreie Membranen, eingeteilt. Die *n-Decan*-haltigen Membranen (Mueller et al., 1963) wurden für die Untersuchung des Transports langkettiger Fettsäuren (s. Kapitel III.2), sowie des Effekts der FS auf das Membrandipolpotential verwendet (s. Kapitel III.3). Für die Experimente mit rekonstituierten Proteinen (s. Kapitel III.4-III.7) wurden lösungsmittelfreie Membranen verwendet (s. Kapitel I.4.4). Ihr Nachteil ist eine im Vergleich zu Mueller-Membranen (s. Kapitel I.4.2) niedrigere Stabilität.

I.4.2. Formierung ebener Lipidmembranen nach der Mueller-Methode und Rekonstitution von Fettsäuren.

Für die Formierung ebener Lipidmembranen nach der Mueller-Methode (Mueller et al., 1963) wurde kommerziell erhältliches Lipid in einer Konzentration von ein bis zwei Prozent in *n-Decan* gelöst. Aus dieser Lösung ließ sich mit Hilfe einer Pipette ein Fettfilm über ein kreisförmiges Loch in einer Wand aus Polytetrafluorethylen (PTFE) spannen, die zwei wässrige Phasen einer PTFE-Kammer voneinander trennte. Unter Wirkung der Oberflächenspannung und der Schwerkraft verringerte sich die Dicke dieses Films spontan. Die Ausbildung der Bilipidmembran (BLM) konnte mit Hilfe eines Auflichtmikroskops oder elektrisch, durch Bestimmung der Membrankapazität, überprüft werden. Der Durchmesser der Membranen variierte von 0,4 bis 1,5 mm (Abb. 1.7, A).

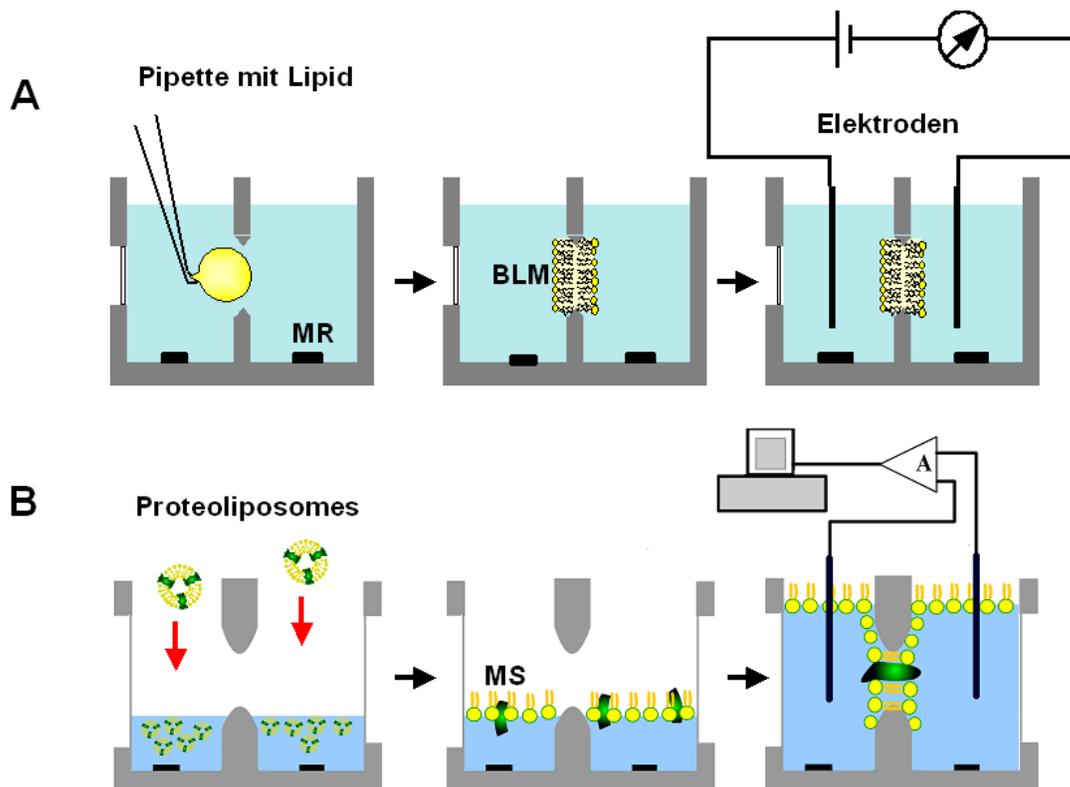


Abbildung 1.7. Formierung der ebenen Bilipidmembranen nach Mueller et al. (A) und nach Schindler et al. (B). MR-Magnetrührer, BLM-Lipidmembran, MS-proteinhaltige Lipidmonoschicht, Protein ist grün dargestellt.

I.4.3. Formierung ebener Lipidmembranen aus Proteoliposomen nach der Schindler-Methode.

Ebene Bilipidmembranen wurden nach der Schindler-Methode ((Schindler, 1980;Schindler, 1989), Abb. 1.7, B) aus Proteoliposomen hergestellt (s. Kapitel 1.4.5). Dabei wird ausgenutzt, dass sich auf der Oberfläche jeder Vesikelsuspension eine Lipid/Protein Monoschicht ausbildet (Pattus et al., 1978;Schindler, 1979). Durch das Heben der Flüssigkeitspiegel zweier derartiger Suspensionen bildet sich in der Öffnung des sie trennenden Septums spontan eine ebene Membran. Die Anwendung dieser Methode erlaubt es, den Transport von Ionen ohne die Zugabe zusätzlicher Indikator- oder Ionophormoleküle (Valinomycin etc.) zu untersuchen. Die Schindler-Technik erlaubt es, im Vergleich zur Fusionstechnik einen viel höheren Proteingehalt in der Membran zu erzielen, was für die Untersuchung von Transporterproteinen mit einer niedrigen Transportrate von ausschlaggebender Bedeutung ist. Bei der Fusionstechnik, die in unseren Arbeiten nicht zur Anwendung kommt, erfolgt die Inkorporation von Proteinen durch die Fusion von Proteoliposomen mit einer bereits bestehenden Lipiddoppelschicht.

I.4.4. Formierung der BLM mit der modifizierten Methode (Beck und Pohl).

Vor kurzem haben wir die Schindler-Methode modifiziert, um die Stabilität der Membranen zu erhöhen (Patent: USA Nr. 11/101,550). Die ausführliche Beschreibung des neuen Verfahrens ist im Kapitel III.6 enthalten. Durch die Automatisierung der Methode wurde der Zeitaufwand für die Proteinrekonstitution und die notwendige Proteinmenge wesentlich reduziert. Sowohl die Untersuchung von einzelnen Kanälen, als auch der Einbau einer Vielzahl von Proteinkopien ($\sim 10^7$) ist möglich. Ungeachtet des vergleichsweise großen Membrandurchmessers (bis zu 300 μm), ist die Membran auch bei Transmembranpotentialen von bis zu 300 mV noch stabil. Diese Eigenschaft ist besonders wichtig für die elektrophysiologische Charakterisierung von mitochondrialen Proteinen, da sie unter physiologischen Bedingungen bei Potentialen von ca. 120-220 mV funktionieren (Kaim and Dimroth, 1999).

I.4.5. Gewinnung des Proteins und Herstellung von Proteoliposomen.

Die Untersuchungen von rekonstituiertem UCP verlangen die Reinigung von mehreren mg Protein. UCP1 wurde aus den Mitochondrien des braunen Hamsterfettgewebes isoliert (haUcP1) oder rekombinant hergestellt (humanes UCP1, hUCP1). Da UCP2 in nur geringen Mengen in den verschiedensten Geweben vorhanden ist, wurde nur rekombinant hergestelltes Protein verwendet. Es wurde entweder in Hefe oder in *E.coli* überexprimiert und anschließend isoliert und gereinigt. Die exakte Prozedur ist veröffentlicht (Zackova and Jezek, 2002; Beck et al., 2006). Die isolierten UCP1/UCP2-Detergenz-Mizellen wurden mit Lipid-Detergenz-Mizellen gemischt. Zur Herstellung von Proteoliposomen trennt man das Detergenz mit Hilfe einer Säule, die Bio-Beads enthält, ab. Der Proteingehalt von Proteoliposomen wurde mit der Amidoblack-Methode bestimmt.

