

**BIOPHYSIKALISCHE UNTERSUCHUNG
DER WECHSELWIRKUNG VON
AMYLOIDOGENEN PEPTIDEN UND
SIGNALPROTEINEN MIT MEMBRANEN**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

eingereicht beim

Fachbereich Chemie

der Technischen Universität Dortmund

von

M.Sc. Andrea Gohlke

aus

Uelzen, Deutschland

2010 Dortmund

Erster Gutachter: Prof. Dr. R. Winter

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. H. Mootz

„Ihrer wahren Wesensbestimmung nach ist die
Wissenschaft das Studium der Schönheit der Welt.“

Simone Weil (1909-43), frz. Philosophin

für Florian und meine Eltern

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Dortmund, den

Andrea Gohlke

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	8
1.1	Biologische und Modellmembranen.....	8
1.1.1	Lipide in biologischen Membranen	8
1.1.2	Modell-Lipid-Membranen	9
1.1.3	Lipidklassen.....	11
1.1.4	Lipidphasen und Mikrodomänen	13
1.2	Amyloidbezogene Krankheiten	17
1.2.1	Die Rolle von Lipiden in der Amyloidbildung	20
1.2.2	Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP)	21
1.2.2.1	Inhibition der zytotoxischen Wirkung des hIAPP.....	25
1.2.3	Zelluläre Modelle für die Diabetes Typ II- Forschung	26
1.3	Ras – eine kleine GTPase	28
1.3.1	Die Ras-Superfamilie.....	28
1.3.2	Die Ras-Isoformen und ihre Wechselwirkung mit Membranen	30
1.4	Motivation und Ziel der Arbeit	36
2	MATERIALIEN UND METHODEN	38
2.1	Materialien	38
2.2	Methoden.....	40
2.2.1	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	40
2.2.1.1	Durchführung der FCS-Experimente:	43
2.2.2	Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie.....	44
2.2.2.1	Durchführung der IRRAS-Experimente.....	47
2.2.3	Isolation der Plasmamembran.....	49
2.2.4	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie	50
2.2.4.1	Durchführung der SPR-Experimente	54
2.2.5	<i>Stopped-Flow</i> -Messungen	59
2.2.5.1	Durchführung der <i>Stopped Flow</i> Experimente.....	60
2.2.6	Zytotoxizitäts-Assay	61
2.2.6.1	Kultivierung von INS-1E Zellen	61
2.2.6.2	Der WST-1 Zell-Proliferations-Test	62

2.2.6.2.1	Die Durchführung des WST-1 Tests.....	64
2.2.6.3	Isolierung von hIAPP-Oligomeren und ihre Zytotoxizität	64
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	66
3.1	Membranwechselwirkung und Zytotoxizität des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP).....	66
3.1.1	Mechanismus der IAPP-Fibrillenbildung an der Lipid-Grenzfläche (IRRAS)	66
3.1.1.1	Diskussion	75
3.1.2	Die Zytotoxizität von IAPP und ihre Inhibierung	77
3.1.2.1	Zytotoxizität der IAPP-Oligomere und Fibrillen.....	78
3.1.2.1.1	Diskussion	81
3.1.2.2	Resveratrol als Inhibitor der hIAPP-Zytotoxizität.....	82
3.1.2.2.1	Diskussion	83
3.1.3	Isolation der Plasmamembran aus INS-1E-Zellen	84
3.1.3.1	Diskussion	85
3.2	Wechselwirkungen der Ras-Isoformen mit Membranen	87
3.2.1	Ladungsabhängiges Bindungsverhalten von H-Ras und K-Ras4B an Membranen (SPR)	87
3.2.1.1	Diskussion	91
3.2.2	Adsorptionsverhalten und Orientierung von N-Ras an Lipidgrenzflächen (IRRAS).....	93
3.2.2.1	Diskussion	97
3.2.3	Einfluss des Lipidankermotivs von N-Ras auf die Wechselwirkung mit Membranen (SPR).....	100
3.2.3.1	Diskussion	111
3.2.4	Assoziationskinetik von N-Ras HD/Far (GDP) an fluide Membranen (<i>Stopped Flow</i>)	116
3.2.4.1	Diskussion	118
3.3	Entwicklung einer Temperaturzelle für FCS-Messungen.....	119
3.3.1.1	Diskussion	122
4	ZUSAMMENFASSUNG	124
5	LITERATURVERZEICHNIS	127
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	139
7	DANKSAGUNG	142
8	LEBENS LAUF UND PUBLIKATIONEN	143

9 ANHANG	144
-----------------------	------------

1 Einleitung

1.1 Biologische und Modellmembranen

1.1.1 Lipide in biologischen Membranen

Biologische Membranen dienen als Barriere zwischen dem internen und externen Milieu der Zellen und ihren Organellen. Aufgrund ihres Aufbaus ist sie semipermeabel. Eine biologische Membran besteht aus Proteinen, Lipiden und zum Teil Zuckern, welche an Proteine oder Lipide gebunden sind. Das Verhältnis von Protein zu Lipid in einer Membran variiert abhängig von der Art der Zelle bzw. Organelle. Im Allgemeinen liegt der Lipidgehalt bei 40 bis 60 % [1]. Jede entsprechende Membran weist eine eigene höchst komplexe Struktur auf [2]. Bis heute ist die Membran trotz zahlreicher Untersuchungen weitaus weniger verstanden als beispielsweise Proteine oder DNS (Desoxyribonukleinsäure) [3].

Ein Modell vom Aufbau einer Membran wurde von Singer und Nicholson entworfen und wird als „Flüssig-Mosaik-Modell“ bezeichnet [4]. In diesem wird die Membran als Lipiddoppelschicht mit einer Dicke von 4-5 nm beschrieben, in der Proteine als periphere oder integrale Bestandteile eingelagert sind. Die einzelnen Komponenten der Membran weisen eine hohe Beweglichkeit auf. So beträgt der laterale Diffusionskoeffizient eines Lipidmoleküls ungefähr $10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Weiterhin können sich Lipide durch Rotation um ihre Längsachse oder durch Umklappen von der einen zur anderen Lipidschicht (Flip-Flop-Mechanismus) bewegen [1]. Das Flüssig-Mosaik-Modell wurde zudem erweitert, da die Existenz von so genannten „*Lipid Rafts*“ festgestellt worden ist [5]. Diese Membranmikrodomänen von wenigen Nanometern Durchmesser bestehen aus mit Cholesterin (Chol) und Glycosphingolipid angereicherten Bereichen in der Membran. Es wird angenommen, dass diese Domänen an der Regulierung von verschiedenen membran-assoziierten Signaltransduktionswegen, wie z.B. bei endozytotischen Vorgängen [6], intrazellulären Transporten [7] oder der Ras (Ratten Adenosarkom Protein)-Signal-Kaskade [8] beteiligt sind.

1.1.2 Modell-Lipid-Membranen

Um die zahlreichen Eigenschaften von biologischen Membranen besser verstehen und untersuchen zu können, werden künstliche Membranen hergestellt, in welche einzelne Eigenschaften, wie z.B. negative Ladung, gezielt und kontrolliert eingebracht werden können. Hierdurch ist es möglich, Vorgänge an der Membran mit Hilfe von physikalischen Methoden zu untersuchen und somit Informationen über das Phasenverhalten, die Funktion von Proteinen und über Protein-Lipid-Wechselwirkungen zu erhalten. Modell-Lipidmembranen können in unterschiedliche Formen unterteilt werden. So können planare oder auch sphärische Membranen durch unterschiedliche Verfahren hergestellt werden Abb. 1.1.

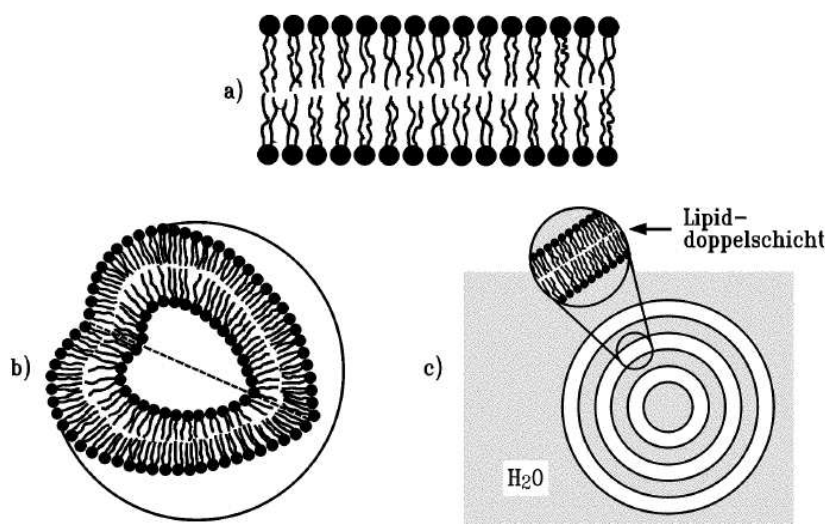


Abb. 1.1: Doppelschichtstrukturen von Phospholipiden a) planare Doppelschicht; b) unilamellares Vesikel; c) multilamellares Vesikel [1].

Die effektive Form eines Lipidmoleküls wird sowohl durch die Größe der Kopfgruppe als auch durch die Länge der anhängenden Alkylketten bestimmt. Diese Form in Zusammenhang mit seiner Fähigkeit, bestimmte Lipidaggregate zu bilden, wird durch den kritischen Packungsparameter CPP beschrieben:

$$CPP = \frac{V}{l \cdot A} \quad (1.1)$$

Hierbei beschreibt V das Volumen, A die Fläche der Kopfgruppe und l die Länge der Acylketten. Ist CPP kleiner als $1/3$, kommt es zur Mizellenbildung. Bei einem kritischen Packungsparameter zwischen $0,5$ und 1 bilden sich Doppelschichten aus, wie dies bei Phosphatidylcholinen der Fall ist. Ab einem Wert von eins bilden sich inverse Mizellen aus [1].

Zur Herstellung von planaren Membranen werden meist festkörperunterstützte Mono- und Lipiddoppelschichten verwendet. Festkörperunterstützte Lipidmembranen können auf Substraten wie z.B. Glas, Siliziumoxid, Indiumzinnoxid (ITO), Glimmer, Platin, Gold, Polymeren oder auch Titanoxid hergestellt werden, wobei Monoschichten auch an der Wasser/Luft-Grenzfläche erzeugt werden können. Aufgrund ihrer starken Wechselwirkung mit dem Substrat weisen die so präparierten Membranen eine lange Haltbarkeit und mechanische Belastbarkeit auf. Zudem ist trotz der Immobilisierung eine laterale Beweglichkeit der Lipide, wenn auch eingeschränkt, gegeben. Es wurde berichtet, dass der Diffusionskoeffizient 2,5-fach niedriger ist als in Vesikeln [9]. Die so präparierten Membranen eignen sich besonders zur Grenzflächen-Analyse mit Hilfe von physikalischen Oberflächenmethoden.

Sphärische Membranen sind Mizellen und Liposomen, die aus einer oder mehreren Lipidschichten bestehen. Hierbei sind die Lipide konzentrisch um einen zentralen Wasserkern angeordnet. Sie wurden vor 35 Jahren zum ersten Mal beschrieben [10] und gelten heute als anerkanntes artifizielles Modell zur Beschreibung von biologischen Membranen und als Träger zur Verabreichung von Medikamenten [11]. Abhängig von der jeweiligen Präparationsmethode können unterschiedliche Arten an Liposomen hergestellt werden. So können Mizellen, bei denen sich Monoschichten um den Wasserkern anordnen, aber auch Vesikel, bei denen sich stattdessen eine oder mehrere Lipiddoppelschichten auf diese Weise organisieren, produziert werden. Vesikel können

aufgrund der Anzahl an vorhandenen Lipiddoppelschichten in zwei unterschiedliche Klassen unterteilt werden: Multilamellare Vesikel (MLV, Durchmesser: 30 nm bis 5 μm) und unilamellare Vesikel. Letztere werden aufgrund ihrer Größe in kleine unilamellare Vesikel (SUV, Durchmesser: 25 bis 90 nm), große unilamellare Vesikel (LUV, Durchmesser: >100 nm) und riesige unilamellare Vesikel (GUV, Durchmesser: 5 bis 100 μm) unterteilt [10]. Liposom-Lösungen können heutzutage für eine Vielzahl von Methoden, wie z.B. Kernspinresonanz (NMR) [12], Dynamische Differenz-*Scanning*-Kalorimetrie (DSC), Fluoreszenz-Spektroskopie und Transformationsinfrarotspektroskopie (FT-IR)-Spektroskopie [13], verwendet werden und dienen häufig auch als Vorstufe zur Präparation festkörperunterstützter Membranen.

1.1.3 Lipidklassen

Membranlipide weisen eine große chemische und strukturelle Vielfalt auf die unter anderem zur großen strukturellen und funktionalen Heterogenität der Membran beiträgt. Membranbildende Lipide können in unterschiedliche Klassen, namentlich Glycerophospholipide, Sphingolipide und Sterine, unterteilt werden [2] (Abb. 1.2).

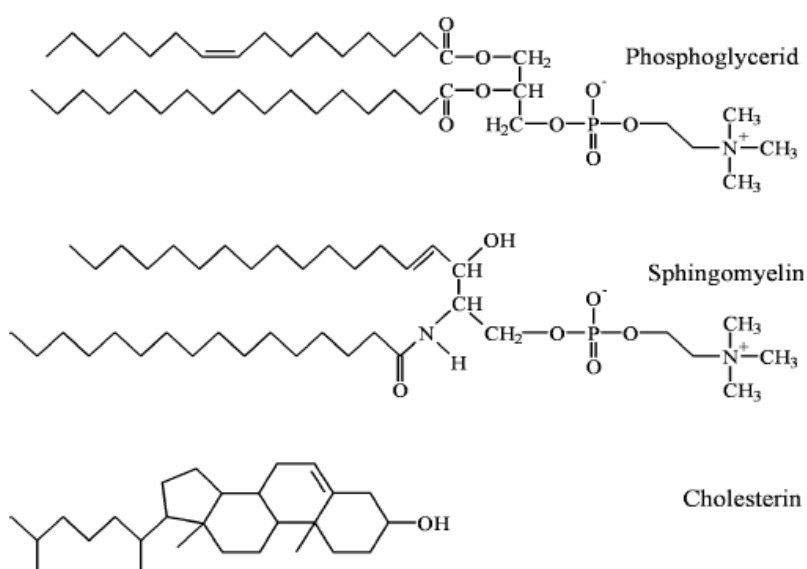


Abb. 1.2: Hauptklassen der membranbildenden Lipide.

Glycerophospholipide gelten als der wichtigste Bestandteil der Membranen. Sie umfassen in Eukaryonten hauptsächlich Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylinositole (PI) und Phosphorsäure (PA), welche sich alle in der polaren Kopfgruppe unterscheiden. Hierbei zeichnet sich PE durch eine besonders kleine Kopfgruppe aus, wodurch intrinsischer Krümmungsstress in der Membran induziert wird. Bei den Glycerophospholipiden PS, PI und PA handelt es sich um negative geladene Lipide. Der hydrophobe Anteil dieser Lipidklasse ist ein Diacylglycerol-Gerüst, welches gesättigte und *cis*-ungesättigte Fettsäureketten verschiedener Länge enthält. In den meisten eukaryotischen Membranen beträgt der zwitterionische PC-Anteil mehr als 50 % aller Phospholipide. Aufgrund seiner fast zylindrischen Geometrie bildet PC in Wasser spontan planare Doppelschichten. Die meisten PC-Lipide weisen eine *cis*-ungesättigte Fettsäure auf, die für ihre Fluidität bei Raumtemperatur verantwortlich ist. PE-Lipide hingegen weisen aufgrund ihrer kleinen Kopfgruppe eine konische Struktur auf. Die Einlagerung von PE in die Membran führt zu einer Induzierung von Krümmungsstress, welcher bei Vorgängen wie der Vesikelfusion eine große Rolle spielt. Es wird vermutet, dass diese Nicht-Doppelschichten-ausbildenden Lipide eine große Rolle bei der Aufnahme von Membranproteinen und der Modulierung ihrer Funktion spielen [14]. Weiterhin trägt der Krümmungsstress zu einer asymmetrischen Verteilung der Lipide in der Membran bei.

