



Doctoral Thesis

## Formation of lipid bilayers with high densities of membrane proteins for functional studies

**Author(s):**

Demarche, Sophie

**Publication Date:**

2013

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010099161> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 21308

# **Formation of lipid bilayers with high densities of membrane proteins for functional studies**

A dissertation submitted to  
ETH ZURICH

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by  
SOPHIE DEMARCHE  
Ingénieure en Biotechnologie /  
Diplom Biotechnologin,  
Ecole supérieure de biotechnologie Strasbourg (ESBS)

Born March 22, 1985  
Citizen of France

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Janos Vörös, examiner  
Dr. Louis Tiefenauer, co-examiner  
Prof. Dr. Michael Hennig, co-examiner

2013

## Abstract

Plasma membranes are the “borders” of the cells and maintain the cells’ integrity. Protein integrated into these lipid membranes allow molecules such as nutrients and degradation products to enter or exit the cell, but also signal transduction to the cell. These membrane proteins have thus a very important biological role. Consequently, their study is of high importance, as reflected by the Nobel Prize 2012 that acknowledged the study of G protein-coupled receptors by Kobilka and Lefkowitz. Membrane proteins have also a very important pharmacological role. They represent about 60 % of all protein drug targets and their deregulation can lead to diseases, e.g. cancer or cardiovascular and psychotic diseases. Therefore, functional assays to study membrane protein function and to identify novel drugs are of high importance. Nowadays, several functional assays are used in academical and in pharmaceutical laboratories out of which the patch-clamp technique is the gold standard method. However, in some cases, lipid and protein compositions need to be varied. Thus artificial lipid bilayers are the method of choice. First artificial lipid bilayers were developed in the early 1960s and a lot has been achieved since then. However, integration of membrane proteins into these artificial lipid bilayers is still a limiting step.

In this thesis, protein integration into artificial bilayers using ion channels was investigated. The most widely used technique to form artificial lipid bilayers containing membrane proteins, is painting the lipid bilayer followed by fusion of proteoliposomes, which comprise the protein of interest. This technique was successfully applied on a silicon chip. However, the inherent limitations of the system, the low protein density, directed the further work toward the formation of protein-tethered lipid bilayers. The formation of protein-tethered lipid bilayers using poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) (PLL-g-PEG) functionalized with nitrilotriacetic acid – PLL-g-PEG-NTA was first investigated on solid support and then on a polyelectrolyte multilayer-sprayed pore. The His-tagged membrane proteins were first immobilized to the NTA group, and following the lipid bilayer was formed around these proteins. The main advantage of the use of a pore is the possible access to both sides of the membrane protein and thus the possibility of adding effectors on the extracellular or on the intracellular side of the protein. Our results suggest successful formation of a protein-tethered bilayer on a nonporous as well as on a porous surface. Furthermore, polymers, grafted on the pore wall, were used as a support. They presented the advantage to be more robust than the polyelectrolyte multilayer sprayed in the pore. In this thesis, ion channels were used to allow a test of functionality after the bilayer formation. The ion channel activity measurements were partially successful for the protein-tethered bilayer technique and further investigations are necessary. Yet,

the developed techniques present considerable application potential for the development of new versatile assays for His-tagged membrane proteins, may it be ion channels, transporters or receptors.

## Résumé

Les membranes plasmiques sont les “frontières” des cellules et maintiennent leur intégrité. Les protéines contenues dans ces membranes lipidiques permettent aux molécules, tels les nutriments ou produits de dégradation, d’entrer ou de sortir de la cellule, mais également aux signaux d’être perçus et transmis à l’intérieur de la cellule. Ces protéines membranaires ont donc un rôle biologique très important et leur étude est par conséquent cruciale, comme en témoigne l’attribution du prix Nobel 2012 à Kobilka et Lefkowitz pour leurs travaux sur les récepteurs couplés aux protéines G. Les protéines membranaires ont aussi une grande importance pharmacologique étant donné que leur dérégulation ou leur mauvais fonctionnement sont à l’origine de nombreuses maladies telles que le cancer et des maladies cardiovasculaires ou psychotiques. C’est pourquoi elles représentent environ 60 % des cibles médicamenteuses protéiques et les tests fonctionnels pour étudier leur fonction et identifier de nouveaux médicaments suscitent un grand intérêt. Actuellement, plusieurs tests fonctionnels sont utilisés dans les laboratoires académiques ou pharmacologiques, mais le patch-clamp est la méthode de référence. Cependant, dans certains cas, les compositions lipidiques et protéiques doivent être variées et les bicouches lipidiques artificielles sont alors la méthode de choix. Les bicouches lipidiques artificielles ont d’abord été développées au début des années 60, et depuis, de nombreux résultats ont été obtenus. L’intégration de protéines membranaires au sein de ces bicouches artificielles reste néanmoins le facteur limitant.

Dans cette thèse, l’intégration de protéines dans des bicouches lipidiques artificielles a été étudiée à l’aide de canaux ioniques. La technique la plus utilisée pour la formation de bicouches lipidiques artificielles contenant des protéines consiste à former la membrane par application de lipides dissous dans un solvant organique, puis à fusionner des protéoliposomes contenant la protéine d’intérêt. Cette technique a été appliquée avec succès à une puce en silicone; cependant les limitations inhérentes à ce système concernant la densité protéique ont orienté les futurs travaux vers la formation de bicouches lipidiques ancrées aux protéines.

Dans un premier temps la formation de bicouches lipidiques ancrées aux protéines à l’aide de poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) ( PLL-g-PEG) fonctionnalisé avec de l’acide nitriloacétique -PLL-g-PEG-NTA- a été étudiée sur un support solide, puis sur un pore préalablement rempli d’une multicouche de polyélectrolytes. Des protéines membranaires contenant une étiquette poly-histidine ont tout d’abord été immobilisées sur le groupe NTA, ce qui a permis la formation d’une bicouche lipidique autour de ces protéines. Le principal avantage de l’utilisation d’un pore est l’accès possible aux deux

côtés de la protéine membranaire, et de ce fait, la possibilité d'ajouter un effecteur de son côté intra ou extracellulaire. Nos résultats suggèrent le succès de la formation de bicouches lipidiques ancrées aux protéines, à la fois sur un support poreux ou non poreux. Dans un deuxième temps des polymères entés sur la paroi des pores ont également servi de support. Ils présentent l'avantage d'être plus robustes que la multicouche de polyélectrolytes. Dans cette thèse, des canaux ioniques ont été utilisés pour tester la fonctionnalité des protéines après la formation de la bicouche lipidique. Les mesures d'activité de canaux ioniques ont montré un succès partiel et des investigations supplémentaires sont nécessaires.

Les techniques développées ont un fort potentiel d'applications pour le développement de nouveaux tests fonctionnels versatiles pour les protéines membranaires ayant une étiquette poly-histidine, que ces protéines soient des canaux ioniques, des transporteurs ou des récepteurs.