I.4.6. Erfassung verschiedener Membranparameter.

A. Messung der Grenzflächenpotentialdifferenz (IFC-Methode)

Der Nachweis des Flip-Flops von Fettsäuren erfolgte durch die Messung des Grenzflächenpotentials, Φ_b , zwischen beiden Monoschichten. Φ_b setzt sich aus dem Oberflächen- (Φ_s) und dem Dipolpotential (Φ_d) zusammen (Abb. 1.8). Das Verfahren nutzt die Abhängigkeit der Membrankapazität vom angelegten Potential aus. Ist das Grenzflächenpotential auf beiden Seiten der Membran unterschiedlich, entsteht eine zur angelegten sinusförmigen Wechselfeldspannung harmonische Oberwelle (s. Abb.1, Kapitel III.2). Diese verschwindet wieder, wenn an die Membran eine dem Grenzflächenpotential im Betrag gleiche aber im Vorzeichen entgegengesetzte Spannung angelegt wird. Somit ist die benötigte Gleichspannung ein Maß für die transmembrane Differenz des Grenzflächenpotentials (Sokolov and Kuzmin, 1980; Sokolov et al., 1990; Ermakov et al., 2001; Pohl, 2002).

Bei „aktiven“ FS ist $\Delta\Phi_b=0$, da ein spontaner Flip-Flop sehr schnell stattfindet. Eine asymmetrische Verteilung „aktiver“ FS und eine daran gekoppelte Grenzflächenpotentialdifferenz kann nur unter den Bedingungen eines transmembranen pH-Gradienten ge-

messen werden, weil dieser dem Flip-Flop entgegenwirkt. Die Anwendung dieser Methode erlaubt den Transport von Fettsäuren zu untersuchen, ohne dass die Zugabe zusätzlicher Indikator- oder Ionophormoleküle (Pyranin, Valinomycin etc.) erforderlich ist.

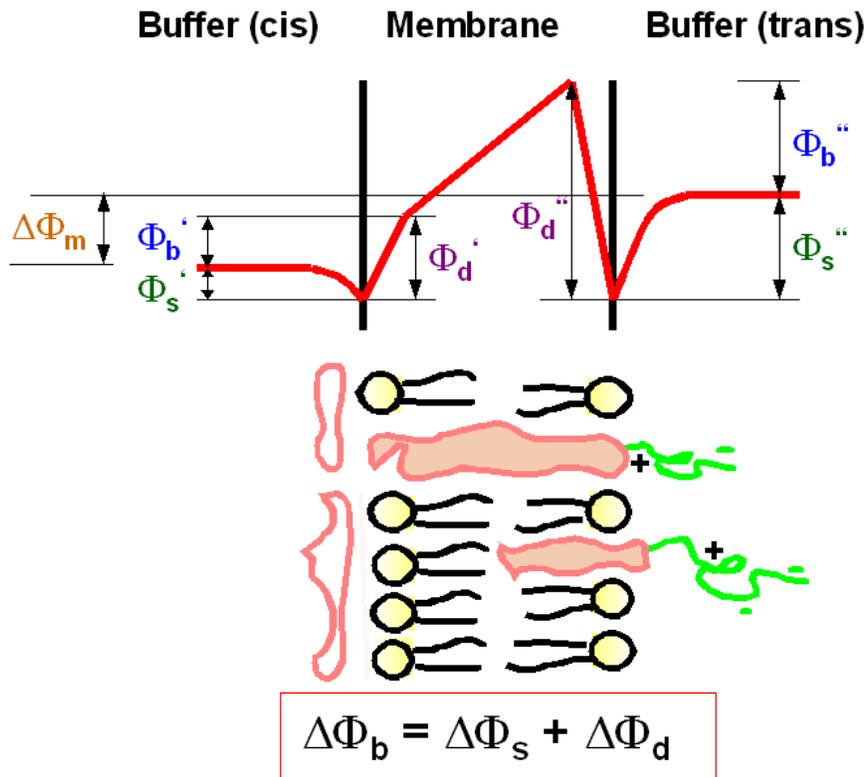


Abbildung 1.8. Potentialprofil einer Lipidmembran. $\Delta\Phi_b$ - Grenzflächenpotential, $\Delta\Phi_m$ - Transmembranpotential, $\Delta\Phi_s$ - Oberflächenpotential, $\Delta\Phi_d$ - Dipolpotential.

B. Messung des H^+ -Transports mit protonensensitiven Mikroelektroden.

Zur Messung des elektroneutralen Transports durch ebene Lipidmembranen wird die Mikroelektrodenteknik eingesetzt (Antonenko et al., 1993; Pohl et al., 1993). Die H^+ -Konzentration wird als Potentialdifferenz zwischen der Referenzelektrode und der Mikroelektrode erfasst, die beide mit einem Elektrometer verbunden sind. Mit Hilfe eines GPIB - Interfaces werden die Daten zu einem Computer geleitet und gespeichert. Eine ausführliche Beschreibung der Methode ist im Kapitel III.5 gegeben. Aus den in unmittelbarer Membrannähe gemessenen pH-Profilen ist der Protonenfluss ableitbar.

C. Messung des Dipolpotentials mit der Methode der Ladungsrelaxation.

Die Potentialverteilung im Inneren der Membran kann aus der Kinetik des Transmembrantransports hydrophober Ionen abgeleitet werden (Benz and Läuger, 1976; Benz and Gisin, 1978). Der Verteilungskoeffizient dieser Ionen ist eine Funktion der Potentialdifferenz zwischen Membranoberfläche und angrenzendem Medium (Andersen and Fuchs, 1975; Andersen et al., 1978). Änderungen des Grenzflächenpotentials wirken sich somit zwangsläufig auf ihre Transportgeschwindigkeit aus. Diese wiederum ist als Änderung von Relaxationszeit und Stromamplitude nach Anlegen einer Spannungstreppe sichtbar. Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit der parallelen Aufzeichnung der Oberflächen- und Dipolpotentiale. Die zu untersuchende Substanz wird auf beiden Membranseiten zugegeben.

D. Registrierung der integralen Membranleitfähigkeit.

Die Leitfähigkeit der ebenen Membran mit rekonstituiertem UCP wird über zwei Elektroden, die sich links und rechts der Membran befinden, mit Hilfe eines Strom-Spannungswandlers unter den Bedingungen einer Spannungsklemme gemessen (s. Abb.1, Kapitel III. 5).

II. Zielstellung der Arbeit.

Während das UCP1 der Säugetiere der zitterfreien Wärmebildung im braunen Fettgewebe dient, ist eine thermoregulative Funktion für die anderen Mitglieder der Entkopplerprotein-Familie eher unwahrscheinlich. Einer der aktuellsten Hypothesen zufolge regulieren diese die Konzentration der mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). ROS stellen die Hauptursache für oxidative Zellschädigungen dar und werden als wichtiger Faktor in der Pathogenese vieler Krankheiten (z. B. von neurodegenerativen Krankheiten und Ischämie) diskutiert. Mangelnde Kenntnis des Transportmechanismus und der Regulation verschiedener Entkopplerproteinen macht derzeit ein rationales Drug – Design unmöglich und versperrt somit den Weg für klinische Anwendungen.