Sphingolipide hingegen besitzen ein Ceramid als Grundgerüst. Die häufigsten Sphingolipide in Säugerzellen sind das Sphingomyelin (SM) und das Glycosphingolipid, welche Mono-, Di- oder Oligosaccharide enthalten. Sie enthalten gesättigte (oder *trans*-ungesättigte) Alkylketten, so dass sie bei gleicher Kettenlänge eine größere und schmalere zylindrische Form aufweisen als PC-Lipide. Dies führt dazu, dass Sphingolipide eine dichtere Packung aufweisen und somit in einer rigiden Gel- oder s_0 -Phase vorliegen. Ihre Fluidität kann durch Zusatz von Sterinen moduliert werden.

Sterine bilden den Hauptanteil der nicht-polaren Lipide der Zellmembran. Hierbei ist Cholesterin vorwiegend in Säugerzellen vertreten, wohingegen Ergosterin meist in Hefen vorkommt. Der Cholesteringehalt in der Plasmamembran variiert zwischen 20 und 50 %, wohingegen der Gehalt in den Membranen der Organellen weniger als 10 %

beträgt. Cholesterin besteht aus einer starren steroiden Ringstruktur und einer Hydroxylgruppe (Abb. 1.2) und beeinflusst die Fluidität der Membran [3]. Es bildet eigenständig keine Doppelschichten aus [2].

1.1.4 Lipidphasen und Mikrodomänen

Das Phasenverhalten einer Membran bestimmt Eigenschaften wie Durchlässigkeit, Fusionsneigung und Affinität zur Proteinbindung. Abhängig von der Zusammensetzung der Membran und seiner Umgebung können unterschiedliche Phasen in der Membran vorherrschen. Jede dieser Phasen weist bestimmte Eigenschaften auf, welche die Orientierung und Mobilität der Lipide und Proteine in der Membran und somit auch ihre funktionalen Eigenschaften beeinflussen können. Es wird vermutet, dass Membranproteine das Phasenverhalten der Lipide und Lipid-Lipid-Wechselwirkungen modifizieren, bzw. kontrollieren [2]. Folgend wird hauptsächlich auf die lamellaren Phasenzustände eingegangen, wie sie auch in der Biomembran vorkommen. Phasenzustände, die nicht in den normalen Doppelschichten vorkommen, wie hexagonale oder kubische Phasen, sind Übergangszuständen, wie z.B. im Verlauf der Membranfusion, zuzuordnen. Die Eigenschaften einer bestimmten Phase sind abhängig von der jeweiligen Struktur des Lipids. Reine Phospholipid-Doppelschichten können zum Beispiel in verschiedenen Phasen existieren. Die Phasen-Übergangstemperatur (T_m) beschreibt den Phasenübergang von einer dicht geordneten Gel- oder festen Phase (s_o) zu einer flüssig-kristallinen Phase (L_a , bzw. l_d) [3]. Sie wird auch als Hauptübergangstemperatur bezeichnet und ist abhängig von der Länge der Acylketten und dem Grad der Sättigung. Bei niedrigen Temperaturen bilden die Lipide gestreckte *all-trans* Ketten. Mit steigender Temperatur bilden sie *gauche*-Konformere, wodurch sich die Querschnittsfläche erhöht, die Länge der Acylketten verkürzt und sich somit die Dicke der Membran verringert. Sobald mehr als eine Lipidart vorliegt, führt dies zu einem komplizierteren Phasenverhalten. Es existiert dann nicht mehr eine wohl definierte Hauptübergangstemperatur, die Phasenübergänge erstrecken sich viel mehr über einen weiteren Temperaturbereich, wobei es zur Existenz von mehr als einer Phase, also Phasenkoexistenzbereichen, kommt. Vor allem die Zugabe von Cholesterin kann das Phasenverhalten einer Membran drastisch verändern. Bei geringer

Konzentration zeigt es keine Phasenpräferenz. Beträgt der Anteil an Cholesterin allerdings mehr als 25% induziert es in der flüssigen Phase eine höhere Ordnung und bricht in der festen Phase die Kristallinität auf. Hierdurch kommt es zur Bildung einer neuen Phase, der flüssig-geordneten Phase (l_o) (Abb. 1.3). Diese Phase hat die Ordnungseigenschaften einer festen Phase, weist aber zusätzlich auch die hohe translationale Mobilität einer flüssigen Phase auf [15]. Durch ihre starre geordnete Natur führt die l_o -Phase zu einer reduzierten Permeabilität der Membran im Vergleich zur l_d -Phase.

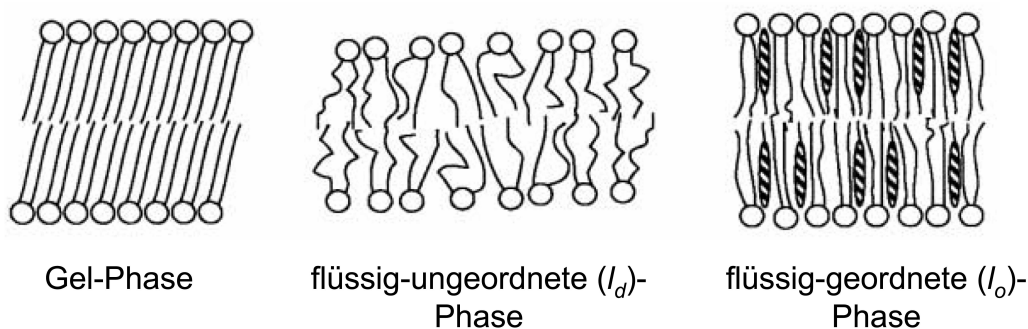


Abb. 1.3: Phasen in der Membran [16].

Bezogen auf die bereits erwähnten Lipidklassen bilden Sphingomyelin-reiche Mischungen eher feste Phasen aus, wohingegen Glycerophospholipide eher in flüssigen Phasen zu finden sind. Sterine selbst bilden keine doppelschichtigen Phasen, können aber in Kombination mit anderen Doppelschicht-ausbildenden Lipiden flüssig-geordnete (l_o) Phasen bilden [2]. Hierbei variiert die Affinität des Cholesterins abhängig von den polaren Kopfgruppen und der Struktur der Alkylketten der umgebenen Lipide. Es lagert sich eher an Sphingolipide als an Phosphatidylcholine an, wobei hierbei die Affinität mit der Anzahl der ungesättigten Bindungen sinkt. Somit kommt es bei einer Mischung aus PC, SM und Cholesterin zur Bildung von cholesterinarmen l_d -Phasen und cholesterinreichen l_o -Phasen, was die Hypothese der Bildung von cholesterinreichen *Raft*-Domänen unterstützt [17-19].

Die Existenz von Mikrodomänen konnte bereits *in vitro* in Vesikelmembranen bestehend aus drei Lipid-Komponenten-Mischungen unterhalb einer gewissen Mischungsübergangstemperatur T_{mix} nachgewiesen werden. Sie ist abhängig von der Art der zugesetzten Lipidarten. So weisen Membranen mit Lipiden, die eine hohe Übergangstemperatur T_m aufweisen (wie SM oder DPPC(1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-

3-Phosphocholin)) einen hohen Anteil an l_o -Phase und somit eine hohe Mischübergangstemperatur auf, wohingegen Membranen mit Lipiden, die eine niedrige Phasenübergangstemperatur besitzen (wie POPC (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin) oder DOPC (1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin)) einen hohen Anteil an l_d -Phase und damit auch eine niedrigere Mischübergangstemperatur aufweisen. Die Anteile jeder Phase hängen aber auch wesentlich von der vorliegenden Temperatur ab. Zwei gute Beispiele für eine solche ternäre Lipidmischung sind zum einen das Lipidsystem POPC/BSM (Sphingomyelin aus dem Hirn)/Chol (2:1:1) [20, 21] (Abb. 1.4) und zum anderen DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) [18, 22] (Abb. 1.5), welche in den angegebenen molaren Mischungsverhältnissen bei Raumtemperatur Phasenkoexistenz von l_d - und l_o -Phasen zeigen.

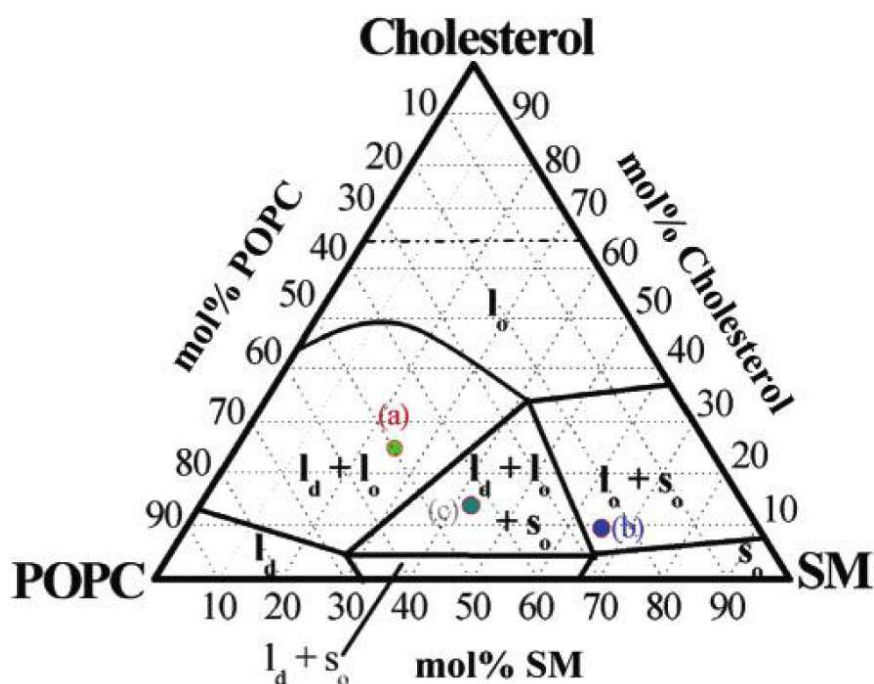


Abb. 1.4: Phasendiagramm der Lipidmischung POPC, SM und Cholesterin bei 23°C [21] (modifiziert nach [20]).

Es wird vermutet, dass die Koexistenz von l_d - und cholesterinreichen l_o -Phasen eine wichtige Bedeutung für die Funktion und Lokalisierung von verschiedenen intergalen und peripheren Membranproteinen hat.

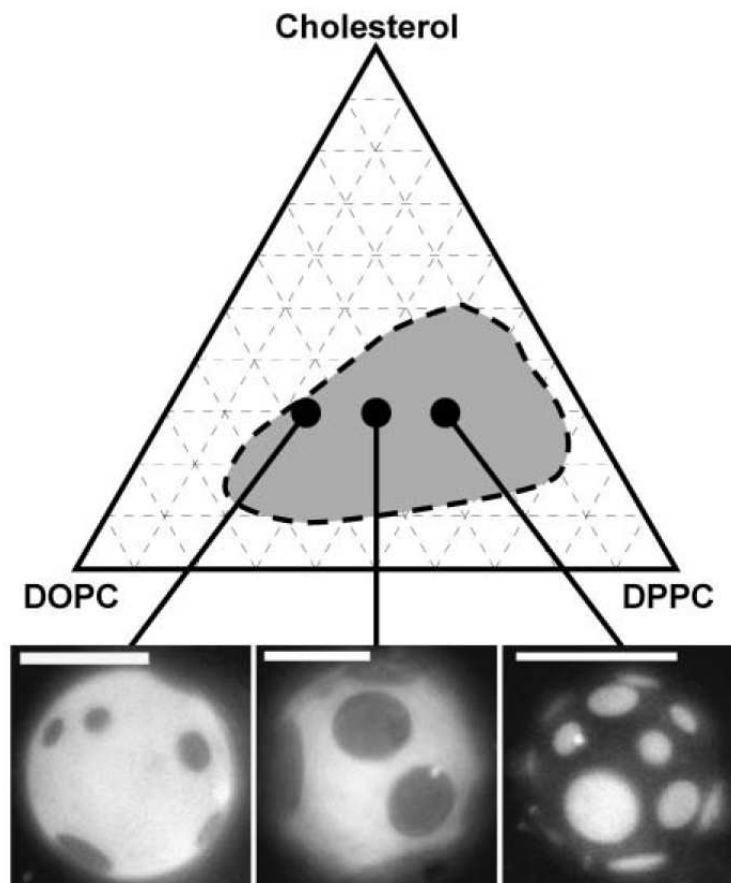


Abb. 1.5: Oben: Skizze der Phasengrenzen der ternären Lipidmischung DOPC, DPPC und Cholesterin bei 25°C. Unten: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GUVs mit 30 % Cholesterin in Mischung mit 2:1 DOPC/DPPC, 1:1 DOPC/DPPC und 1:2 DOPC/DPPC [18, 22].

1.2 Amyloidbezogene Krankheiten

Heutzutage sind viele Peptide und Proteine bekannt, die durch ihre Aggregations-Eigenschaften konformelle bzw. amyloide Krankheiten hervorrufen bzw. mit beeinflussen können. Hierzu zählen Krankheiten wie z.B. Diabetes Mellitus Typ II (DMT2), Alzheimer, Parkinson und Kreuzfeld-Jacob (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Amyloide Peptide/Proteine und die mit ihnen assoziierten Krankheiten

Amyloides Peptid/Protein	Krankheit
Amylin (hIAPP)	Diabetes Mellitus Typ II
α -Synuklein	Parkinson
β -Amyloid (A β) und τ	Alzheimer
Huntingtin	Chorea Huntington

Obwohl die zugehörigen Peptide/Proteine unterschiedliche Primärstrukturen aufweisen, bilden sie jedoch alle fibrilläre Polypeptid-Aggregate, so genannte amyloide Fibrillen-Netzwerke (Amyloide) aus [23]. Amyloide lagern sich in den Geweben ab und tragen zur Symptomatik der jeweiligen Krankheit bei. Diese Form der Aggregation ist resistent gegen den Abbau durch Proteasen und stellt eine extrem stabile und nahezu unlösliche Struktur dar [24]. Amyloide Fibrillen weisen alle ein Grundgerüst aus antiparallelen β -Faltblättern auf, die in einer β -Kreuz-Überstruktur angeordnet sind (Abb. 1.6). Ihre Größe liegt meist im Nanometer-Bereich [25, 26]. Es wird angenommen, dass ihre β -Kreuz-Struktur die energetisch günstigste Form für aggregierte Proteine ist [27] und dass deren Bildung durch intrinsische Eigenschaften des Peptids häufig unter normalen Umständen unterdrückt wird [28, 29]. Allgemein gelten Amyloide als nicht-native komplexe Strukturen, die als Folge eines Defekts in der nativen Faltung oder aufgrund fehlerhafter Proteindegradation entstehen [26].

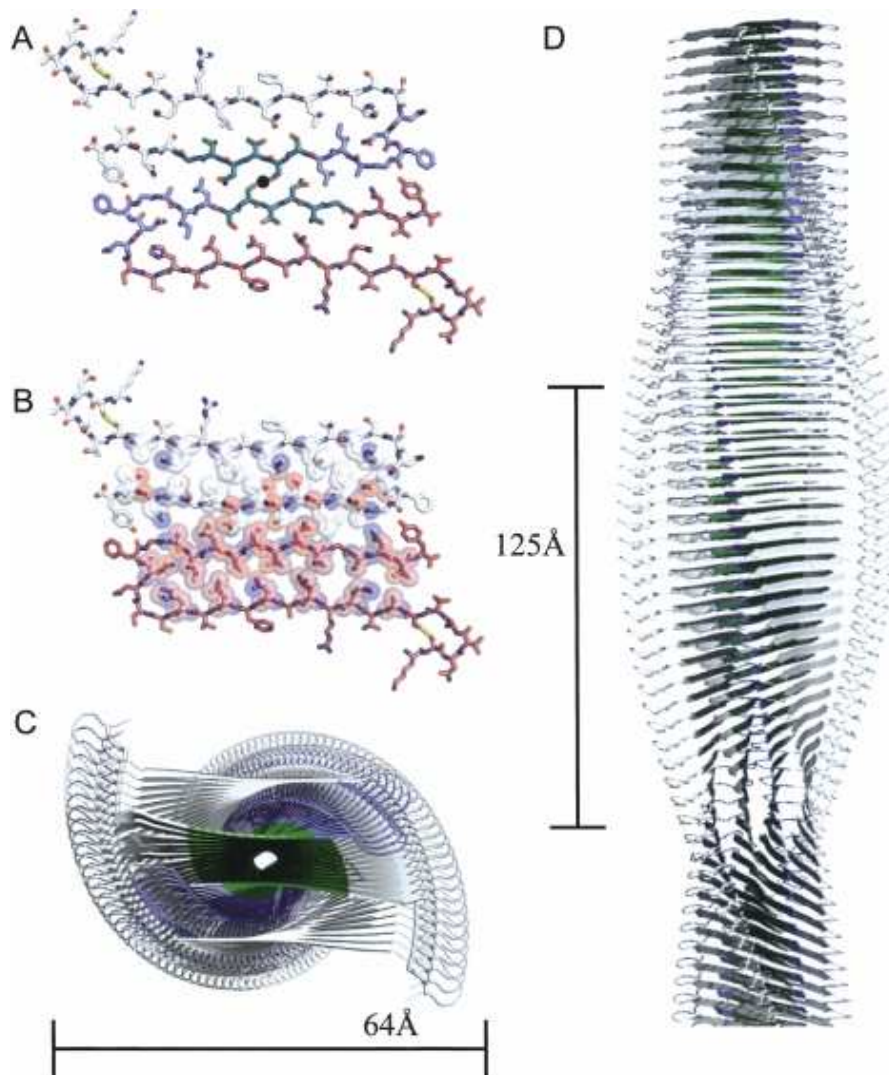


Abb. 1.6: Struktur einer hIAPP (Humanes Insel-Amyloides Polypeptid)-Fibrille basierend auf der Kristallstruktur der Sequenzen NNFGAIL und SSTNVG. (A) Ansicht entlang der Fibrillenachse von zwei IAPP-Molekülen (gezeigt durch schwarzen Punkt). (B) Die raumfüllende Darstellung zeigt die enge Packung in der Grenzfläche zwischen den beiden hIAPP-Molekülen im Bereich der Aminosäuren 23 bis 37. (C) Ansicht entlang der Fibrillenachse mit einem Durchmesser von 64 Å. (D) Ansicht senkrecht zur Fibrillenachse [30].

Bei der Bildung der amyloiden Fibrillen handelt es sich nicht um einen Ein-Schritt-Mechanismus, sondern es wird angenommen, dass die Bildung über eine große Anzahl verschiedener intermediärer Zustände verläuft (Abb. 1.7). Die Eigenschaften dieser intermediären Spezies, wie z.B. ihre Struktur und Zytotoxizität, sowie benötigte Kofaktoren, ihre Wechselwirkungen mit Membranen und auch die Inhibierung der Fibrillenbildung zählen bis heute zu den kaum verstandenen Themen der Amyloid-Forschung.

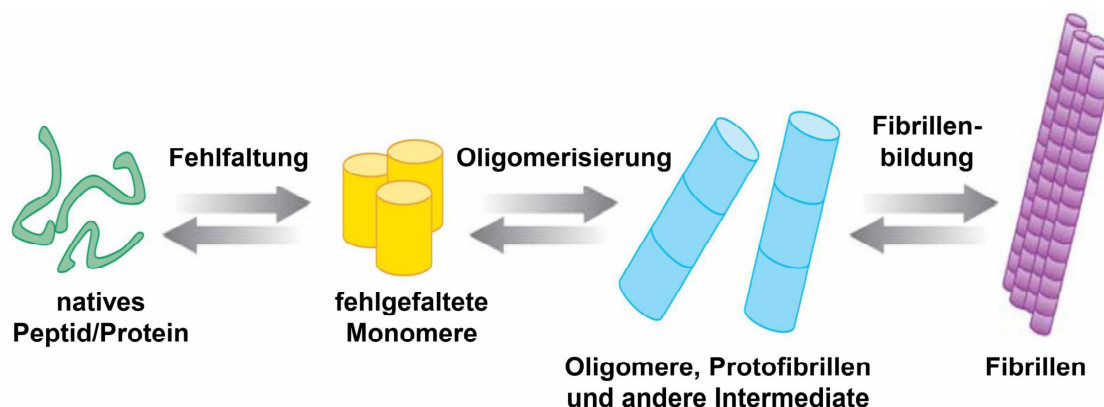


Abb. 1.7: Modell der Protein/Peptid-Fehlfaltung und amyloiden Fibrillenbildung (modifiziert nach [31]).

Zur Beschreibung des genauen Ablaufs der Fibrillenbildung gibt es verschiedene Hypothesen, wie unter anderem der allgemeine Mechanismus der Vorlagenstruktur-abhängigen und unabhängigen Zusammenlagerung [32], die nukleationsinduzierte Polymerisierung [33], die diffusionskontrollierte Aggregation [34], die monomergerichtete Umwandlung und die Nukleierung-Konformations-Konvertierung [35] oder auch das Modell der konzertierten zweistufigen Fibrillenbildung [36].

Bei der nukleationsinduzierten Polymerisierung wird die Amyloidbildung in zwei Schritte unterteilt. Im ersten Schritt erfolgt eine langsame Nukleations-, bzw. „Lag“-Phase, unmittelbar gefolgt von einer Wachstumsphase. Während der ersten Phase bildet sich ein oligomerer Kern aus mehreren Monomeren bis zu einem kritischen Keim, der thermodynamisch instabil ist. Im zweiten Schritt erfolgt die Verlängerung durch zusätzliche Monomere, was zu einem energetisch günstigeren Zustand führt. Hierdurch kommt es zum Wachstum der Fibrille. Die Nukleation ist hierbei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt [37, 38]. Dieses Schema ist eins der meist verbreitetsten Modellen und gehört zur Gruppe der Vorlagenstruktur-abhängigen Modellen [32].

Das zweite mögliche Modell, die diffusionskontrollierte Aggregation wurde zuerst für β -Amyloid beschrieben [34]. Es besagt, dass sich Monomere spontan zu Oktameren zusammenlagern, welche dann durch Stapelung Fibrillen bilden. Ihre Verlängerung erfolgt dann durch diffusionskontrollierte Anlagerung von kleineren Fibrillen.

In weiteres neueres Modell, die konzertierte zweistufige Fibrillenbildung, beschreibt die Fibrillenbildung als zwei aufeinanderfolgende abgestimmte

Zusammenlagerungsprozesse der Monomere und der folgenden Oligomeren. Dieser schließt sich eine strukturelle Umordnung innerhalb der Oligomere an, die als Wachstumseinheit der Fibrille dient. Dieses Modell gehört also zu den Vorlagenstruktur-unabhängigen Prozessen [32, 36].

1.2.1 Die Rolle von Lipiden in der Amyloidbildung

Es wurde gezeigt, dass bei an Amyloidose erkrankten Personen ein hoher Lipidanteil in den amyloiden Ablagerungen gefunden wurde [39, 40]. Aus diesem Grund kann darauf geschlossen werden, dass die Präsenz der Plasmamembran, bzw. von Lipiden im Allgemeinen, einen großen Einfluss auf die Bildung und Toxizität der amyloiden Fibrillen hat und daher die Untersuchung von Lipid-Peptid/Protein-Wechselwirkungen eine große Bedeutung in der Amyloid-Forschung hat. Es handelt sich demnach um eine membranvermittelte Protein-Fibrillenbildung [41]. Es wurde zudem gezeigt, dass die Interaktion von amyloiden Proteinen zusätzlich auch einen Einfluss auf die Membranstruktur hat und es sich demnach um eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Reaktionspartner handelt [42]. In *in vitro* Studien wurde bereits diese Art von Wechselwirkungen nachgewiesen [43, 44]. Es wird vermutet, dass es durch Bindung des amyloiden Proteins an die Membran zu einer Akkumulation des Proteins an der Zelloberfläche kommt und somit eine Aggregation und Penetration in die Membran favorisiert wird. Hierdurch wird die Tendenz des Proteins zur Nukleation verstärkt. Berichten zufolge kommt es durch Bindung des Proteins an die Membran zu einer Porenbildung, wodurch die Integrität der Zellmembran zerstört wird [42]. Der genaue Ablauf dieses Mechanismus ist bis heute jedoch ungeklärt und ein aktuelles Thema in der Amyloid-Forschung. Die Analyse verschiedener Arten von amyloiden Ablagerungen zeigte, dass sich in diesen meist die gleiche Art von Lipiden befand. So wurde ein erhöhter Anteil an stark hydrophoben Lipiden, wie Cholesterol, aber auch kleine Anteile an Glycerophospholipiden wie PC und PE gefunden [39]. Aus diesem Grund wird auch auf einen Zusammenhang mit „*Lipid Rafts*“ geschlossen [40]. Es wurden weiterhin auch Anteile von Lysophosphatidylcholin (lyso-PC), freien Fettsäuren

und Ceramiden gefunden, welche normalerweise nicht in der Plasmamembran, sondern eher beim Abbau von Geweben oder auch in nekrotischen Geweben vorkommen [39].

Zusätzlich wurde ein kinetischer Einfluss von hydrophoben Oberflächen, bzw. der Membran, auf die Fibrillenbildung nachgewiesen [45].

1.2.2 Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP)

Das humane Insel-Amyloid-Polypeptid (hIAPP), auch unter dem Namen Amylin bekannt, ist ein 37 Aminosäuren langes Peptid, welches unlösliche fibrilläre Ablagerungen im Pankreas von an Diabetes Mellitus Typ II erkrankten Personen bildet (Abb. 1.8). Es wird in den β -Zellen der Langerhans'schen Inselzellen im Pankreas als Spaltprodukt von ProIAPP produziert und zusammen mit Insulin co-sekretiert. Während der posttranslationalen Modifikation wird zwischen den Aminosäuren 2 und 7 eine Disulfidbrücke gebildet und das C-terminale Tyrosin amidiert. Ihm wird unter anderem eine Rolle als Hormon bei der Magenentleerung und Regulation der Glucose-Homöostase zugeschrieben [46], ist aber auch unter anderem an der Knochenerhaltung beteiligt [47].

		20		29	37
human IAPP	KCNTATCATQRLANFLVHS	SNNFGAI	LSS	TN	VG SNTY
rat IAPP	KCNTATCATQRLANFLV	RS	SNNLGPV	LPP	TN VG SNTY

Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenzen von hIAPP und rIAPP (Ratten-IAPP). Die hellgrau markierten Aminosäuren geben die besonders amyloidogene Sequenz an, die dunkelgrau markierten Aminosäuren geben die Sequenz-Unterschiede von hIAPP und rIAPP wieder.

Die eigentliche genaue physiologische Funktion des Peptids ist bis heute aber nicht vollständig aufgeklärt. Es wird vermutet, dass es spezifisch an membrangebundene Rezeptoren bindet [48]. Die Struktur des hIAPP ist eine der jeweiligen Spezies entsprechenden hochkonservierte Sequenz. Sie variiert unter den verschiedenen Spezies nur in wenigen Aminosäuren, die sich meistens in der Aminosäuresequenz 20 bis 29 befinden [49], wie z.B. beim nicht-amyloidogenen Ratten-IAPP (rIAPP) (Abb. 1.8).

Die amyloiden Ablagerungen des hIAPP wurden in mehr als 90% der an Diabetes Mellitus Typ II erkrankten Personen in den Langerhans'schen Inselzellen gefunden und werden mit dem Zelltod der β -Zellen in Verbindung gebracht [50], was zu einer Störung in der Blutzuckerregulation führt. Hierbei liegt vor allem die Wechselwirkung mit der Zellmembran im besonderen Interesse der hIAPP-Forschung.

Der genaue Mechanismus der hIAPP- Fibrillenbildung ist bis heute noch ungeklärt. Es wurden bisher verschiedene Stadien während der Aggregation, wie z.B. Monomere, Oligomere und Fibrillen (Polymere) identifiziert. Es wurde bereits beschrieben, dass es sich bei den letzten beiden Aggregationsformen um keine morphologisch homogenen Spezies handelt, sondern dass jede mehrere Untereinheiten verschiedener Größe und Form besitzt, die sich auch in ihrer Sekundär-, Tertiär- und auch Quartärstruktur unterscheiden [51]. Die genaue Definition von Oligomeren ist aufgrund ihrer variierenden Größen unklar [52]. Die Struktur der verschiedenen Aggregationspezies, ihre Zytotoxizität und ihre Wechselwirkung mit der Membran sind daher von besonderem Interesse. Die Struktur der Fibrillen ist im Vergleich zu anderen Amyloiden aufgrund ihrer stabilen und leichten Handhabung und Herstellung am besten verstanden. Sie können nicht durch Proteasen abgebaut werden und benötigen sehr aggressive Bedingungen für ihre Depolymerisierung, wie z.B. konzentrierte Ameisensäure [53]. Wie auch bei anderen Amyloiden bilden die Fibrillen des hIAPP verschiedene β -Kreuzstrukturen mit unterschiedlichen Morphologien aus [54-56], wie z.B. spulenartige oder auch bandartige Fibrillen. Ihre exakte Struktur an der Zellmembran ist Gegenstand der aktuellen Forschung, wobei es mehrere Hinweise gibt, dass der Aminosäuresequenz 20 bis 29 eine wichtige Rolle bei der Amyloidbildung zukommt [57].

Im Gegensatz zu den stabilen Fibrillen wird die Analyse der vorhergehenden Stadien, den Monomeren und Oligomeren, durch ihre instabile Natur in physiologischen Puffern und ihres schnellen spontanen Aggregationsvermögens erheblich erschwert. Bisher gibt es hauptsächlich *in vitro* Studien. In diesen wurden unter anderem transiente Spezies mit variierender Größe von 10 bis 20 bis zu 500 Monomeren identifiziert [58-62]. Es ist immer noch unklar, ob die gebildeten Oligomere als Zwischenprodukt zur Fibrillenbildung [59, 63] oder aber zu einem anderen Reaktionsmechanismus gehören [64, 65]. In mehreren CD (zirkuläre Dichroismus-Spektroskopie)- [66, 67] und NMR-

[68] Studien wurde gezeigt, dass hIAPP hauptsächlich intrinsisch ungefaltet vorliegt, wobei die Aminosäuren 8-19 transient eine α -helikale Struktur ausbilden können. Es wurde berichtet, dass sowohl die Bindung von Insulin als auch von Lipiden diese α -helikale Struktur induzieren kann [69, 70]. Des Weiteren wird vermutet, dass nicht die endgültig gebildeten Fibrillen, sondern eher die löslichen hIAPP-Oligomere die toxischen Spezies sind [65]. Über den Mechanismus ist noch wenig bekannt, es wird aber angenommen, dass sie bei Wechselwirkung mit der Membran diese durch Porenbildung permeabilisieren. Diese Beobachtung wurde zuerst im Jahre 1993 bei amyloiden A β -Oligomeren gemacht, die kationselektive Kanäle in planaren Lipiddoppelschichten bilden [71]. Kurz danach wurde dieser Mechanismus auch für andere amyloide Peptide/Proteine, wie hIAPP nachgewiesen [72-75]. Es gibt aber auch Hypothesen, die besagen, dass die Permeabilisierung durch oligomervermittelte Verformung und folgende Instabilität der Membran [58] oder auch rezeptorvermittelt [76] stattfindet, wobei letztere noch nicht für hIAPP gezeigt wurde. Auch die Struktur dieser Oligomere ist noch umstritten. So gibt es Studien, in denen sie als α -helikale Strukturen [63], in anderen Publikationen wiederum als β -faltblattreiche Strukturen [77] beschrieben werden. Zudem ist noch unklar, ob die Oligomer-Bildung an der Membran [78] oder in Lösung [75] stattfindet. In neuesten Studien wurde gezeigt, dass nicht eine bestimmte Oligomer-Spezies, sondern eher der Prozess der Fibrillenbildung aus den Oligomeren zur toxischen Wirkung führt [79]. In Abb. 1.9 sind die bisherigen Hypothesen zur Sekundärstruktur bezüglich des Mechanismus der Membranpermeabilisierung und der Fibrillenbildung aus Oligomeren zusammengefasst.