Die vorliegende Arbeit hat folgende Zielstellung:

- Mit dem funktionellen Einbau von UCPs in ebene Bilipidmembranen wird ein Modellsystem geschaffen, das es erlaubt, den UCP-vermittelten Entkopplungsmechanismus eindeutig zu klären.
- In einem kaliumgradientfreien System wird die Notwendigkeit langkettiger Fettsäuren für den UCP-vermittelten Protonentransport nachgewiesen.
- Die Flip-Flop-Rate protonierter Fettsäuren über ebene Lipidmembranen wird bestimmt. Es wird geprüft, ob Hydroxyfettsäuren als Tool für die Unterscheidung zwischen den zwei UCP-Transporthypothesen (s. Kapitel 1.2) eingesetzt werden können.
- Der UCP2-induzierte Protonentransport wird nachgewiesen. Damit wird belegt, dass das Protein die molekularen Voraussetzungen für eine Beteiligung an der Thermogenese oder an der „milden“ Entkopplung aufweist. Unterschiede im Transportmechanismus zu UCP1 werden aufgezeigt oder widerlegt. Es soll geklärt werden, welche Ionen außer Protonen bzw. Fettsäureanionen durch UCP2 transportiert werden können.
- Die Transporteigenschaften von Proteinen unterschiedlicher Herkunft (native und rekombinante) werden untereinander verglichen.

III. Ergebnisse

III.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Kapitel III dient hauptsächlich der Darstellung der an Modellmembranen erzielten Ergebnisse. Vorangegangene Untersuchungen des Transports (Flip-Flop) langkettiger FS über vesikuläre Modellmembranen haben eine Verringerung der Transportrate mit wachsendem Krümmungsradius ergeben. Im Hinblick auf die vergleichsweise geringen Krümmungsradien von Plasmamembranen waren daher die Experimente an ebenen Membranen (Pohl et al., 2000), s. Kapitel III. 1) von großem Interesse. Der Flip-Flop der neutralen FS-Form wurde durch einen transmembranen pH-Gradienten induziert. Im Ergebnis entstand eine Oberflächenpotentialdifferenz zwischen beiden Lipidmonoschichten. Letztere wurde mit der Methode der Kompensation des intramembranen Feldes (IFC) gemessen (Pohl et al., 1998). Ein spontaner Transport von Fettsäureanionen fand, in Übereinstimmung mit den Experimenten an Liposomen (Kamp and Hamilton, 1992), nicht statt.

IFC-basierte Messungen des FS Flip-Flops würden falsche Aussagen liefern, wenn die FS das Membrandipolpotential beeinflussen würden. Dieser Frage ist in einer separaten Arbeit nachgegangen worden (Peterson et al., 2002), s. Kapitel III. 2). Darin wurden CH₂-Gruppen in verschiedenen Positionen der Fettsäurekette durch Schwefelatome ersetzt. Die beobachteten Änderungen des Dipolpotentials waren nicht auf einen Beitrag der Fettsäuren zurückzuführen, sondern auf die Störung der Lipidpackung in der Membran.

Die Ergebnisse der ersten beiden Artikel (s. Kapitel III.2 und III.3) ebneten den Weg zur direkten Untersuchung von rekonstituiertem UCP und seiner Aktivierung durch FS.

Die im Kapitel III.4 (Urbankova et al., 2003) beschriebene Experimente beinhalten die erstmalige Rekonstitution des aus braunem Hamsterfettgewebe isolierten UCP1 in ebene Bilipidmembranen mit der Schindler-Methode. Sie zeigen, dass die Protonenleitfähigkeit solcher Membranen nur in der Anwesenheit von langkettigen FS erhöht ist. Dieser Effekt wurde durch ATP inhibiert. Die Transportrate des Proteins (14 s^{-1}) ist allerdings zu niedrig, um plausible Rückschlüsse zugunsten einer der zwei kontroversen Hypothesen (*Fatty acid cycling* oder *Fatty acid buffering*) zu ziehen.

Eine weitere Möglichkeit, zwischen beiden Hypothesen zu unterscheiden, bietet die Messung von UCP-vermittelten Protonentransport in Anwesenheit „inaktiver“ (d.h. zum spontanen Transport unfähiger) Fettsäuren. Im Kapitel III.5 (Voltchenko et al., 2003) haben wir mit Hilfe von protonensensitiven Elektroden die Hypothese überprüft, dass die als inaktiv deklarierten Hydroxyfettsäurederivate (9,10,16-Trihydroxyhexadecanoinsäure, 12-Hydroxydodecanoinsäure, 16-Hydroxyhexadecanoinsäure und 2-Hydroxyhexadecanoinsäure) in protonierter Form die Membran ohne Proteinhilfe überqueren können. Dieser Prozess wurde, ähnlich wie bei dem Transport anderer schwacher Säuren, von der Ansäuerung der membrannahen ungerührten Schichten des Aufnahme-kompartiments und der korrespondierenden pH-Erhöhung im Donorkompartiment begleitet. Die Untersuchung von Hydroxy-FS haben unter anderem gezeigt, dass die FS-Transportrate von dem pH-Wert des Mediums stark abhängt. Diese war am größten bei den pH-Werten, die mit dem pK-Wert der zu untersuchenden FS übereinstimmten. Neben ihrer möglichen Rolle in der Aufklärung des UCP-vermittelten Protonentransportes, haben Hydroxyfettsäuren eine Schlüsselrolle bei entzündlichen, neuroprotektiven, bakteriziden und antikanzerogenen Prozessen. Der Aufklärung ihres Transportmechanismus kam daher besondere Bedeutung zu.

In dem Kapitel III.6 wird die modifizierte Technik zur Proteinrekonstitution für die elektro-physiologische Charakterisierung des humanen rekombinanten Entkopplerprotein 1, hUCP1, beschrieben. Das Protein wurde in *E. coli* exprimiert und anschließend aus den Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) gereinigt. Die Aktivität des rekombinanten Proteins war in Anwesenheit von FS mit der Aktivität von nativem, aus braunem Fettgewebe isolierten Protein vergleichbar (Beck et al., 2006). Diese Arbeit schaffte die notwendigen methodischen Voraussetzungen, um den Transportmechanismus anderer Mitglieder der UCP-Familie am Beispiel von hUCP2 zu untersuchen.

In einer Reihe von Experimenten (Kapitel III.7) haben wir gezeigt, dass hUCP2, ungeachtet seiner, von UCP1 verschiedenen physiologischen Funktion, eine hUCP1 ähnliche protonophorische Aktivität entwickelt. Dazu bedarf es der Anwesenheit langkettiger FS. Die integrale und Protonen-membranleitfähigkeit erhöhte sich gemäß der Reihe: Palmittinsäure < Oleinsäure < Eicosatriensäure < Linoleinsäure < Arachidonsäure. Der Abfall der UCP-vermittelten Protonenleitfähigkeit mit dem Sättigungsgrad der FS konnte im Rahmen der „*FA cycling*“ Hypothese erklärt werden (Beck et al., 2007).

III.2. Änderungen der intrinsischen Membranpotentiale als Folge des Flip-Flops von langkettigen Fettsäuren.

Pohl, E. E.[@], U. Peterson, Sun, J., Pohl P. (2000).

[@] corresponding author

Changes of intrinsic membrane potentials induced by flip-flop of long-chain fatty acids.
Biochemistry, 39, 7, 1834 – 1839.

III.3. Herkunft des Membrandipolpotentials: Beitrag von Fettsäureketten der Phospholipide.

Peterson U., Mannoock D. A., Lewis R. N. A. H., Pohl P., McElhaney R.N., Pohl E. E[@] (2002).

[@] *corresponding author*

Origin of membrane dipole potential: contribution of the phospholipid fatty acid chains. Chem. Phys. Lipids, 117, 1-2, 21-29.

III.4. Transportkinetik der Entkopplerproteine: Analyse von in ebene Lipidmembranen rekonstituiertem UCP1.

Urbánková, E., Voltchenko, A., Pohl, P., Jezek, P., Pohl, E.E.® (2003).