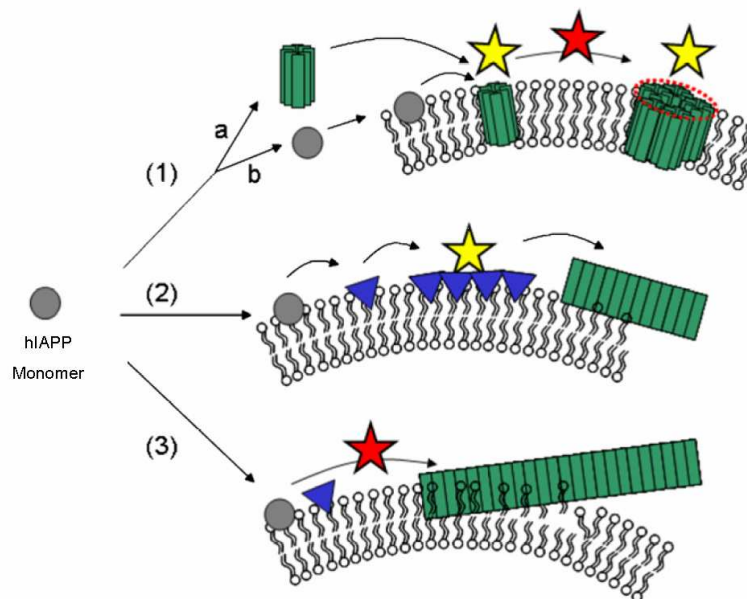


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der verschiedenen vorgeschlagenen Membran-Permeabilisierungen durch verschiedene hIAPP-Spezies. Grauer Kreis: unstrukturiert; blaue Dreiecke: α -Helix; grüne Rechtecke: β -Faltblatt, Stern: toxischer Prozess (gelb: durch toxische Spezies; rot: durch toxischen Prozess). Membranpermeabilisierung wird beschrieben durch: (1) Monomere oder β -Faltblatt-Oligomere; (2) unstrukturierte Monomere, die durch Umwandlung zu α -helikalen Strukturen ihre toxische Wirkung ausüben; (3) Monomere, die sich erst zu α -helikalen Strukturen umwandeln und die toxische Wirkung durch den Umwandlungsprozess zu den Fibrillen entwickeln [51].

Zum Anderen ist auch die Lokalisierung dieser Reaktion noch nicht bekannt. So gibt es Hinweise darauf, dass es sich bei der Amyloidbildung um einen extrazellulären Vorgang handelt. Im Gegensatz dazu besagen andere Studien, dass die Vorstufen der Fibrillen intrazellulär lokalisiert sind [80, 81].

Der Membran kommt in der hIAPP-Fibrillenbildung durch ihre katalytischen Eigenschaften eine entscheidende Rolle zu. Ihre Anwesenheit führt zu einer Verkürzung der Nukleationsphase, vor allem in Anwesenheit von negativ geladenen Lipiden [63, 82] oder auch hydrophoben Oberflächen [83]. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass bestimmte Grenzflächen einen erheblichen Einfluss auf die Fibrillenbildung, die Orientierung [69], ihre Konformation [84] oder auch auf ihre lokale Konzentration [85] haben. Da das N-terminale Ende des hIAPP positiv geladen ist, liegt es nahe, dass es an der anfänglichen Membran-Interaktion beteiligt ist, vor allem wenn negativ geladene Lipide in der Membran präsent sind [69]. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich nicht um die einzigen Wechselwirkungen, da berichtet wurde, dass die ersten sieben N-terminalen Aminosäuren nicht für die zytotoxische Wirkung

des hIAPP verantwortlich sind [86]. Mit Hilfe von Spin-Markierung und Elektronenspinresonanz (EPR)-Experimenten wurde beobachtet, dass sich die Aminosäuren 9 bis 22 in Form einer α -Helix parallel zur Oberfläche an die Zellmembran anlagern und diese anschließend auch an der Ausbildung der β -Kreuzstruktur der Fibrillen beteiligt sind [87].

1.2.2.1 Inhibition der zytotoxischen Wirkung des hIAPP

Mittlerweile gibt es viele verschiedene Ansätze, um der zytotoxischen Wirkung des hIAPP vorzubeugen und somit die Zerstörung der β -Zellen bei Diabetes-Mellitus Typ II-Patienten zu verhindern. Die Entwicklung solcher Präparate gestaltet sich aufgrund des geringen Wissens über die Struktur des hIAPP auf dem Weg zur Fibrillenbildung jedoch schwierig. Trotzdem gibt es schon einige Erfolge auf dem Gebiet zu verzeichnen. Die aktuellste Behandlungsstrategie befasst sich mit Ersatzmolekülen für hIAPP, da durch den Verlust der β -Zellen kein neues Amylin produziert werden kann. Das erste hierfür zugelassene Präparat nennt sich Pramlintid bzw. Symlin[®]. Hierbei handelt es sich um ein hIAPP-Analogon, das sich in den Aminosäuren 25, 28 und 29 vom eigentlichen Peptid unterscheidet [88]. Dieses Präparat ist aber erst sinnvoll, wenn bereits β -Zellen des Pankreas zerstört worden sind. Um dieser Entwicklung vorzubeugen, wird versucht, die Fibrillenbildung und die dadurch entstehende zytotoxische Spezies zu inhibieren. Auf diesem Gebiet wurden bereits Erfolge mit Hilfe von sogenannten „niedermolekularen Inhibitoren“ gemacht. Die Verwendung von kleinen Molekülen hat den Vorteil, dass diese leicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, stabil in biologischen Flüssigkeiten sind und der Immunantwort entgehen können. Da sich die Strukturen von amyloiden Fibrillen allgemein kaum unterscheiden, können Studien zur Inhibierung von anderen Amyloiden, wie z.B. A β oder τ , die an der Entstehung von der Alzheimer-Krankheit beteiligt sind, zur Entwicklung von Inhibitoren der hIAPP-Amyloid-Bildung sehr hilfreich sein. Niedermolekulare rhodaninbasierte Präparate wirken z.B. inhibierend auf die Fibrillenbildung des τ -Peptids [89]. Sie zeigten auch inhibierende Wirkung im Fall von hIAPP [90]. Des Weiteren wurden heparininduzierte τ -Filamente durch anderweitige

Komponentenklassen, wie Phenothiazine, Porphyrine und Polyphenole inhibiert, wobei diese auch die Fibrillenbildung des A β verhindern [91]. In einem anderen auf Peptid-Inhibitoren basierenden Ansatz wurden Fragmente des Peptids methyliert, um die Fibrillenbildung zu verhindern, wobei deren Überwindung der Zellmembran bis heute ein großes Problem darstellt [92].

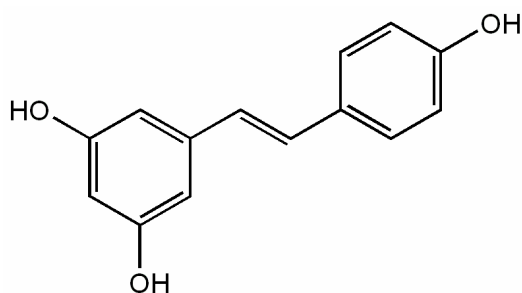


Abb. 1.10: Struktur des Polyphenols Resveratrol (*trans*-3,5,4'-Trihydroxystilben).

Bei einer anderen Komponentengruppe der niedermolekularen Inhibitoren, den Polyphenolen, welche mehr als einen aromatischen Phenolring besitzen, wurde bereits eine inhibierende Wirkung hinsichtlich der Fibrillenbildung von A β , α -Synuklein und dem Prion-Protein nachgewiesen [93]. So konnte gezeigt werden, dass ein in Weintrauben vorkommendes Polyphenol, Resveratrol (Abb. 1.10), die Fibrillenbildung des A β (25-35) verhindert [94] und den intrazellulären und sekretorischen Gehalt an A β reduziert [95]. Da die Sequenz des hIAPP der des A β -Peptids sehr ähnlich ist (65 % Sequenzähnlichkeit bei Überlappung der Region 15-37 oder der zentralen Kern-Region [96]) und auch eine ähnliche fibrilläre Sekundärstruktur aufweist, könnte es sein, dass diese Art von Inhibitoren auch wirksam bezüglich einer verminderten Bildung von amyloiden hIAPP-Fibrillen ist.

1.2.3 Zelluläre Modelle für die Diabetes Typ II- Forschung

Zur detaillierten Untersuchung der genauen Zusammenhänge des metabolischen Defekts bezüglich Diabetes Mellitus Typ II ist es wichtig, *in vivo* Systeme zu verwenden, um die *in vitro* gemessenen Ergebnisse auf ihre physiologische Anwendbarkeit zu prüfen. Bisher gibt es einige etablierte isolierte β -Zelllinien aus dem Pankreas, wie z.B.

RINm5F, BRIN-BD11 oder auch INS-1E. Letztere ist eine stabile β -Zelllinie aus dem Pankreas der Ratte. Sie stammt von der Zelllinie INS-1 ab, welche Anfang der 90er im Labor von Pierre Maechler aus einem durch Röntgenstrahlung induzierten Insulinom isoliert wurde [97, 98]. Die Isolierung der klonalen Zelllinie INS-1E erfolgte aufgrund ihres Insulingehalts und ihrer sekretorischen Reaktion nach Stimulation durch Glukose. Diese Eigenschaften sind für die Diabetes Mellitus Typ II Forschung von besonderem Interesse und konnten bisher in anderen Zellmodellen nicht in physiologischem Ausmaß umgesetzt werden. Die Zelllinie RINm5F zum Beispiel reagiert nach Glukose-Stimulation mit einer physiologisch nicht vergleichbaren Antwort [99]. BRIN-BD11-Zellen sind dagegen nur schwach differenziert, weisen einen sehr niedrigen Insulingehalt auf und reagieren nur schwach auf eine Glukose-Stimulation [98]. Der Vorteil der Verwendung von Rattenzellen gegenüber humanen Zellen ist zudem, dass das eigene produzierte Ratten-IAPP (rIAPP) nicht zur Aggregation beiträgt und somit die konzentrationsabhängige Fibrillenbildung des IAPP kontrolliert untersucht werden kann. Aus diesem Grund repräsentiert die Zelllinie INS-1E ein wertvolles und stabiles β -Zelllinien-Modell.

1.3 Ras – eine kleine GTPase

1.3.1 Die Ras-Superfamilie

Ras (Ratten Adenosarkom-Protein)-GTP(Guanosintriphosphat)asen sind kleine monomere G-Proteine, die eine große Rolle in vielen zellulären Signalprozessen spielen. Hyperaktivierende Mutationen dieser Proteine führen zur übermäßigen Zelltransformation und tragen zu 30 % zur Entstehung aller menschlichen Tumore bei [100].

Die Ras-Superfamilie umfasst 150 menschliche Proteine. Die onkogenen Ras-Proteine bilden das Fundament dieser Familie und werden in fünf Hauptklassen (Ras, Rho (Ras-homologes Protein), Rab (Ras-verwandtes Protein im Gehirn), Ran (Ras-verwandtes nukleäres Protein) und dem Arf (ADP-Ribosylierungsfaktor)) basierend auf ihrer Sequenz und ihrer Funktion unterteilt (Abb. 1.11). Alle diese Proteine haben ihre Funktion als GTPase gemeinsam und wirken in der Zelle als molekulare Schalter vieler Signalprozesse, die Vorgänge wie Differenzierung, Apoptose, Proliferation, Zytoskelett-Organisation und auch vesikulären und Kern-Transport regulieren.

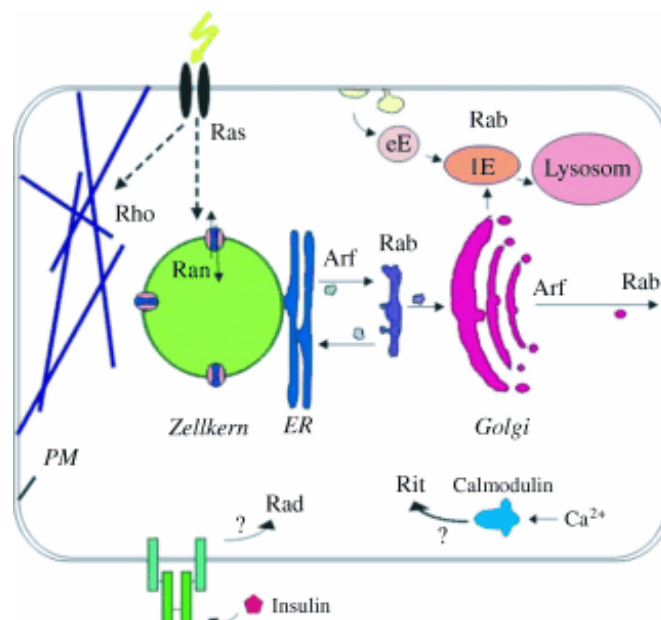


Abb. 1.11: Proteine der Ras-Superfamilie und ihre Lokalisierung und Funktion in der zellulären Umgebung. eE: frühes (early) Endosom, IE: spätes (late) Endosom, PM: Plasmamembran, ER: endoplasmatisches Retikulum, Arf: ADP-Ribosylierungsfaktor, Rit: Ras-ähnliches Protein in Gewebe, Rad: Ras-verwandtes diabetesassoziiertes Protein [101].

Ras-Proteine agieren als monomere G-Proteine. Ihre Spezifität erhalten sie durch variierende posttranslationale Modifikationen sowie durch Sequenzunterschiede in den für die Effektorbindung verantwortlichen Bereichen [102]. Dies gibt ihnen ihre subzelluläre Lokalisierung und Reaktionspartner, wie Regulatoren oder Effektoren vor. Die Mitglieder der Ras-Superfamilie GTPasen funktionieren als molekulare GDP (Guanosindiphosphat)/GTP (Guanosintriphosphat)-regulierte Schalter [103], die alle die sogenannte G-Domäne beginnend am N-Terminus gemeinsam haben, welche das GDP/GTP- Bindungsmotiv enthält [104].

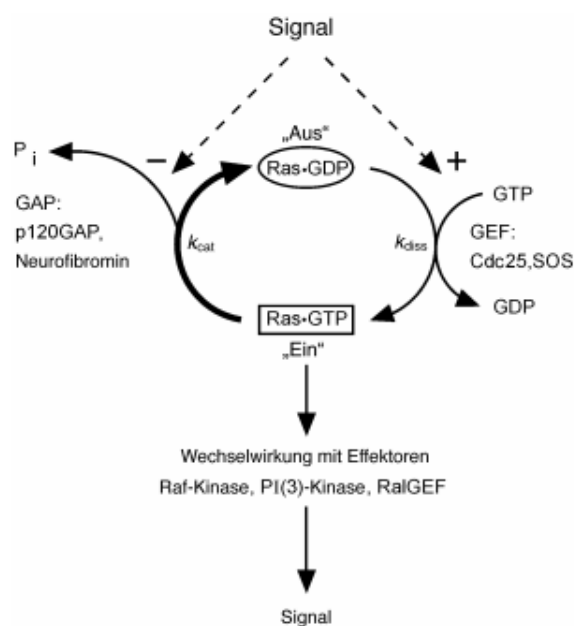


Abb. 1.12: Der Ras-Zyklus. In der GDP-gebundenen Form ist Ras inaktiv. Es kann durch die Wechselwirkung mit Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (GEFs) aktiviert werden. In der GTP-gebundenen Form wechselwirkt es mit Effektoren und Proteinen, die über ihre Fähigkeit definiert sind, die GTP-Form zu erkennen. Um den Zyklus zu schließen, hydrolysiert Ras GTP zu GDP und anorganischem Phosphat (P_i) [105].

Der Austausch von GDP und GTP wird durch Proteine kontrolliert, die sich in zwei Hauptklassen einteilen lassen: Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase aktivierende Proteine (GAPs) (Abb. 1.12). GEFs fördern die Bildung der aktiven GTP-gebundenen Form [106], wohingegen GAPs die intrinsische GTPase-Aktivität beschleunigen und somit die Bildung der inaktiven GDP-gebundenen Form unterstützen [107]. Die zwei unterschiedlichen Nukleotid-gebundenen Formen des Ras-Proteins weisen prinzipiell eine ähnliche Struktur auf, unterscheiden sich jedoch in der Switch I- (Aminosäuren 30-38) und der Switch II (Aminosäuren 59-67)-Region. Hierdurch erhöht sich für die GTP-gebundene Form die Bindungsaffinität für weitere

Effektoren [108, 109]. Eine weitere wichtige Eigenschaft der meisten Mitglieder der Ras Superfamilie ist die posttranslationale Modifikation mit Lipiden. Die meisten Ras und Rho-Proteine enden am C-Terminus mit einem CAAX-Motiv. Diese Sequenz wirkt zusammen mit in unmittelbarer Nähe liegenden lipidierten Cysteinen als Membranzielmotiv, die die Wechselwirkung mit bestimmten Membran-Domänen und subzellulären Orten bestimmen. Die CAAX-Sequenz dient zusätzlich als Erkennungsmotiv für die Farnesyltransferase und die Geranylgeranyltransferase I, welche die Bindung eines Farnesy (Far)-, bzw. Geranylgeranyl-Rests an das Cystein des Tetrapeptids katalysieren [110]. Im Folgenden wird nur noch auf die Klasse der Ras-Proteine eingegangen, da diese Bestandteil dieser Arbeit sind.

1.3.2 Die Ras-Isoformen und ihre Wechselwirkung mit Membranen

Die onkogenen Ras-Proteine bilden die Grundlage der Ras-Familie. Sie dienen als zentraler Schalter für viele Signalkaskaden und werden mit Hilfe von extrazellulären Reizen aktiviert. Nach Aktivierung interagieren sie mit vielen spezifischen katalytischen Effektoren, die wiederum mit dem zytoplasmatischen Signalnetzwerk wechselwirken. So werden Prozesse wie Genexpression, Proliferation und Differenzierung reguliert. Die bekannteste und bestuntersuchte Signalkaskade, an der Ras beteiligt ist, ist die Aktivierung des Ras-Proteins durch die epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor-Tyrosinkinase, gefolgt vom GEF Sos (*Son of Sevenless*) [109]. Das aktivierte GTP-gebundene Ras-Protein interagiert dann mit Raf (Ratten-Fibrosarkom-Protein), einer Serin/Threonin-Kinase und rekrutiert diese an die Plasmamembran. Hier wird die Raf-Kinase durch Phosphorylierung aktiviert, woraufhin sie die MEK1/2 (MAP-ERK-Kinase) durch Phosphorylierung aktiviert. Diese aktiviert wiederum die Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinase ERK1/2 (Extrazellulär regulierte Kinase). Diese Kinase geht in den Nukleus und phosphoryliert die Transkriptionsfaktoren der Ets (Transkriptionsfaktor)-Familie, was zu einer Aktivierung verschiedener Promotoren führt [110]. Ein weiterer Effektor von Ras ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase.

Die Ras-Proteine können in drei verschiedene Isoformen unterschieden werden: H (Harvey)-, N (Neuroblastoma)- und K (Kirsten)-Ras, wobei K-Ras nochmal in K-

Ras4A und 4B unterschieden wird. Es wurde berichtet, dass N- und K-Ras am häufigsten vorkommen [111]. Diese drei Isoformen sind sich strukturell sehr ähnlich (Abb. 1.13), weisen aber unterschiedliche Funktionen auf. H-, N- und K-Ras weisen in der Region 1 bis 165, der G-Domäne, eine hohe Sequenzhomologie auf, welche das Nukleotidbindungsmotiv und die Bindungsstellen der Effektoren enthält. Sie unterscheiden sich aber in den nachfolgenden 23-24 Aminosäuren, der hypervariablen Region (HVR). Diese weist eine Sequenzhomologie von nur 15 % unter den Isoformen auf. Sie beinhaltet Informationen zur Membranbindung bzw. -lokalisierung und zum intrazellulärem Transport. Nach der Synthese der G-Domäne des Ras-Proteins durchläuft das Protein einige posttranslationale Modifikationen. Hierbei wird das Cystein der CAAX-Box durch die Farnesyltransferase farnesyliert. Hiernach wird die AAX-Sequenz proteolytisch abgeschnitten und das farnesylierte Cystein carboxymethyliert [112]. Der Farnesylrest (Far) bindet in Verbindung mit einem zweiten Bindungsmotiv (N- und K-Ras4A: Monopalmitoylierung (Pal); H-Ras: Diplamitoylierung; K-Ras4B: polybasische Sequenz aus sechs Lysin) an die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Beide Motive zusammen bilden die Ziel-bestimmende Domäne. Es ist noch unklar, ob im Fall von N- und K-Ras4A ein drittes Signalmotiv notwendig ist. Im Folgenden wird bezüglich des K-Ras nur noch auf K-Ras4B eingegangen, da dieses für die hier durchgeführten Messungen von Bedeutung ist. Es wurde gezeigt, dass die beiden genannten Bindungsmotive im Fall von N-Ras nicht für den Transport zur Plasmamembran ausreichen, sondern die gesamte Sequenz der HVR benötigt wird [113]. Die Palmitoylierung, bzw. die Polylysin-Sequenz ist zudem verantwortlich für die Art des Transports vom Golgi zur Plasmamembran. Die meisten der Ras-Isoformen benutzen den sekretorischen Weg mit Hilfe von Transportvesikeln, um vom Golgi zur Plasmamembran zu gelangen (Abb. 1.14). Im Gegensatz zu den anderen Ras-Isoformen verwendet K-Ras4B einen Golgi-unabhängigen Weg, der bisher kaum untersucht und verstanden ist und vermutlich die Beteiligung von Klasse C vps-Proteinen (vakuoläres Proteinsortierung-Protein) benötigt [114]. Die zwei Palmitoylierungen des H-Ras scheinen nicht gleichwertig zur Lokalisierung an der Plasmamembran notwendig zu sein. Das palmitoylierte Cystein 181 unterstützt den Transport zur Plasmamembran, wohingegen eine Monopalmitoylierung am Cystein 184 den Transport zum Golgi unterstützt [115].

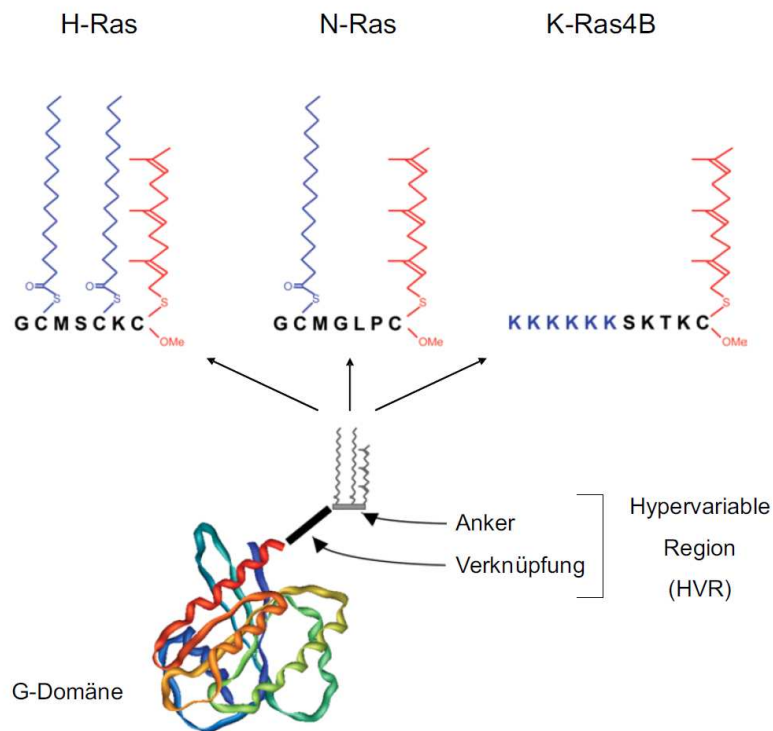


Abb. 1.13: Membrananker und Aufbau der Ras-Isoformen H-, N-Ras und K-Ras4B [116].

Nach dem heutigen Modell der Membran befinden sich in ihr Nanodomänen bestehend aus Proteinen und Lipiden. Es wird vermutet, dass diese Domänen an der Katalyse der Signalkaskaden beteiligt sind, in dem sie die nötigen Komponenten der Effektorcaskaden lokal konzentrieren. Bei diesen Domänen handelt es sich um kleine (< 15 nm) und kurzlebige ($t_{1/2} \leq 0.4$ s) Nanocluster [117]. Abhängig von der jeweiligen Isoform gibt es unterschiedliche Beobachtungen bezüglich der Art und Weise der Wechselwirkung und der präferentiellen Domänenlokalisierung. So wurde berichtet, dass K-Ras4B an Aktin-abhängige Nanocluster bindet, die frei von Cholesterin sind, aber durch Galektin-3 stabilisiert werden [118]. Außerdem führt die Polylysinsequenz von K-Ras4B zu einer verstärkten Bindung an negative Membranen, die z.B. Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat enthalten [119]. Darüber hinaus wurde für K-Ras4B eine kurze Verweildauer (Halbwertszeit von wenigen Minuten) an der Membran beobachtet [120]. Die Bindungsdauer von K-Ras4B an die Membran wird zudem durch Phosphorylierung durch die Protein Kinase C beeinflusst. [121]. Simulationsstudien haben gezeigt, dass N-Ras nach Aktivierung von der ungeordneten Phase in die geordnete, cholesterinabhängige *Raft*-Phase der Membran wechselt und dass es bei H-Ras genau umgekehrt ist [115]. Dagegen wurde in anderen Studien der gegenteilige Fall

beobachtet, bzw. gefunden, dass die Grenzfläche zwischen den Domänen eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Clustern spielt [21, 122]. Es ist aber auch möglich, dass Eigenschaften wie die Ladung oder die Krümmung der Membran die Bindung von Ras erheblich beeinflussen können.

Die Dissoziation der verschiedenen Isoformen von der Membran erfolgt ebenfalls durch unterschiedliche Mechanismen. So erfolgt die Trennung von der Membran bei N- und H-Ras durch Depalmitoylierung und anschließendem nicht-vesikulären Rückgang zum Golgi (Abb. 1.14), wohingegen die Dissoziation des K-Ras4B über Phosphorylierung am Cystein 181 durch die Proteinkinase C reguliert wird [121, 123]. Es wird zudem vermutet, dass weitere Proteine, wie PDE- δ (Phosphodiesterase- δ) am Rücktransport beteiligt sind [123].

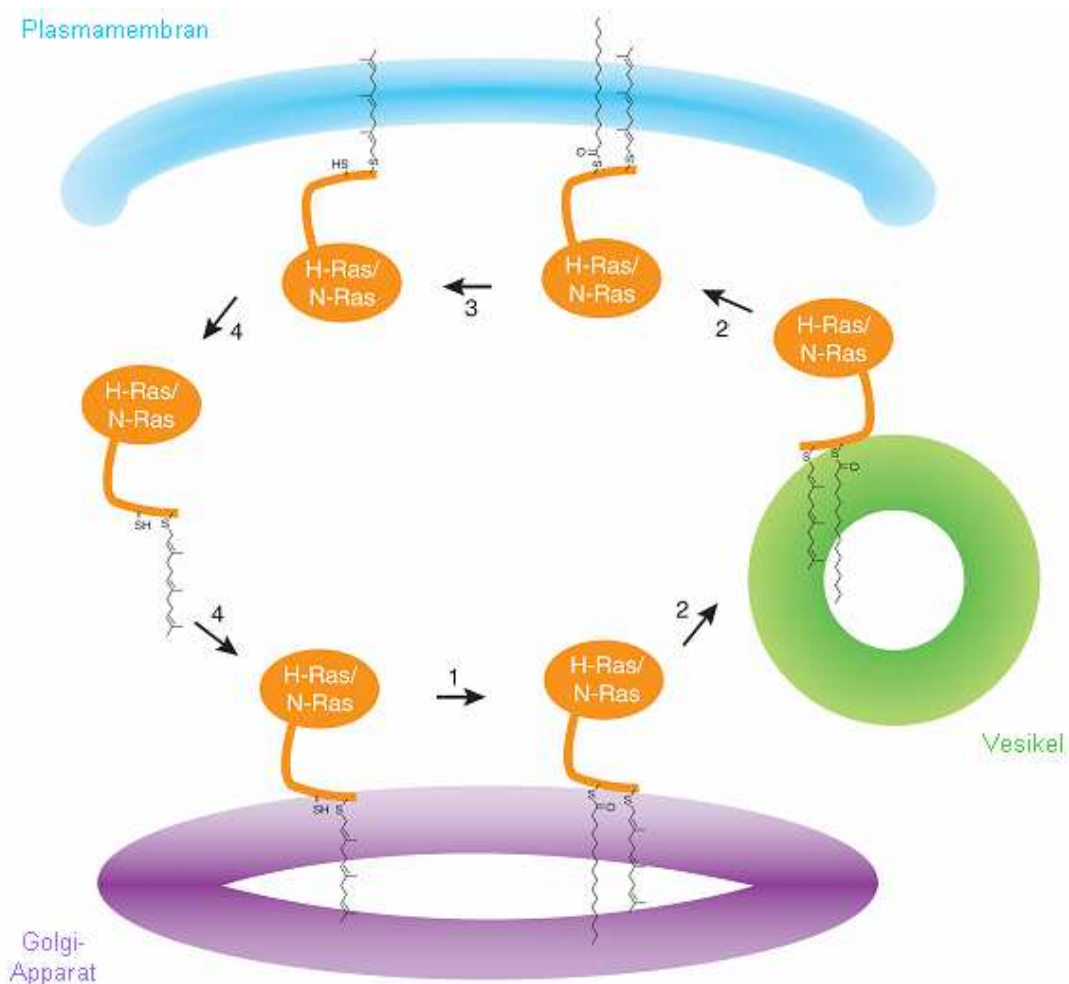


Abb. 1.14: Ras-Acylierungszyklus 1) S-Palmitoylierung von N- und H-Ras am Golgi; 2) gerichteter vesikulärer Transport zur Plasmamembran; 3) Depalmitoylierung des Proteins, 5) Dissoziation der Proteine von der Membran und nicht-vesikulärer Rückgang zum Golgi [124].

Bisher ist noch wenig über den Einfluss der Beschaffenheit der Lipidanker bei der Insertierung in, bzw. der Dissoziation von der Membran und ihre Bindungskinetik bekannt. NMR-Studien haben gezeigt, dass das Ras-Protein vornehmlich mit seinen beiden Lipidankern in die Membran insertiert und dort sehr flexibel bleibt. Zusätzlich können weitere Wechselwirkungen der HVR mit der Membran die Bindung beeinflussen [125, 126]. Durch Variation der Lipidanker des N-Ras-Proteins (Abb. 1.15) konnte mit Hilfe von Rasterkraftmikroskopie (AFM) gezeigt werden, dass Farnesylierungen die konzentrierte Ansammlung der Proteine (Clustereffekt) in der Grenzfläche von zwei Domänen verstärken. Zweifach-palmitoyliertes, bzw. aus Stabilitätsgründen doppelhexadecyliertes (HD/HD) N-Ras zeigt keine Präferenz für die Grenzfläche und lagert sich eher in die ungeordnete l_d -Phase ein [122]. In Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS)-Studien hingegen wurde gezeigt, dass das doppelhexadecylierte Protein stabiler in die Membran insertiert als die natürliche Form des Proteins. Darüberhinaus wurde hierbei auch die Orientierung des Proteins an der Grenzfläche ermittelt. Dies ergab, dass sowohl doppelfarnesyliertes als auch doppelhexadecyliertes N-Ras die gleiche Orientierung an der Membran aufweisen, ihre Bindungskinetiken jedoch unterschiedlich sind. Doppelhexadecyliertes N-Ras bindet zuerst in einer randomisierten Orientierung und nimmt in einem zweiten Schritt die gleiche Orientierung wie das natürliche Protein ein [127]. Bisher gibt es aber noch keine detaillierte Analyse bezüglich der Bindungskinetik und der zugehörigen Bindungskonstanten. Vor allem der Einfluss unterschiedlicher Lipid-Zusammensetzungen sowie der Krümmung oder Ladung wurden bisher kaum untersucht. In Abb. 1.15 sind die hier untersuchten Lipidanker- und Nukleotid-Variationen hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit Membranen dargestellt. Hierbei wurde der Einfluss von Ladung, Krümmungstress, als auch die Bindung an reine l_d -, l_o -Phasen bzw. an Membranen mit deren Koexistenz untersucht. Zudem wurde der Einfluss von Fluoreszenzmarkierungen sowohl am Proteinkern als am auch C-Terminus untersucht.