® corresponding author

Transport kinetics of uncoupling proteins: Analysis of planar bilayers reconstituted with UCP1.

J. Biol. Chem., 278 (35): 32497-50.

III.5. Flip-flop von Hydroxyfettsäuren über die Membran, erfasst mit protonensensitiven Mikroelektroden.

Pohl E.E.[@], Rupprecht A., Voltchenko A. M. (2008).

[@] corresponding author

Flip-flop of hydroxy fatty acids through the membrane, measured by microelectrodes.

Biochim. Biophys. Acta. 1778(5):1292-7.

III.6. Neues automatisiertes Verfahren für die Rekonstitution von hydrophoben Proteinen in ebene Lipidmembranen. Rekonstitution des rekombinanten Entkopplerproteins 1.

Beck, V., Jaburek, M., Breen E. P., Porter R. K., Jezek, P., Pohl, E. E.[@] (2006).

[@] *corresponding author*

A new automated technique for the reconstitution of hydrophobic proteins in planar bilayer membranes. Reconstitution of recombinant uncoupling protein 1.

Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics), 1757(5-6):474-9.

III.7. Polyungesättigte Fettsäuren aktivieren die humanen Entkopplerproteine 1 und 2 in ebenen Lipidmembranen.

Beck, V., Jaburek, M., Demina, T., Rupprecht, A., Porter R. K., Jezek, P., Pohl, E. E.® (2007).

® corresponding author

Polyunsaturated fatty acids activate human uncoupling proteins 1 and 2 in planar lipid bilayers.

FASEB J. , 21, 4, 1137-1144.

IV. Diskussion

Seit der Entdeckung von UCP1 im braunen Fettgewebe in den siebziger Jahren wird kontrovers diskutiert, ob es als Aniontransporter oder Protonkanal fungiert und ob die Fettsäuren essentiell für seine Aktivität sind. Die Beschreibung weiterer Mitglieder dieser Proteinsubfamilie (UCP2-UCP5, PUMP, etc., s. Abb. 1.6) warf die Fragen auf, ob sie dem Protonentransport und damit der Entkopplung der ATP-Synthese dienen oder ob auch andere Ionen transportiert werden (Nedergaard and Cannon, 2003). Die ubiquitäre Lokalisation dieser Entkopplerproteine (s. Tabl. 1) hat Zweifel an ihrer Beteiligung an der Thermoregulation ausgelöst.

In den vergangenen Jahren haben wir systematisch die Transportmechanismen der zwei Entkopplerproteine, UCP1 und UCP2, untersucht und miteinander verglichen. Während bisher alle Versuche an vesikulären Membranen, isolierten Mitochondrien und knock-out Tieren durchgeführt wurden, haben wir ebene Lipidmembranen verwendet. Damit wurde erstmals die elektrophysiologische Untersuchung der rekombinant hergestellten (hUCP1, hUCP2, mUCP1) oder aus braunem Fettgewebe isolierten (haUCP1) und gereinigten Proteine möglich.

Unsere Arbeiten haben eindeutig demonstriert, dass in ebene Lipidmembranen rekonstituierte UCP1 (Kapitel III.4, III.6) und UCP2 (Kapitel III.7) ausschließlich in Anwesenheit von langkettigen Fettsäuren elektrisch leitfähig sind. Damit konnte die Existenz eines in Abwesenheit von Fettsäuren aktiven Protonenkanals ausgeschlossen werden (Gonzalez-Barroso et al., 1998). Die Verwendung des künstlichen Membransystems ermöglichte es, die direkte Wirkung der FS auf die Proteinaktivität zu zeigen, als Alternative zur FS-vermittelten Hochregulierung der Proteinsynthese (Samec et al., 1999; Armstrong and Towle, 2001).

Die erhöhte Protonenleitfähigkeit in Anwesenheit von Entkopplerproteinen und Fettsäuren wurde, in Übereinstimmung mit Berichten anderer Forschergruppen, durch Purinnukleotide inhibiert. Allerdings gelang nicht immer die 100% Inhibierung. Die Ursache hierfür könnte in der unvollständigen Membranfaltung des Proteins oder aber im Fehlen von Bindungspartnern oder Cofaktoren, die in lebenden Mitochondrien vorhanden sind, liegen. Für letzteres spricht die Tatsache, dass die ATP Konzentration in Zellen um ein Vielfaches größer ist, als die, die für die UCP-Inhibierung in isolierten Mitochondria oder

Liposomen notwendig ist. Der modulierenden Rolle solcher Membranparameter wie Membranlipidkomposition, Transmembran- und Dipolpotential, kommt daher eine große Bedeutung zu. Sie ist Gegenstand unserer gegenwärtigen Untersuchungen.

Für beide Proteine wurden ähnliche Transportraten sowie Protonenleitfähigkeiten in Anwesenheit von FS verschiedener Sättigungsgrade gemessen. Dieses Ergebnis löst die lange währende Kontroverse hinsichtlich der Fähigkeit von UCP2, Protonen zu transportieren (Nedergaard and Cannon, 2003) und stützt die Hypothese, dass UCP2, analog zu UCP1, als FS-abhängiges Entkopplerprotein fungieren kann. Die schwächere Proteinaktivität des UCP2 in Mitochondrien, kann auf das niedrige Expressionsniveau im Gewebe zurückgeführt werden.

Die Ergebnisse unserer Experimente sprechen für den in der „*Fatty acid cycling*“-Hypothese (Skulachev, 1991) postulierten Mechanismus des UCP-vermittelten Protonentransports. Dieser sieht vor, dass das Entkopplerprotein Fettsäureanionen transportiert, während der eigentliche Protonentransport durch den Flip-Flop der neutralen FS-Form gewährleistet ist. Fettsäuren, die nicht imstande sind, die Membran in neutraler Form zu überqueren („inaktive“ FS), würden den Protonentransport unmöglich machen. Die bisherigen Fluoreszenzmessungen an vesikulären Membranen haben gezeigt, dass der Transport protonierter FS_H über die Lipidmembran so schnell ist, dass die Beteiligung eines FS_H -Transportproteins ausgeschlossen werden kann (Kamp and Hamilton, 1992). Allerdings wurde gezeigt, dass sich die Flip-Flop Rate mit der Vergrößerung des Vesikeldurchmessers, d.h. mit dem Krümmungsradius der Membran verringert (Kleinfeld and Storch, 1993). Dadurch stellte sich die Frage nach der Geschwindigkeit des Fettsäuretransports durch Zellmembranen erneut. Die ebenen Lipidmembranen boten sich als geeignetes Modell zur Untersuchung dieser Problematik an (Kapitel III.2 und III.5). Der Transport wurde direkt und ohne Markierung der Fettsäuren bzw. Einsatz anderer Markermoleküle gemessen. Die durch einen transmembranen pH Sprung induzierte Umverteilung der bereits in die Membran rekonsituierten Fettsäuren wurde als Änderung der transmembranen Oberflächenpotentialdifferenz erfasst. Die zugrunde liegende Protonierung der FS auf der einen Membranseite und ihre dem Flip-Flop folgende Deprotonierung auf der anderen Seite führt zu einem Nettoprotonentransport. Eine ganz wesentliche Voraussetzung für die Validierung der „*Fatty acid cycling*“-Hypothese ist damit gegeben.

Auch in Anwesenheit einiger als „inaktiv“ geltender Fettsäuren (z. B. einiger Hydroxyfettsäurederivate, HFS) konnten wir in einem proteinfreien System Protonentransport nachweisen (Kapitel III.5). In unmittelbarer Membrannähe wurde die Protonenkonzentrationsänderung mit Hilfe protosensitiver Mikroelektroden unter „steady state“-Bedingungen gemessen. Das machte den ursprünglich geplanten Einsatz von hydroxy-FS für die Bestätigung der "*Fatty acid cycling*" Hypothese unmöglich.