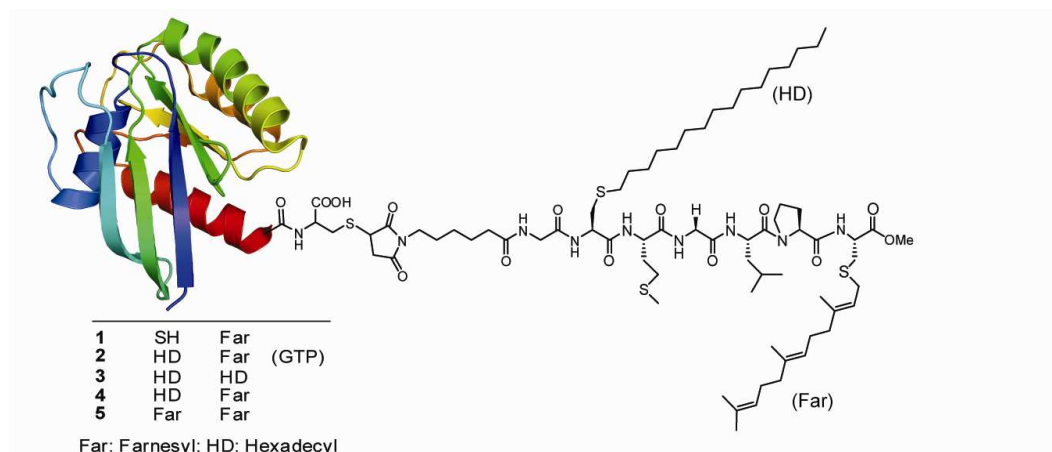


Abb. 1.15: Untersuchte Strukturen des semisynthetischen N-Ras mit unterschiedlichen Lipid-Ankersystemen und Nuklotidbindungen (SH: nicht modifiziert, HD: Hexadecylrest, Far: Farnesylrest). Wenn das Nuklotid nicht angegeben ist, befindet es sich im GDP-gebundenen Zustand. Als Analogon zum GTP wurde hier GppNHp verwendet.

Ebenso wurde die HVR des K-Ras4B an den in Abb. 1.16 markierten Stellen variiert und die daraus resultierenden Änderungen des Bindungsverhaltens an Membranen mit unterschiedlicher Ladungsdichte untersucht. Zum Vergleich wurde einfach farnesyliertes H-Ras verwendet, um den Einfluss der polybasischen Sequenz von K-Ras4B zu bewerten.

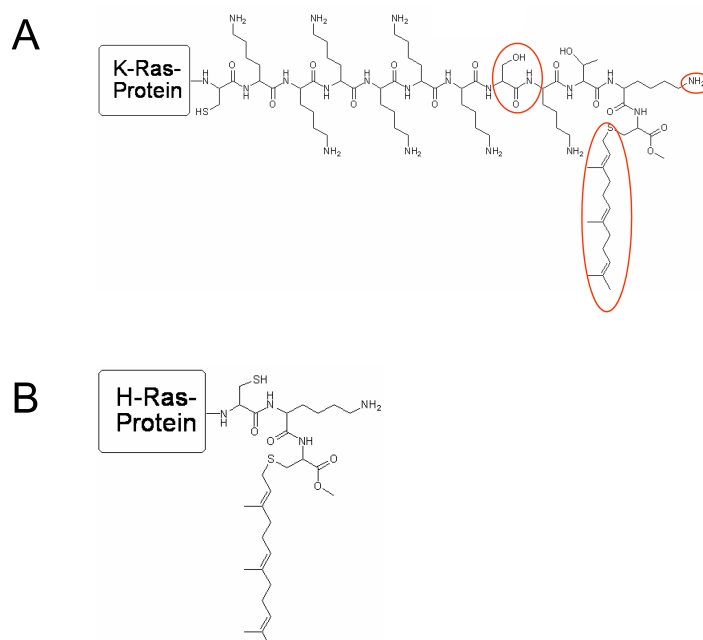


Abb. 1.16: Untersuchte Strukturen des (A) K-Ras4B und (B) H-Ras. Die variierten Positionen am K-Ras sind rot unterlegt. Beide Proteine befinden sich bei den hier durchgeführten Studien im GDP-gebundenen Zustand.

1.4 Motivation und Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, strukturelle und kinetische Eigenschaften ausgewählter Protein-Membransysteme mit Hilfe biophysikalischer Methoden näher zu charakterisieren. Hierfür wurden zwei verschiedene biologische Systeme verwendet. Zum einen sollte die Wechselwirkung von Amylin mit der Zellmembran untersucht werden. Dieses Peptid bildet bei erhöhter Konzentration, wie es bei Diabetes Mellitus Typ II der Fall ist, Fibrillen, welche die Integrität der Plasmamembran von β -Zellen des Pankreas zerstören und somit zur Apoptose der Zellen führen. Hierbei wurde der Fokus auf die Wechselwirkung mit geladenen Membranen gelegt, welche mit Hilfe der Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) an Modellmembranen untersucht werden sollte. Des Weiteren sollte die zytotoxische Wirkung auf β -Zellen aus dem Pankreas der Ratte und deren Inhibierung durch Verwendung des Polyphenols Resveratrol untersucht werden. Zusätzlich sollten die unterschiedlichen Stadien während der amyloiden Fibrillenbildung hinsichtlich ihrer Zytotoxizität charakterisiert werden. Um zusätzliche Informationen über die Wechselwirkung von IAPP mit der Plasmamembran zu erhalten, sollte diese aus der hier verwendeten β -Zelllinie INS-1E isoliert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Wechselwirkung von verschiedenen Ras-Isoformen mit der Membran untersucht werden, da diese in ihrer Funktion als regulative GTPase an der Membran lokalisiert sind. Unter Verwendung von semisynthetischen Ras-Proteinen sollte der Einfluss von einzelnen Modifikationen in der hypervariablen Region der Proteine und der Einfluss von verschiedenen Membraneigenschaften anhand von Modellmembranen untersucht werden. Unter anderem sollte der Einfluss der polybasischen Lysinsequenz in der hypervariablen Region (HVR) des K-Ras4B auf die Bindungseigenschaften des Proteins an Membranen mit unterschiedlicher Ladungsdichte mit Hilfe von Oberflächenplasmonresonanz (SPR) untersucht werden. Als Analogon, ohne Polylysinsequenz, sollte ein einfach farnesyliertes H-Ras-Protein verwendet werden. Darüber hinaus sollte das Bindungsverhalten von N-Ras mit Hilfe von IRRAS, SPR und *Stopped Flow* an Membransysteme mit unterschiedlichen Ladungsdichten, Phasen und Krümmungen charakterisiert werden. Hierzu sollten

verschiedene Lipidanker-Kombinationen in der HVR des Proteins (Far, HD/Far, HD/HD und Far/Far) im GDP-gebundenen Zustand verwendet werden. Zusätzlich sollte der Einfluss des Nukelotidaustausches von GDP zu GTP auf die Membranassoziation des natürlich vorkommenden N-Ras HD/Far, sowie der Einfluss von Fluoreszenzmarkierungen auf das Bindungsverhalten des N-Ras Proteins untersucht werden.

Des Weiteren sollte eine vibrationsarme Temperaturzelle zur Durchführung von fluoreszenzkorrelationsspektroskopischen (FCS)-Daten entwickelt werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Chemikalien

(inklusive Proteine, Zellen und Lipide):

Atto488	Atto-Tec (Siegen, Deutschland)
Bandbreiten-Filter 525/50-25	Semrock (Tübingen, Deutschland)
Bodipy-FL	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Bradford-Reagenz	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
BSA	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
CHAPS	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Chloroform	IRRAS: Roth (Karlsruhe, Deutschland) SPR: Merck (Darmstadt, Deutschland)
Cholesterin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Deuteriumoxid	Isotec (Miamisburg OH, USA)
Dichroischer Spiegel (510 nm)	AHF Analysetechnik (Tübingen, Deutschland)
DOPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster AL, USA)
DOPE	Avanti Polar Lipids (Alabaster AL, USA)
DOPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster AL, USA)
DPPE	Avanti Polar Lipids (Alabaster AL, USA)
Fötale Kälberserum	Brunschwig (Basel, Schweiz)
Glycin	Biacore (Uppsala, Schweden)
Guanidinhydrochlorid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
HEPES	SPR: Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) Zellkultur: Applichem (Darmstadt, Deutschland)
HFIP	Riedel de Häen (Seelze, Deutschland)
hIAPP	Calbiochem (Bad Soden, Deutschland)
INS-1E Zellen	Pierre Maechler (Genf, Schweiz)
Inzidur	Ecolab (Düsseldorf, Deutschland)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumacetat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumchlorid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natrimdihydrogenphosphat	Gibco BRL/ Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumpyruvat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
NuPage [®] 4-12 % Bis-Tris Gel	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Oktylglykosid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Penicillin	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
PBS	VWR (Darmstadt, Deutschland)
PlusOne Silver Staining Kit, Protein	GE Healthcare (München, Deutschland)
POPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster AL, USA)
POPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster AL, USA)

POPS	Avanti Polar Lipids (Alabaster AL, USA)
Reinstwasser	Milipore (Schwalbach/Ts., Deutschland)
Ras-Proteine	AG Waldmann (MPI, Dortmund)
rIAPP	Bachem (Weil am Rhein, Deutschland)
RPMI1640+ 2mM L-Glutamine	Gibco BRL/ Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
SDS	Biacore (Uppsala, Schweden)
Streptomycin	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Sucrose in HBS EP-Puffer	Biacore (Uppsala, Schweden)
Texas-Red DHPE	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Trifluorethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tris	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin	Gibco BRL/ Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
WST-1 reagent	Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
2-Propanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
2-β-Mercaptoethanol	Applichem (Darmstadt, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien:

96- Mikrotiterplatten (transparent)	BD Falcon (Heidelberg, Deutschland)
CM5-Sensorchip	GE-Healthcare (München, Deutschland)
Deckgläschen	Menzel-Gläser (Braunschweig, Deutschland)
Falcon Röhrchen (15, 50 mL)	BD Falcon (Heidelberg, Deutschland)
Filter (0,22 µm)	Milipore (Schwalbach/Ts., Deutschland) und Pall (Ann Arbor MI, USA)
Glasfläschchen (1,8 ml)	Biacore (Uppsala, Schweden)
Glasfläschchen (2 ml)	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
Glasfläschchen (4 ml)	Chromacol (Herts, UK)
Glasflasche	Simax (Prag, Tschechische Republik)
Glasspritzen	Hamilton (Bonaduz, GR, Schweiz)
Kryo-Röhrchen	Simport Plastics
L1-Sensor Chip	GE-Healthcare
Mikrozentrifugationsröhrchen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	Brand (Wertheim, Deutschland)
Pasteur-Pipetten	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Plastikspritzen	Braun (Melsungen, Deutschland) und Terumo (Leuven Belgien)
Serologische Pipetten	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Zellkulturflasche (75 cm ²)	BD Falcon (Heidelberg, Deutschland)

Geräte:

Autoklav	Thermo Scientific (Rockford IL, USA)
Biacore 3000	Biacore (Uppsala, Schweden)
CO ₂ -Inkubator	Thermo Elec. Corp. (Waltham MA, USA)
Equinox 55 FTIR-Spektrometer	Bruker (Ettlingen Deutschland)
Infinite M200	Tecan (Zürich, Schweiz)
Fluoreszenzspektrometer K2	ISS (Champaign IL, USA)
Lawinenfotodiode	Perkin Elmer (Rodgau, Deutschland)

Lyophylle	Atrbiotech (Laurel, MD, USA)
PicoTA-Laser	Topptica Photonics (München, Deutschland)
Microtime 200	Picoquant (Berlin, Deutschland)
Mikroskop	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhelfer	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
Sterile Werkbank	Thermo Scientific (Rockford IL, USA)
Stopped-Flow SX20	Applied Photophysics (Surrey, UK)
Temperiertes Wasserbad	Memmert (Schwabach) und Thermo Scientific (Rockford IL, USA)
Trockenschrank	Thermo Elec. Corp. (Waltham MA, USA)
Ultraschallgerät	Elma (Singen, Deutschland)
Waage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
XA 511 Reflexionseinheit	Bruker (Ettlingen Deutschland)
Vakuumpumpe	KNF (Freiburg i.Br, Deutschland)
Zentrifuge	Thermo Elec. Corp. (Waltham MA, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) gehört zu den Einzelmolekülspektroskopie-Techniken und wurde zu Beginn der siebziger Jahre von Madge, Elson und Webb zum ersten Mal verwendet [128]. Mit Hilfe einer konfokalen Optik (Abb. 2.17) ist es möglich, räumlich und zeitlich hoch aufgelöste Aufnahmen von extrem niedrig konzentrierten Lösungen zu erhalten. Im Gegensatz zu anderen Fluoreszenztechniken ist hierbei aber nicht die Intensität, sondern die Aufnahme von spontanen Intensitätsfluktuationen von Bedeutung. Generell sind mit ihr alle physikalischen Parameter, die zu Fluktuationen des Fluoreszenzsignals führen, zugänglich. So können Aussagen über den translationalen Diffusionskoeffizienten, die Konzentration, molekulare Wechselwirkungen, Konformationsänderungen als auch über Aggregationsprozesse getroffen werden. Die Stärke und Dauer der Fluktuationen können durch eine zeitliche Autokorrelation quantifiziert werden. Eine Autokorrelation gibt Auskunft über die Selbstähnlichkeit einer zeitlich abhängigen Signalfolge. Hierdurch erhält man Informationen über die Persistenz einer bestimmten Information. Somit können Informationen über molekulardynamische Prozesse anhand der zeitlichen Schemata, die durch das Erscheinen und Abfallen der Fluoreszenzsignale entstehen,

erhalten werden. Um Einzelmolekülspektroskopie durchführen zu können, ist es wichtig, dass die Anzahl der in der Probe enthaltenen Moleküle sehr niedrig ist, so dass jedes Molekül einen Beitrag zum gemessenen Signal leistet. Mit Hilfe eines konfokalen Aufbaus (stark fokussierte Laser durch Verwendung von Linsen hoher numerische Apertur (NA (numerische Apertur) $> 0,9$) und Lochblende) ist es möglich, das gemessene Probenvolumen so gering wie möglich zu halten und überschüssige Lichtstreuung auszublenden, welche nicht aus der angeregten konfokalen Ebene kommt. Die Größe des konfokalen Volumens ist meist kleiner als ein Femtoliter. Hierdurch und durch die Verwendung von Konzentrationen im nanomolaren Bereich können Messungen mit sehr guten Signal-zu-Rausch-Verhältnissen aufgenommen werden. Die FCS gehört heute aufgrund der kurzen Datenaquirierungszeit mit zu den High-Throughput-Standard-Methoden.