Die Bindung der Fettsäureanionen an UCP ist konsistent mit dem Verhalten anderer fettsäurebindender Proteine, z. B. Albumin und FABP (fatty acid binding protein), die die geladene, aber nicht die protonierte Form von FS binden (Cistola et al., 1987). Auch die hohe strukturelle Homologie von UCP1 und UCP2 zu anderen mitochondrialen Anionentransportern (insgesamt über 46 menschlicher Gene), wie z. B. zum Adeninnukleotidtransporter oder zum Phosphattransporter, spricht für einen Anionentransport durch UCP1 und UCP2.

Das bisher überzeugendste Argument zugunsten der „*Fatty acid cycling*“-Hypothese ist die Tatsache, dass mehrfach ungesättigte FS, wie z. B. Arachidonsäure, die Aktivität beider Proteine am besten stimulieren (Kapitel III.7). Retinolsäure, die als potenter UCP-Aktivator deklariert wurde (Rial et al., 1999), passt sich gut in die gezeigte Abhängigkeit der UCP-vermittelten Membranleitfähigkeit vom FS-Sättigungsgrad ein (Kapitel III.7). Beide Transportschritte, sowohl der FS Flip-Flop, als auch der anschließende Rücktransport der FS-Anionen durch UCP, sind in Anwesenheit ungesättigter FS schneller als mit gesättigten FS (s. Abb.6 im Kapitel III.7). Die Einführung zusätzlicher Doppelbindungen senkt den Ordnungsparameter der Membranlipide, erhöht sowohl Membrankompressibilität als -fluidität und fördert damit den Flip-Flop der ungesättigten FS. Das Protein katalysiert die transmembrane Bewegung der FS-Anionen. Die Ursache dafür ist in der Senkung der Born-Energie für die geladenen FS zu sehen. Dabei kann die beweglichere Kohlenwasserstoffkette der ungesättigten FS innerhalb der Lipidphase besser transloziert werden.

V. Schlussfolgerungen und Ausblick

Unsere experimentellen Untersuchungen von UCP1 und UCP2 haben, ungeachtet der Unterschiede in der Funktion, einen für beide Proteine ähnlichen Protonentransportmechanismus demonstriert. UCP1 und UCP2 wiesen ähnliche Transportraten auf und der Protonenfluss bedurfte der Anwesenheit langkettiger Fettsäuren. Hiermit haben wir die aufgrund der hohen Homologie beider Proteine getroffenen Voraussagen bestätigt. Unsere Ergebnisse stützen die „*Fatty acid cycling*“-Hypothese, der zufolge die Entkopplerproteine Fettsäureanionen transportieren. Der Protonentransport erfolgt erst, wenn die protonierte Fettsäure spontan entlang ihres Konzentrationsgradienten die Membran in umgekehrter Richtung passiert. Damit liegt die Vermutung nahe, dass alle fettsäurebindenden Entkopplerproteine zu dem Protonenleck in der mitochondrialen Membran beitragen können.

Die Rekonstitution gereinigter Proteine in wohldefinierte ebene Lipidmembranen ermöglichte eine exakte elektrophysiologische Proteincharakterisierung. Weitere Analysen und Aktivitätsvergleiche von UCP1 und UCP2 in Anwesenheit verschiedener Cofaktoren sind erforderlich. Es ist noch nicht eindeutig klar, ob diese Proteine ausschließlich Protonen oder auch andere Ionen, wie z. B. Kalium oder Chlor leiten. Die aktivierende Rolle der Fettsäuren soll in dem Zusammenhang mit ihrer Struktur (Sättigungsgrad, Länge der FS-Kette) untersucht werden.

Eine spannende Frage ist die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) an der durch Entkopplerproteine vermittelten Regulierung der mitochondrialen Entkopplung. ROS stellen die Hauptursache für oxidative Zellschädigungen dar, die eine Grundlage für verschiedene Krankheiten bilden. Eine reizvolle Hypothese ist der Feedback-Mechanismus, bei dem die ansteigende Konzentration von ROS zur Aktivierung von UCP führt ((Krauss et al., 2005), Abb. 5.1). Widersprüchliche Ergebnisse, die in lebenden Systemen, wie Mitochondria und *knock-out* Mäusen gewonnen wurden, lassen bisher keinen eindeutigen Schluss in dieser Hinsicht zu. Experimente am gereinigten und rekonstituierten Protein könnten, im Gegensatz dazu, die Rolle von ROS und ROS-Produkten (z. B. 4-hydroxy-2-nonenal) in der Aktivierung von UCP eindeutig beweisen oder widerlegen.

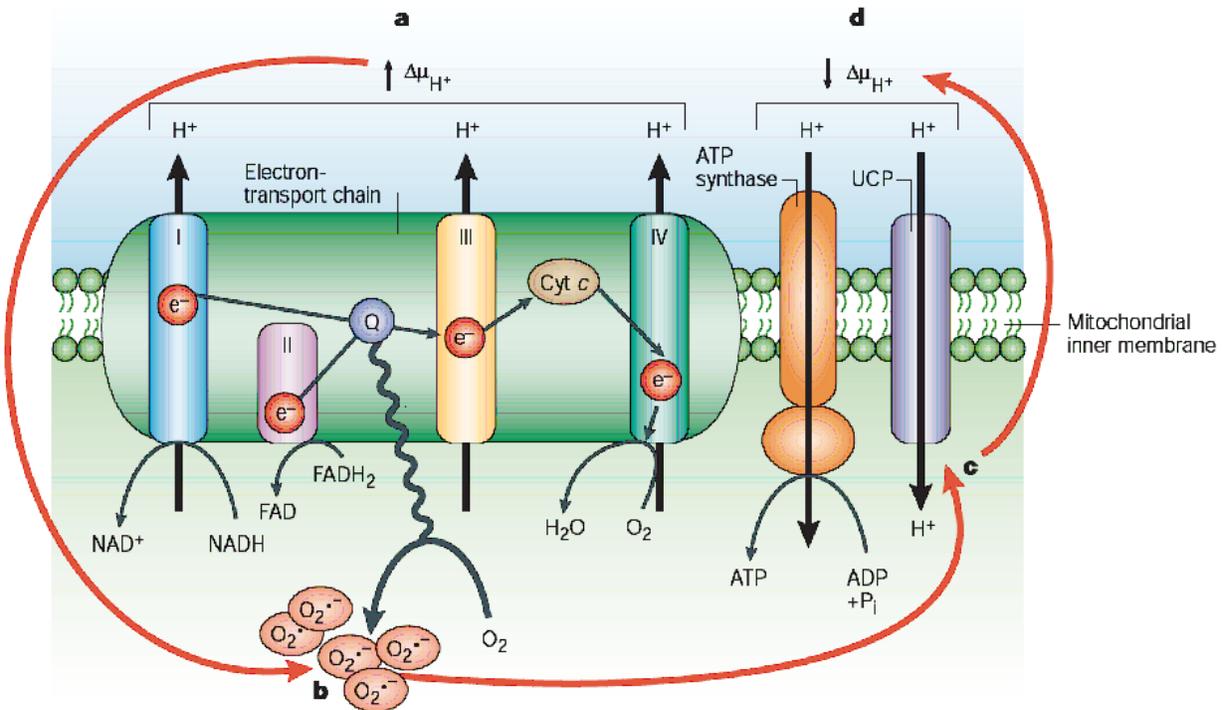


Abbildung 5.1. Aktivierung des UCP2 durch Superoxidradikal und *vice versa* (Aus Krauss et al., 2005).

In den letzten zehn Jahren wurden mehrere Proteine der UCP-Subfamilie (s. Abb. 1.6) entdeckt. Ihre physiologische Charakterisierung steht aber noch aus. Das Modell ebener Lipidmembranen bietet hierzu die Möglichkeit. Eine besondere Herausforderung stellt das Klonen, Reinigen und Rekonstituieren von gehirnspezifischem UCP4 und UCP5 dar. Es gibt Hinweise darauf, dass diese Proteine an der Regulierung der Produktion freier Radikale und somit an der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt sind. Basierend auf dem Vergleich der Transporteigenschaften verschiedener UCPs sollten Rückschlüsse auf deren zelluläre Funktion möglich sein.

Experimente an isolierten Mitochondrien weisen darauf hin, dass auch andere Transporter wie ANT, PIC und AGC wesentlich zum mitochondrialen H^+ -Leck beitragen können. Auch diese Hypothese kann nach der Rekonstitution der hochgereinigten Proteine in ebene Membranen untersucht werden. Durch den Vergleich der Einzelmolekülleitfähigkeiten von ANT, PIC, AGC und UCP kann ihr jeweiliger Beitrag zum basalen und inhibitor-sensitiven Protonenleck evaluiert werden.

Für die Rekonstitution der Membranproteine in ebene Lipidmembran haben wir das Verfahren zusätzlich modifiziert (Kapitel III.6), so dass sowohl der Zeitaufwand für den Proteineinbau als auch die Menge von Protein, die für die Membranformierung notwendig ist, reduziert wurde. Das Verfahren erlaubt die Untersuchung von einzelnen Kanälen, sowie den Einbau von multiplen Proteinkopien ($\sim 10^7$) in die Lipidschicht. Letzteres ist besonders wichtig für die elektrophysiologische Charakterisierung von Transporterproteinen (z. B. mitochondrialen Transportern), die grundsätzlich sehr kleine Transportraten haben. Trotz der relativ großen Membranoberfläche (bis zu 300 μm in Durchmesser), erlaubt die hohe Stabilität der Membran das Anlegen einer Transmembranspannung bis zu 300 mV. Diese Eigenschaft ist für die Untersuchungen mitochondrialer Proteinen von Bedeutung, da sie unter physiologischen Bedingungen bei Transmembranpotentialen bis zu ~ 220 mV arbeiten. Im Kapitel III.6 (Beck et al., 2006) haben wir die ersten Experimente veröffentlicht, die zeigen, dass Membranpotential ein wichtiger regulatorischer Faktor für die *in vivo* Funktionen des UCP ist.

Die Differenzierung zwischen Aktivierung und/oder Hochregulation der Proteine bildet, im Verbund mit Kenntnissen über die Regulation der verschiedenen UCP, die Grundlage für ein rationales Drug-Design und offeriert somit einen wichtigen Wegweiser für klinische Anwendungen.

VI. Zusammenfassung

Entkopplerproteine 1 (UCP1) und 2 (UCP2) gehören zu der großen Familie mitochondrialer Aniontransporter. Das zuerst entdeckte und am meisten untersuchte Mitglied der UCP-Subfamilie - UCP1 - ist ein Transporter, der die Kopplung der mitochondrialen Respiration zur ATP-Synthese aufhebt und dadurch eine wichtige Rolle bei der „zitterfreien“ Thermogenese im braunen Fettgewebe spielt. Im Gegensatz zu UCP1 ist UCP2 nicht in die Thermoregulation, sondern in Diabetes, Apoptose, Neurodegeneration, lipidvermittelten oxidativen Stress u.a. involviert. Die Beteiligung von UCP2 an verschiedenen Prozessen in unterschiedlichen Organen hat bisher keine Erklärung auf molekularem Niveau gefunden. Es ist umstritten, welche Ionen durch UCP1 und UCP2 transportiert werden und wie der Transportprozess reguliert ist. Die Untersuchungen an isolierten Mitochondrien und vesikulären Membranen zeigen, dass der Protonentransport ein zentrales Ereignis in der Aktivität von UCP darstellt. Alternativen Hypothesen zufolge werden entweder die Protonen selbst (*Fatty acid buffering*) oder Fettsäureanionen von UCP1 (*Fatty acid cycling*) transportiert.

Mit der Rekonstitution von gereinigten UCP1 und UCP2 in ebene Lipidmembranen wurde ein Modellsystem entwickelt, das es erlaubt, zwischen beiden Hypothesen zu unterscheiden. Wir haben demonstriert, dass die Anwesenheit von langkettigen Fettsäuren und ihre Fähigkeit zu einem spontanen Transport durch die Lipidschicht (Flip-Flop), Voraussetzungen für den UCP-vermittelten Protonentransport darstellen. Die gemessenen Transportraten für UCP1 (14 s^{-1}) und UCP2 (4.5 s^{-1}) liefern einen Hinweis auf den Transportcharakter von UCP. Die UCP-vermittelte Membranleitfähigkeit ist abhängig vom Sättigungsgrad der Fettsäuren und wächst in folgender Reihenfolge: Stearinsäure, Oleinsäure, Linoneinsäure, Arachidonsäure. Diese Abhängigkeit ist ähnlich für die beiden Proteine und kann aufgrund von "*Fatty acid cycling*"-Hypothese von Skulachev, Garlid und Jezek erklärt werden. Wir haben gezeigt, dass UCP2 den FS-abhängigen Protonentransport vermittelt und somit, analog zu UCP1, als ein funktionales Entkopplerprotein fungieren kann.

Die Kenntnis des Transportmechanismus und der Regulation verschiedener UCP bilden die Grundlage für ein rationales Drug-Design und ist somit wegweisend für klinische Anwendungen.

VII. Literatur

1. Andersen,OS, S Feldberg, H Nakadomary, S Levy, S McLaughlin, 1978, Electrostatic interactions among hydrophobic ions in lipid bilayer membranes: *Biophys.J.*, v. 21, p. 35-70.
2. Andersen,OS, M Fuchs, 1975, Potential energy barriers to ion transport within lipid bilayers: *Biophys.J.*, v. 15, p. 795-830.
3. Andrews,ZB, S Diano, T L Horvath, 2005, Mitochondrial uncoupling proteins in the cns: in support of function and survival: *Nat.Rev.Neurosci.*.
4. Antonenko,YN, G A Denisov, P Pohl, 1993, Weak acid transport across bilayer lipid membrane in the presence of buffers: Theoretical and experimental pH profiles in the unstirred layers.: *Biophys.J.*, v. 64, p. 1701-1710.
5. Armstrong,MB, H C Towle, 2001, Polyunsaturated fatty acids stimulate hepatic UCP-2 expression via a PPARalpha-mediated pathway: *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.*, v. 281, p. E1197-E1204.
6. Baffy,G, C Y Zhang, J N Glickman, B B Lowell, 2002, Obesity-related fatty liver is unchanged in mice deficient for mitochondrial uncoupling protein 2: *Hepatology*, v. 35, p. 753-761.
7. Bechmann,I, S Diano, C H Warden, T Bartfai, R Nitsch, T L Horvath, 2002, Brain mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2): a protective stress signal in neuronal injury: *Biochem.Pharmacol.*, v. 64, p. 363-367.
8. Beck,V, M Jaburek, E P Breen, R K Porter, P Jezek, E E Pohl, 2006, A new automated technique for the reconstitution of hydrophobic proteins into planar bilayer membranes. Studies of human recombinant uncoupling protein 1: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1757, p. 474-479.
9. Beck,V, M Jaburek, T Demina, A Rupprecht, R K Porter, P Jezek, E E Pohl, 2007, Polyunsaturated fatty acids activate human uncoupling proteins 1 and 2 in planar lipid bilayers: *FASEB J.*, v. 21, p. 1137-1144.
10. Benz,R, B F Gisin, 1978, Influence of membrane structure on ion transport through lipid bilayer membranes: *J.Membr.Biol.*, v. 40, p. 293-314.
11. Benz,R, P Läuger, 1976, Kinetic analysis of carrier-mediated ion transport by charge-pulse technique: *J.Membr.Biol.*, v. 27, p. 171-191.
12. Bienengraeber,M, K S Echtay, M Klingenberg, 1998, H⁺ transport by uncoupling protein (UCP-1) is dependent on a histidine pair, absent in UCP-2 and UCP-3: *Biochemistry*, v. 37, p. 3-8.