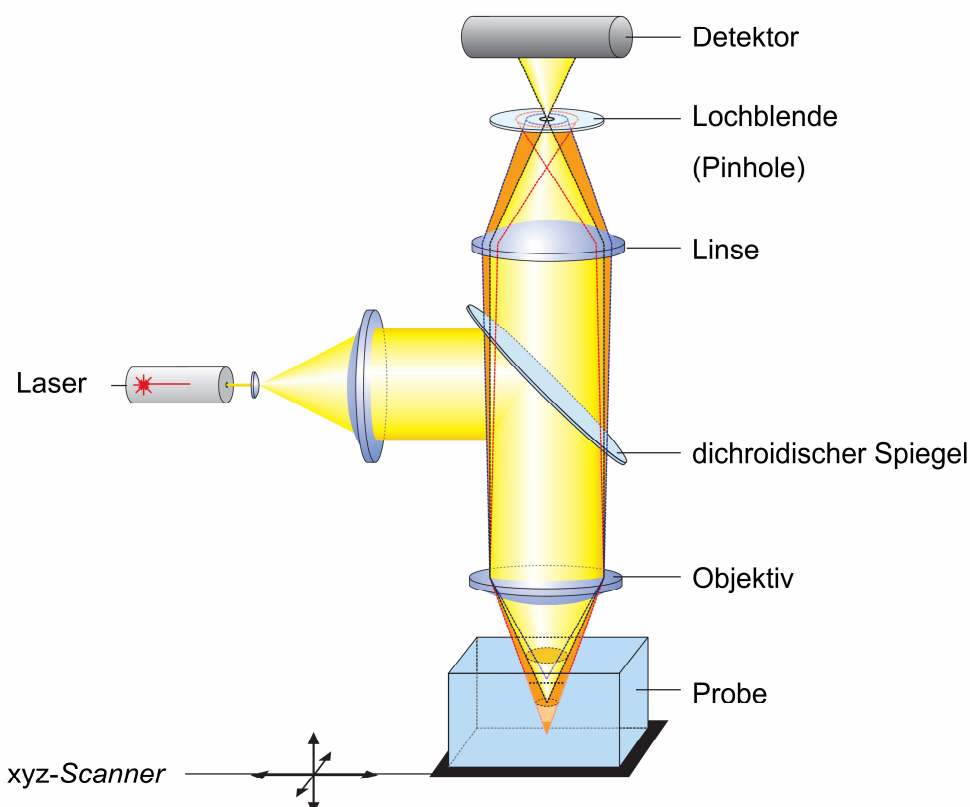


Abb. 2.17: Prinzipieller Aufbau eines konfokalen Mikroskops (modifiziert nach [129]).

Die Anzahl an Molekülen im konfokalen Volumen unterliegt der Poisson-Verteilung. Daher ist die mittlere quadratische Fluktuation der Partikelanzahl N im konfokalen Volumen gegeben als:

$$\frac{\sqrt{\langle(\delta N)^2\rangle}}{\langle N\rangle} = \frac{\sqrt{\langle(N - \langle N\rangle)^2\rangle}}{\langle N\rangle} = \frac{1}{\sqrt{\langle N\rangle}} \quad (2.2)$$

Die normierte Autokorrelationsfunktion ist folgendermaßen definiert:

$$G(\tau) = \frac{\langle\delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau)\rangle}{\langle F(t)\rangle^2} \quad (2.3)$$

Hierbei ist $F(t)$ die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t und $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t)\rangle$ die Differenz von gemessenem und Hintergrund-Signal. Das Signal wird hinsichtlich seiner Selbstähnlichkeit nach einem bestimmten Zeitabstand τ analysiert.

Mit Hilfe dieser Funktion kann die Diffusionszeit folgendermaßen ermittelt werden:

Die Diffusionszeit τ_D , also die Zeit, die ein Molekül im effektiven Anregungsvolumen V_{eff} bleibt, ist reziprok proportional zum Diffusionskoeffizienten D :

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4 \cdot D} \quad (2.4)$$

Hierbei ist r_0 der laterale $1/e^2$ Radius des konfokalen Volumens.

Das effektive Volumen ist definiert als:

$$V_{\text{eff}} = \pi^{\frac{3}{2}} \cdot r_0^2 \cdot z_0 \quad (2.5)$$

Hierbei bezeichnet z_0 den axialen $1/e^2$ Radius des konfokalen Volumens. Die Geometrie des Volumens wird als $\kappa = z_0/r_0$ angegeben.

Die Definition der Autokorrelationsfunktion in Abhängigkeit der Diffusionszeit und des effektiven Volumens für einen 3-dimensionalen Diffusionsprozess lautet:

$$G(\tau) = \frac{\gamma}{V_{\text{eff}} \langle C \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad (2.6)$$

Hierbei ist $\langle C \rangle$ die mittlere Konzentration. Folglich ist $G(0) = \frac{1}{\langle N \rangle} = \frac{1}{V_{\text{eff}} \cdot \langle C \rangle}$ und somit antiproportional zur Anzahl der Moleküle im beobachteten Volumen. Der Parameter γ ist ein geometrischer Faktor und beträgt bei Annahme eines 3-dimensionalen gaussförmigen Anregungsvolumens $1/\sqrt{8}$. Der Diffusionskoeffizient D kann damit über die charakteristische Signalabfallzeit der Korrelationsfunktion τ_D bestimmt werden [130, 131].

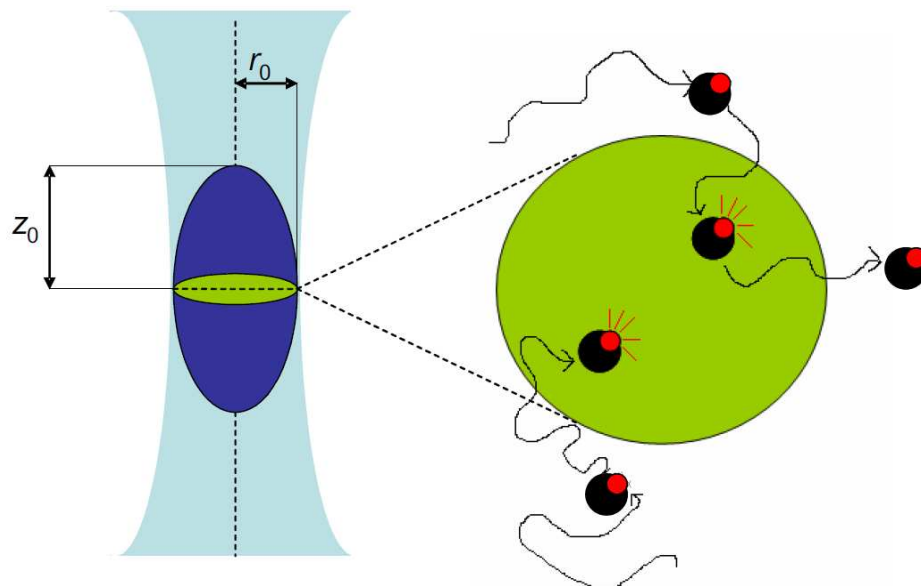


Abb. 2.18: Aufbau eines konfokalen Volumens.

2.2.1.1 Durchführung der FCS-Experimente:

Zur Erweiterung der FCS wurde innerhalb dieser Arbeit eine Peltier-betriebene Temperaturzelle entwickelt. Ihre Funktionsfähigkeit wurde mit Hilfe einer 1 nM Atto488-Lösung bei unterschiedlichen Temperaturen überprüft. Dieser Fluorophor hat bei 25 °C einen Diffusionskoeffizienten von $400 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ [132]. Zur Bestimmung der Größe des konfokalen Volumens und zur Auswertung der aufgenommenen FCS-Kurven wurde ein erweitertes Triplet-Modell verwendet (Gleichung (2.7)).

$$G(\tau) = [1 - T + T \cdot e^{\frac{-\tau}{\tau_T}}] \cdot \sum_i^n \rho_i \cdot [1 + \left(\frac{\tau}{\tau_{D_i}}\right)^{\alpha_i}]^{-1} \cdot [1 + \frac{1}{\kappa^2} \left(\frac{\tau}{\tau_{D_i}}\right)^{\alpha_i}]^{-0.5} \quad (2.7)$$

$$\text{mit : } \sum_i^n \rho_i = \frac{1}{\langle N \rangle \cdot (1 - T)}$$

Hierbei ist T die dunkle (Triplet-) Fraktion der Moleküle, τ die Korrelationszeit, τ_T die Fluoreszenzlebenszeit der dunklen (Triplet-) Stadien, τ_{D_i} die Diffusionszeit, n ist die Anzahl der Spezies, α_i der Anomalieparameter der i -ten Spezies und κ ist das Verhältnis von Länge zu Durchmesser des effektiven Anregungsvolumens. Dieses Modell war bereits in der Software Symphotime 5 (Picoquant, Berlin, Deutschland) implementiert. Mit dieser Software wurde auch die Datenaufnahme durchgeführt.

Gemessen wurde an einem Microtime 200 (Picoquant)-Aufbau, der an ein Olympus-Mikroskop IX 71 angeschlossen war.

Der Fluorophor wurde bei 490 nm mit einem PicoTA-Laser angeregt, wobei die Laserstärke während der Messungen 120 μ W bei jeweils 5 Minuten Aufnahmezeit und einer Pulsfrequenz von 20 MHz betrug. Im optischen Pfad befanden sich ein 510 nm dichroidischer Spiegel und ein 525 nm Emissions-Bandbreiten-Filter mit einer Halbwertsbreite von 25 nm. Die Fluoreszenz wurde mit einer Lawinenfotodiode detektiert. Es wurde ein 60x-Wasser-Objektiv mit einer numerischen Apertur von 1,2 für die Messungen verwendet.

2.2.2 Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie

Die Methode der Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS), die auch unter dem Namen Reflexions-Absorptions-Infrarot-Spektroskopie (RAIRS) bekannt ist, ist eine Kombination aus der Fourier-Transformationsinfrarot (FTIR)-Spektroskopie und der Langmuir-Filmwaagen-Technik. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, die aufgenommenen IRRA-Spektren mit der zugehörigen π/A -Isotherme zu korrelieren. Somit können Informationen über die Konformation, molekulare Orientierung und

Wechselwirkungen von Molekülen an der Luft/Wasser-Grenzfläche gewonnen werden. Aufgrund des hohen Informationsgehaltes der erhaltenen Spektren ist sie bereits für Untersuchungen von verschiedenen Substanzklassen verwendet worden, wie z.B. Fettsäuren, Tensiden [133], Lipiden, sowie Proteinen/Peptiden [134-136] und deren Wechselwirkungen untereinander [127, 137, 138].

Der Aufbau der IRRAS-Apparatur besteht aus einem großen ($300 \times 60 \times 3 \text{ mm}^3$) und einem kleinen ($60 \times 60 \times 3 \text{ mm}^3$) Teflon-Langmuir-Trog der Firma Riegler & Kirstein, Berlin, die durch kleine Poren miteinander verbunden sind. Diese Verbindung garantiert eine gleiche Höhe der Oberfläche in den beiden Trögen während der Messung. Die Teflonbarrieren im großen Trog können gezielt und mit wählbarer Geschwindigkeit angesteuert werden. Der gesamte Trog befindet sich auf einer beweglichen Fahreinheit, welche das Wechseln des IR-Strahls zwischen großem und kleinem Trog ermöglicht. Hierdurch können störende Signale im IR-Spektrum, verursacht durch Wasserdampfabsorption im IR-Strahl, vermindert werden [134]. Die Messung des Oberflächendrucks erfolgt über ein Wilhelmy-Plättchen, welches am Trog montiert ist (Abb. 2.19). Der gesamte Trog kann über eine externe Steuerung temperiert werden.

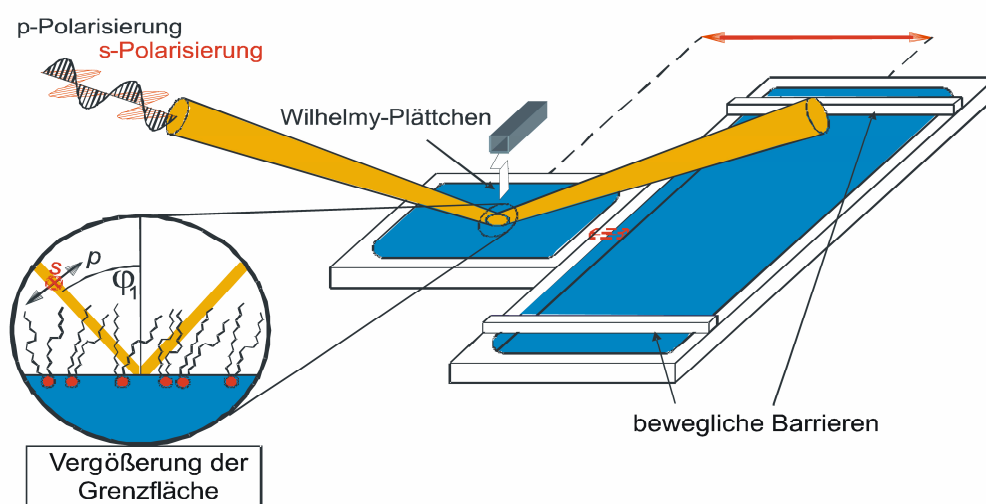


Abb. 2.19: Schematische Darstellung des Langmuir-Trog. ϕ_1 ist der Einfallswinkel des Lichts (modifiziert nach [139]).

Ein IR-Strahl, generiert in einem Equinox 55 FT-IR-Spektrometer der Firma Bruker, wird extern über planar angeordnete Spiegel in einen gewinkelten „Arm“ gelenkt, dessen Einfallswinkel zwischen 20 und 80° relativ zur Wasseroberflächennormale

variiert werden kann. Vor Austritt wird der IR-Strahl durch einen weiteren Spiegel fokussiert und mit Hilfe eines rotierenden KRS-5 Polarisator s- (elektrischer Vektor befindet sich senkrecht zur Ebene des einfallenden und reflektierenden Strahlenbündel) oder p- (elektrischer Vektor befindet sich in der Ebene des einfallenden und reflektierenden Strahlenbündel) polarisiert. Nach Reflexion des IR-Strahls an der Wasseroberfläche wird dieser in einen zweiten Arm weitergeleitet, der die gleiche Winkeleinstellung hat wie der erste Arm. Hierdurch gelangt er schließlich zu einem externen MCT-Detektor. Diese Art von Detektoren müssen während der Messung mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden (Abb. 2.20).

Um das System vor äußeren Einflüssen zu schützen und die innere Luftfeuchtigkeit möglichst konstant zu halten, befindet sich über dem Trogsystem bzw. der Reflexionseinheit XA 511 der Firma Bruker eine Plexiglashülle.

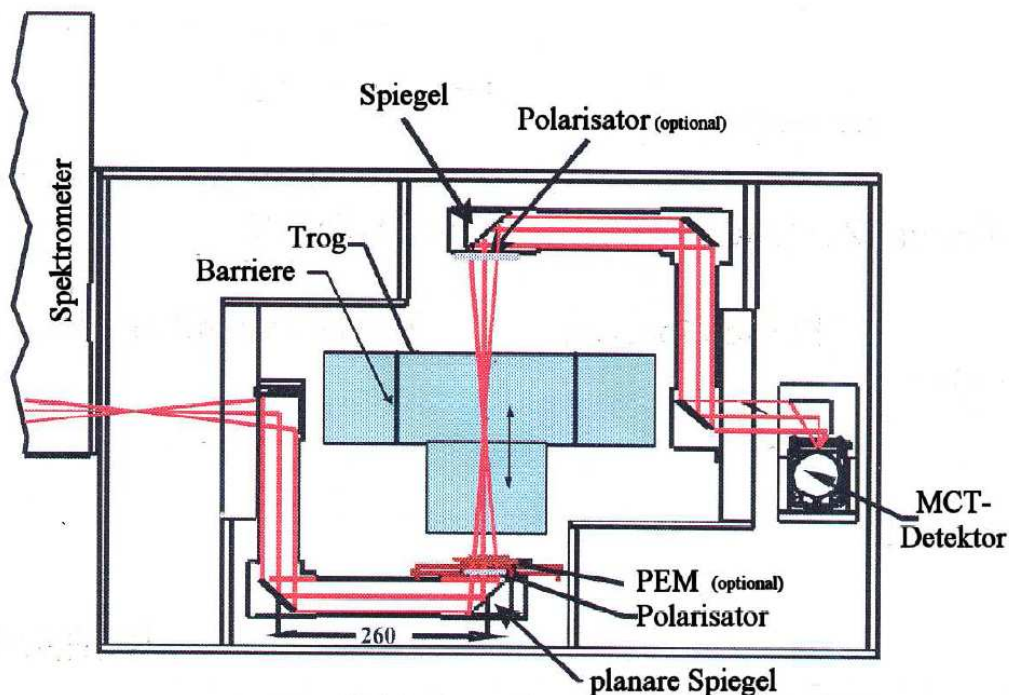


Abb. 2.20: Schematischer Aufbau der IRRAS-Apparatur, Reflexionseinheit XA 511 [139].