13. Chan,CB, 2002, Endogenous regulation of insulin secretion by UCP2: Clin.Lab, v. 48, p. 599-604.
14. Chan,CB, D De Leo, J W Joseph, T S McQuaid, X F Ha, F Xu, R G Tsushima, P S Pennefather, A M Salapatek, M B Wheeler, 2001, Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action: Diabetes, v. 50, p. 1302-1310.
15. Cistola,DP, D M Small, J A Hamilton, 1987, Carbon 13 NMR studies of saturated fatty acids bound to bovine serum albumin. I. The filling of individual fatty acid binding sites: J.Biol.Chem., v. 262, p. 10971-10979.
16. Echtay,KS, D Roussel, J St Pierre, M B Jekabsons, S Cadenas, J A Stuart, J A Harper, S J Roebuck, A Morrison, S Pickering, J C Clapham, M D Brand, 2002, Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins: Nature, v. 415, p. 96-99.
17. Echtay,KS, E Winkler, K Frischmuth, M Klingenberg, 2001, Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone): Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 98, p. 1416-1421.
18. Ermakov,YA, A Z Averbakh, A I Yusipovich, S Sukharev, 2001, Dipole potentials indicate restructuring of the membrane interface induced by gadolinium and beryllium ions: Biophys.J., v. 80, p. 1851-1862.
19. Esterbauer,H, C Schneitler, H Oberkofler, C Ebenbichler, B Paulweber, F Sandhofer, G Ladurner, E Hell, A D Strosberg, J R Patsch, F Krempler, W Patsch, 2001, A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans: Nat.Genet., v. 28, p. 178-183.
20. Fleury,C, M Neverova, S Collins, S Raimbault, O Champigny, C Levi-Meyrueis, F Bouillaud, M F Seldin, R S Surwit, D Ricquier, C H Warden, 1997, Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia [see comments]: Nat.Genet., v. 15, p. 269-272.
21. Garlid,KD, M Jaburek, P Jezek, 1998, The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins.: FEBS Lett., v. 438, p. 10-14.
22. Garlid,KD, M Jaburek, P Jezek, M Varecha, 2000, How do uncoupling proteins uncouple?: Biochim.Biophys.Acta, v. 1459, p. 383-389.
23. Garlid,KD, D E Orosz, M Modriansky, S Vassanelli, P Jezek, 1996, On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein: J.Biol.Chem., v. 271, p. 2615-2620.
24. Gonzalez-Barroso,MM, C Fleury, F Bouillaud, D G Nicholls, E Rial, 1998, The uncoupling protein UCP1 does not increase the proton conductance of the inner mitochondrial membrane by functioning as a fatty acid anion transporter: J.Biol.Chem., v. 273, p. 15528-15532.

25. Heaton,GM, R J Wagenvoord, A Kemp, Jr., D G Nicholls, 1978, Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation: *Eur.J.Biochem.*, v. 82, p. 515-521.
26. Horvath,B, C Spies, G Horvath, W J Kox, S Miyamoto, S Barry, C H Warden, I Bechmann, S Diano, J Heemskerk, T L Horvath, 2002, Uncoupling protein 2 (UCP2) lowers alcohol sensitivity and pain threshold: *Biochem.Pharmacol.*, v. 64, p. 369-374.
27. Jaburek,M, M Varecha, R E Gimeno, M Dembski, P Jezek, M Zhang, P Burn, L A Tartaglia, K D Garlid, 1999, Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3: *J.Biol.Chem.*, v. 274, p. 26003-26007.
28. Jezek,P, M Modriansky, K D Garlid, 1997, Inactive fatty acids are unable to flip-flop across the lipid bilayer.: *FEBS Lett.*, v. 408, p. 161-165.
29. Jezek,P, D E Orosz, M Modriansky, K D Garlid, 1994, Transport of anions and protons by the mitochondrial uncoupling protein and its regulation by nucleotides and fatty acids. A new look at old hypotheses: *J.Biol.Chem.*, v. 269, p. 26184-26190.
30. Kaim,G, P Dimroth, 1999, ATP synthesis by F-type ATP synthase is obligatorily dependent on the transmembrane voltage: *EMBO J.*, v. 18, p. 4118-4127.
31. Kamp,F, J A Hamilton, 1992, pH gradients across phospholipid membranes caused by fast flip-flop of un-ionized fatty acids: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 89, p. 11367-11370.
32. Kleinfeld,AM, J Storch, 1993, Transfer of long-chain fluorescent fatty acids between small and large unilamellar vesicles: *Biochemistry*, v. 32, p. 2053-2061.
33. Klingenberg,M, K S Echtay, 2001, Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1504, p. 128-143.
34. Klingenberg,M, S G Huang, 1999, Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1415, p. 271-296.
35. Krauss,S, C Y Zhang, B B Lowell, 2005, The mitochondrial uncoupling-protein homologues: *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, v. 6, p. 248-261.
36. Lameloise,N, P Muzzin, M Prentki, F Assimacopoulos-Jeannet, 2001, Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion?: *Diabetes*, v. 50, p. 803-809.
37. Liu,D, S L Chan, N C Souza-Pinto, J R Slevin, R P Wersto, M Zhan, K Mustafa, R de Cabo, M P Mattson, 2006, Mitochondrial UCP4 mediates an adaptive shift in energy metabolism and increases the resistance of neurons to metabolic and oxidative stress: *Neuromolecular.Med.*, v. 8, p. 389-414.

38. Mueller,P, D O Rudin, H T Tien, W C Wescott, 1963, J.Phys.Chem., v. 67, p. 534-535.
39. Nagase,I, T Yoshida, M Saito, 2001, Up-regulation of uncoupling proteins by beta-adrenergic stimulation in L6 myotubes: FEBS Lett., v. 494, p. 175-180.
40. Nedergaard,J, B Cannon, 2003, The 'novel' 'uncoupling' proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions: Exp Physiol, v. 88, p. 65-84.
41. Nicholls,DG, E Rial, 1999, A history of the first uncoupling protein, UCP1: J.Bioenerg.Biomembr., v. 31, p. 399-406.
42. Noma,T, A Nishiyama, K Mizushige, K Murakami, T Tsuji, M Kohno, M Rahman, T Fukui, Y Abe, S Kimura, 2001, Possible role of uncoupling protein in regulation of myocardial energy metabolism in aortic regurgitation model rats: FASEB J., v. 15, p. 1206-1208.
43. Palmieri,F, 2004, The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications: Pflugers Arch., v. 447, p. 689-709.
44. Pattus,F, P Desnuelle, R Verger, 1978, Spreading of liposomes at the air/water interface: Biochim.Biophys.Acta, v. 507, p. 62-70.
45. Pebay-Peyroula,E, C Dahout-Gonzalez, R Kahn, V Trezeguet, G J Lauquin, G Brandolin, 2003, Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside: Nature, v. 426, p. 39-44.
46. Pecqueur,C, M C Alves-Guerra, C Gelly, C Levi-Meyrueis, E Couplan, S Collins, D Ricquier, F Bouillaud, B Miroux, 2001, Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation: J.Biol.Chem., v. 276, p. 8705-8712.
47. Peterson,U, D A Mannoock, R N A H Lewis, P Pohl, R N McElhaney, E E Pohl, 2002, Origin of membrane dipole potential: contribution of the phospholipid fatty acid chains: Chem.Phys.Lipids, v. 117, p. 21-29.
48. Pohl,EE, 2002, Dipole Potential, in HT Tien and A Ottova (eds), Planar Lipid Bilayers (BLMs) and their Applications: Elsevier.
49. Pohl,EE, A V Krylov, M Block, P Pohl, 1998, Changes of the membrane potential profile induced by verapamil and propranolol.: Biochim.Biophys.Acta, v. 1373, p. 170-178.
50. Pohl,EE, U Peterson, J Sun, P Pohl, 2000, Changes of intrinsic membrane potentials induced by flip-flop of long- chain fatty acids: Biochemistry, v. 39, p. 1834-1839.

51. Pohl,P, Y N Antonenko, E H Rosenfeld, 1993, Effect of ultrasound on the pH profiles in the unstirred layers near planar bilayer lipid membranes measured by microelectrodes.: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1152, p. 155-160.
52. Rial,E, M Gonzalez-Barroso, C Fleury, S Iturrizaga, D Sanchis, J Jimenez-Jimenez, D Ricquier, M Gubern, F Bouillaud, 1999, Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2: *EMBO J.*, v. 18, p. 5827-5833.
53. Rial,E, M M Gonzalez-Barroso, 2001, Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1504, p. 70-81.
54. Ricquier,D, J C Kader, 1976, Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 73, p. 577-583.
55. Samec,S, J Seydoux, A G Dulloo, 1999, Skeletal muscle UCP3 and UCP2 gene expression in response to inhibition of free fatty acid flux through mitochondrial beta-oxidation: *Pflugers Arch.*, v. 438, p. 452-457.
56. Schindler,H, 1979, Autocatalytic transport of the peptide antibiotics suzukacillin and alamethicin across lipid membranes: *FEBS Lett.*, v. 104, p. 157-160.
57. Schindler,H, 1980, Formation of planar bilayers from artificial or native membrane vesicles: *FEBS Lett.*, v. 122, p. 77-79.
58. Schindler,H, 1989, Planar lipid-protein membranes: strategies of formation and of detecting dependencies of ion transport functions on membrane conditions: *Methods Enzymol.*, v. 171, p. 225-253.
59. Skulachev,VP, 1991, Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation.: *FEBS Lett.*, v. 294, p. 158-162.
60. Sokolov,VS, V V Cherny, M V Simonova, V S Markin, 1990, Electrical potential distribution over the bilayer lipid membrane due to amphiphilic ion adsorption.: *Bioelectrochem.Bioenerg.*, v. 23, p. 27-44.
61. Sokolov,VS, V G Kuzmin, 1980, [Measurement of differences in the surface potentials of bilayer membranes according to the second harmonic of a capacitance current]. *In Russian: Biofizika*, v. 25, p. 170-172.
62. Urbankova,E, A Voltchenko, P Pohl, P Jezek, E E Pohl, 2003, Transport kinetics of uncoupling proteins:Analysis of UCP1 reconstituted in planar lipid bilayers: *J.Biol.Chem.*, v. 278, p. 32497-32500.
63. Voltchenko,AM, U Peterson, P Pohl, E E Pohl, 2003, Study of "inactive" fatty acids: *Biophysical Journal*, v. 84, p. 519A.

64. Zackova,M, P Jezek, 2002, Reconstitution of novel mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3: Biosci.Rep., v. 22, p. 33-46.
65. Zhang,CY, G Baffy, P Perret, S Krauss, O Peroni, D Grujic, T Hagen, A J Vidal-Puig, O Boss, Y B Kim, X X Zheng, M B Wheeler, G I Shulman, C B Chan, B B Lowell, 2001, Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes: Cell, v. 105, p. 745-755.

VIII. Danksagung

Vor allem gilt mein herzlichster Dank Herrn Institutsdirektor Professor Dr. Robert Nitsch, der mich seit Beginn meiner Arbeit an der Charité 2002 großzügig unterstützt und mir stets mit gutem Rat zur Seite gestanden hat. Sehr wichtig war für mich die Freiheit, die er mir für die Entwicklung meiner Ideen und Projekte eingeräumt hat, verbunden mit dem Vertrauen in mein fachliches Können, dass er beim Aufbau der *Microscopy Facility* im Institut für Zell- und Neurobiologie in mich gesetzt hat. Auch bin ich ihm für die Verstärkung meiner Arbeitsgruppe mit einer MTA dankbar.

Bei Herrn Professor Dr. Klaus-Peter Hofmann (Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Charité - Universitätsmedizin) möchte ich mich für seine Hilfe bei der Eröffnung und der Durchführung des Habilitationsverfahrens bedanken.

Zu Dank verpflichtet bin ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die mich seit 2000 beim Aufbau meiner Arbeitsgruppe finanziell unterstützt hat (*Po-524/2-1, Po-524/2-2, Po-524/3-1, Po-524/5-1, 436 TSE 113/44/0-1*). Diese besteht zur Zeit aus wissenschaftlichen Mitarbeitern Frau Dipl.-Biochem. Anne Rupprecht, Frau Dr. Alina Smorodchenko, Herrn Dr. Andreas Knopp und MTA Jutta Schüler. Diesen Kolleginnen und Kollegen gilt ebenfalls mein herzlicher Dank. Auch den ehemaligen Mitgliedern meiner Gruppe Anna Voltchenko, Valeri Beck, Dr. Tatiana Demina, Natalie Asselborn, die zum Gelingen dieser and anderer Arbeiten beigetragen haben, sei gedankt.

Bei der Forschungskommission der Charité möchte ich mich für die schnelle unbürokratische Hilfe bei der Etablierung meiner Forschungsgruppe nach dem Umzug nach Berlin bedanken.

Zu Dank verpflichtet bin ich allen Kooperationspartnern für vielfältige Anregungen und Diskussionen. Herr PD Dr. Petr Jezek und sein Mitarbeiter Dr. Martin Jaburek (Akademie der Wissenschaften, Prag) sowie Dr. Richard K. Porter und Eamon P. Breen (Trinity College Dublin, Irland) stellten rekombinante Proteine zur Verfügung. Frau Eva Urbánková hat als Gastwissenschaftlerin in Berlin wesentlich zu dem ersten UCP-Artikel

beigetragen. Als sehr fruchtbar und gewinnbringend habe ich die Zusammenarbeit mit mehreren Forschungsgruppen und Wissenschaftlern der Charité sowie mit früheren Charité-Mitarbeitern empfunden. Vor allem gilt mein Dank Frau Professor Dr. Frauke Zipp und Herrn PD Dr. Orhan Aktas (Cecilie-Vogt-Klinik für Molekulare Neurologie), Herrn Dr. Metin Artuc (Klinik für Dermatologie), Herrn Dr. Andrzej Stepulak (Klinik für Pädiatrische Neurologie, Technische Universität, Dresden).

Ich danke den Kolleginnen und Kollegen unseres Institutes, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Olaf Ninnemann, Frau Professor Dr. Anja Bräuer, Herrn Dr. Sven Hendrix, Herrn Dr. Stefan Schumacher, Herrn Dr. Gregory Wulczyn und Frau Dr. Christine Brand für stimulierende Diskussionen und Hilfe in vielfältiger Weise. Dr. Karl Roth, Frau Marni Pollrich, Frau Kimberly Mason, Herr Peter Köhler und André Gronau waren stets sehr hilfsbereit bei der Bewältigung verschiedener organisatorischer und bürokratischer Schwierigkeiten.

Ich danke allen, die mich in verschiedenen Etappen meiner wissenschaftlichen Arbeit mit Wort und Tat unterstützt haben, insbesondere Herrn Professor Dr. J. Holtz (Institut für Pathophysiologie, Martin-Luther Universität, Halle/Saale), Herrn Professor Dr. H.-C. Pape (Institut für Physiologie, Universität Magdeburg, jetzt Institut für Physiologie, Universität Münster), Herrn Professor Dr. U. Heinemann (Institut für Physiologie, Charité-Universitätsmedizin, Berlin), PD Dr. Erich Knop (Klinik für Augenheilkunde, Charité).

Für ihre stetige moralische Unterstützung und tatkräftige Hilfe danke ich vom ganzen Herzen meinen Eltern (Svetlana N. und Eduard I. Rozhok), Schwiegereltern (Lilli und Achim Pohl), Tochter Mascha und Ehemann Peter.

IX. Eidesstattliche Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.