Mit Hilfe des bereits erwähnten „Shuttle“-Systems kann der IR-Strahl sowohl auf den Proben- als auch auf den Referenztrogs gelenkt werden. Nach Aufnahme des Proben-IR-Reflektivitäts-Spektrums R folgt die Aufnahme des entsprechenden Referenzspektrums R_0 nach einer kurzen Wartezeit, die durch die Bewegung der Trogbewegungseinheit und einer zusätzlichen kurzen Wartezeit zur Beruhigung der Grenzfläche vorgegeben ist.

Das endgültige Reflexions-Absorptions-Spektrum wird als Verhältnis des Reflexionsspektrums der beschichteten Grenzfläche und der reinen Subphase als $-\log(R/R_0)$ in Abhängigkeit der Wellenzahl angegeben. Durch Verwendung von polarisierter IR-Strahlung und Variation des Einfallswinkels ist es möglich, Aussagen über die molekulare Orientierung der Sekundärstrukturanteile bzw. ihrer Übergangsdipolmomente von Proteinen an der Grenzfläche durch Analyse der Amid-I bzw. Amid-II Bande zu treffen. Mit Hilfe von p-polarisiertem IR-Licht können parallel und senkrecht zur Grenzfläche orientierte Übergangsdipole erfasst werden. Das aufgenommene Signal kann sowohl positiv als auch negativ sein, abhängig vom Einfallswinkel und der Orientierung des Übergangsdipols relativ zur Grenzfläche. Durch Verwendung von s-polarisiertem IR-Licht können hingegen nur parallel zur Oberfläche orientierte Übergangsdipolmomente detektiert werden und es werden im Gegensatz zur p-polarisierten Strahlung nur negative Intensitäten der Amid-Banden detektiert. Bei Verwendung von p-polarisiertem Licht ergeben ab einem bestimmten Winkel oberhalb des Brewster-Winkels positive Intensitäten eine parallele Orientierung des Übergangsdipolmoments relativ zur Grenzfläche, wohingegen negative Intensitäten charakteristisch für eine senkrechte Orientierung relativ zur Oberfläche sind. Die Form- und Intensitätsänderungen der IR-Banden können quantitativ durch Vergleich mit simulierten Spektren ausgewertet werden. Aus diesem Grund können anhand der Intensitätsänderung um den Brewsterwinkel, der Formänderung der charakteristischen Banden im IR-Spektrum, der Intensität und der Position der IR-Banden Informationen über die molekulare Orientierung gewonnen werden.

2.2.2.1 Durchführung der IRRAS-Experimente

Die IRRAS-Experimente wurden sowohl mit N-Ras als auch mit IAPP an einschichtigen Lipid-Grenzflächen bzw. an der reinen Subphase/Luft-Grenzfläche durchgeführt. Alle Proben-Messungen wurden im kleinen Trog bei konstanter Oberfläche durchgeführt. Die Referenz wurde entsprechend im großen Trog gemessen. Die Temperatur der Subphase betrug bei allen Messungen $20 \pm 0,5$ °C.

Die IRRAS-Experimente zur Untersuchung des IAPP-Systems wurden an der POPG (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phospho-(1'-*rac*-Glycerol))-Monoschicht, bzw. an der Suphase/Luft-Grenzfläche durchgeführt. Die verwendete Subphase enthielt 10 mM NaH_2PO_4 und 100 mM NaCl bei einem pH von 7,4. Von dem zuvor in Trifluorethanol (TFE) gelösten hIAPP bzw. rIAPP (Stammlösung: 125 μM) wurde die benötigte Menge an IAPP mit Stickstoff getrocknet und kurz vor Beginn des Experiments im Subphasen-Puffer gelöst, um eine Konzentration von 1 μM zu erhalten. Kurz vor Lipidzugabe wurde die Oberfläche kurz abgesaugt, um eventuell bereits gebildete Aggregate an der Grenzfläche zu entfernen. Das Lipid (Stammlösung: 1 mM in Chloroform/Methanol (3:1)), wenn benötigt, wurde bis zu einem bestimmten Spreitungsdruck auf die Grenzfläche aufgetragen. Ab dann wurden simultan die π/A -Isotherme und die zugehörigen IRRA-Spektren mit p-polarisiertem Licht bei einem Winkel von 40° mit jeweils 2000 Scans aufgenommen. Die Auflösung der IRRA-Spektren betrug 8 cm^{-1} . Sobald sich ein Gleichgewicht der Reaktion eingestellt hatte, sichtbar durch ein Plateau in der π/A -Isotherme, bzw. Konstanz der IRRA-Spektren über einen gewissen Zeitraum, wurden winkelabhängige Messungen im Bereich von 32° bis 70° mit p-polarisiertem Licht mit entsprechend 4000 bzw. 2000 Scans aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software Opus 5.5 (Bruker, Ettlingen, Germany). Die Simulationen der IRRA-Spektren wurden von Andreas Kerth (Martin-Luther-Universität, Halle) durchgeführt. Nach Beenden der Messung wurden 5 μL von der beschichteten Grenzfläche entnommen und auf Glimmer zum Trocknen gegeben und später mit Hilfe von AFM von Anton Hauser (Martin-Luther-Universität, Halle) charakterisiert.

Die Durchführung der N-Ras Experimente erfolgte an einer POPC/B (Hirn) SM/Chol (2:1:1) Grenzfläche in 100 mM NaCl gelöst in D_2O . Bei dem Protein handelte es sich um das doppelt-farnesylierte N-Ras Protein. Zu Beginn des Experiments an der Lipid/Luft-Grenzfläche wurde die Lipidmischung (Stammlösung: 1 mM in Chloroform/Methanol (3:1)) bis zu einem bestimmten Spreitungsdruck auf die Grenzfläche gegeben. Nach Stabilisierung der Basislinie wurde das Protein durch die Grenzfläche in die Subphase injiziert, um eine Konzentration von 200 nM zu erhalten. Sobald sich ein Gleichgewicht der Reaktion eingestellt hatte, sichtbar durch ein Plateau

in der π/A -Isotherme, bzw. Konstanz der IRRA-Spektren über einen gewissen Zeitraum, wurden zunächst s-polarisierte Spektren bei einem Einfallswinkel von 40° und danach winkelabhängige Messungen im Bereich von 32° bis 68° mit p- und s-polarisiertem Licht mit entsprechend 4000 bzw. 2000 Scans aufgenommen. Die Auflösung der IRRA-Spektren betrug 8 cm^{-1} . Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software Opus 5.5 (Bruker, Ettlingen, Germany). Die Messungen wurden mit bereits veröffentlichten Daten [127] verglichen und ausgewertet.

2.2.3 Isolation der Plasmamembran

Zur Isolation der Plasmamembran aus der Zelllinie INS-1E wurde das „Qproteome Plasma Membrane Protein Kit“ (Qiagen, Deutschland) verwendet. Dieses ist allgemein zur Isolierung von Plasmamembran-Proteinen aus adhären Zellkulturen geeignet und wurde ebenfalls zur Extraktion der Plasmamembran für andere Säugerzellen wie menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa) [140] und humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) [141] verwendet. Es wurde ursprünglich zur schnellen und einfachen Isolation von Plasmamembran-Proteinen entwickelt. Die Zellen werden hierzu in einer hypotonischen Lösung inkubiert, was zu einem Anschwellen der Zellen führt. Nach der Zugabe eines milden Detergenzes wird die Zellsuspension durch mechanischen Aufschluss mit Hilfe einer Spritze homogenisiert. Durch Zentrifugation werden verbleibende intakte Zellen, Zelltrümmer und die Zellkerne entfernt. Der Überstand enthält nun zytosolische Proteine und Mikrosomen. Letztere sind kleine Vesikel von 20 bis 200 nm Größe im Durchmesser, die sich aus den Membranen des Endoplasmatischen Retikulum, Golgi-Vesikeln und aus der Plasmamembran zusammensetzen. Mittels eines Lektin-enthaltenden magnetisch modifizierten Liganden, der spezifisch für Moleküle auf der Plasmamembran ist, werden aus der Plasmamembran abgeleitete Vesikel gebunden. Der Komplex wird mit Hilfe von Streptavidin-gebundenen magnetischen Kügelchen isoliert. Nach mehreren Waschschrinen werden die Plasmamembranvesikel unter nativen Bedingungen eluiert. Der Ligand bleibt hierbei an den magnetischen Kügelchen gebunden.

Als Ausgangsmaterial wurden vier 75 cm² –Zellkulturflaschen mit ~ 70 % konfluent gewachsenen INS-1E Zellen verwendet. Die gesamte Isolationsprozedur wurde bei 4 °C durchgeführt.

Der Reinheitsgrad wurde mit Hilfe eines NuPage 4-12 % Bis-Tris (Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan)-Gels und eines Silberfärbungskits „PlusOne Silver Staining Kit, Protein“ bestimmt. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe des Bradford-Tests [142] gemessen.

2.2.4 Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Die Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Spektroskopie gehört zu der Gruppe der optischen Biosensor-Techniken und dient zur quantitativen und zeitlichen Analyse von biochemischen Reaktionen und Wechselwirkungen, wie zum Beispiel Protein-Protein- oder Protein-Lipid-Wechselwirkungen an Gold/Flüssigkeit-Grenzflächen. Ein Biosensor besteht aus einer biologischen Komponente (z.B. Antikörper) und einem Umwandler (z.B. einem Piezo-Kristall), die direkt miteinander verbunden sind. Der Vorteil dieser Biosensor-Technik ist, dass die Bindungs- bzw. Dissoziationskinetiken direkt in Echtzeit ohne Verwendung von zusätzlichen Markierungen des untersuchten Moleküls gemessen werden können. Darüber hinaus können Aussagen über Bindungskonzentrationen und Spezifität getroffen werden. Ein weiterer Vorteil ist das geringe Probenvolumen, welches hierfür benötigt wird. Aus diesem Grund ist die SPR eine etablierte Methode zur Messung von molekularen Interaktionen.

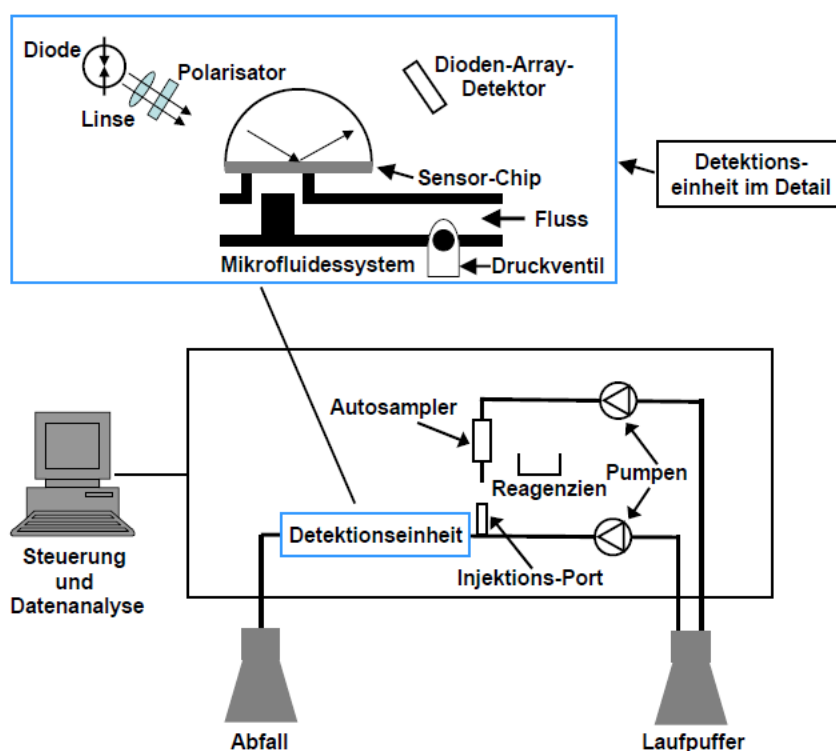


Abb. 2.21: Schema eines SPR-Gerätes (modifiziert nach [143]).

Ein SPR-Biosensor besteht im Wesentlichen aus einer optischen Einheit, einem umwandelnden Medium, welches das optische und das biochemische Element miteinander verbindet, und einem elektronischen System, das die optoelektronischen Komponenten des Sensors überträgt und für die Datenverarbeitung verantwortlich ist (Abb. 2.21). Bei der Durchführung einer SPR-Messung werden die Interaktionen eines an der Sensoroberfläche immobilisierten Reaktionspartners (Ligand) mit einem zweiten Reaktanden in Lösung (Analyt) unter Ausnutzung des Oberflächenplasmonresonanzeffekts untersucht. Gemessen wird hierbei die Änderung des Brechungsindex der Lösung nahe der Sensoroberfläche bzw. des Winkels der Totalreflexion, die unter anderem von der Komplexbildung, bzw. der Dissoziation, des Analyten mit Liganden abhängt. Trifft ein Strahl, der sich in einem Medium mit dem Brechungsindex n_1 bewegt, auf die Grenzfläche zu einem Medium mit dem Brechungsindex n_2 , so kommt es ab einem bestimmten Winkel (Grenzwinkel) zur totalen internen Reflexion, wenn der Brechungsindex n_1 größer ist als n_2 . Hierbei entsteht an der Grenzfläche ein elektrisches, evaneszentes Feld, welches in das Medium mit dem kleineren Brechungsindex n_2 reicht. Die Intensität dieses Feldes nimmt exponentiell mit zunehmender Eindringtiefe in das optische dünnere Medium ab.

Befindet sich zwischen den beiden Medien eine Goldschicht, so werden durch das evaneszente Feld an der Metallschicht Oberflächen-Plasmonen (longitudinale Elektronendichtewellen) angeregt.

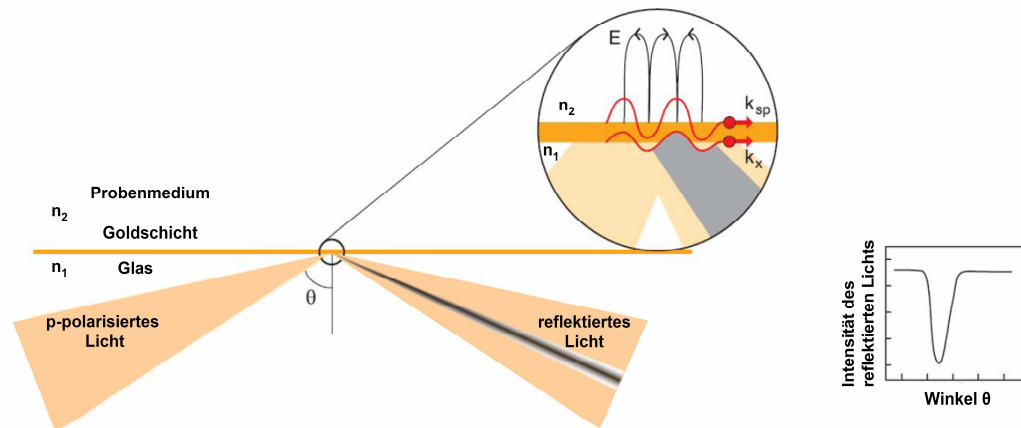


Abb. 2.22: Prinzip der totalen internen Reflexion und der Resonanzbedingung (modifiziert nach [144]).

Durch Verwendung von monochromatischem p-polarisiertem Licht als einfallenden Strahl können dessen Photonen, abhängig vom Einfallswinkel, bzw. der Resonanzbedingung, in die Oberflächenplasmonen einkoppeln. Hierbei wird Energie abgegeben und die Intensität des reflektierten Lichtstrahls nimmt ab, bzw. verschwindet bei Erfüllung der Resonanzbedingung (Abb. 2.22). Die Intensität des evaneszenten Felds nimmt zu. Die Erfüllung der Resonanzbedingung liegt vor, wenn sich die Feldvektoren der Photonen und der Plasmonen in Größe und Richtung gleichen und somit kein Licht mehr reflektiert wird. Die Größe des Feldvektors der Photonen (k_x) und der Plasmonen (k_{sp}) ist folgendermaßen definiert:

$$\begin{aligned}
 k_x &= (2 \cdot \pi / \lambda) \cdot n_1 \cdot \sin(\theta) \\
 k_{sp} &= (2 \cdot \pi / \lambda) \cdot \sqrt{\left(n_{\text{Gold}}^2 \cdot n_2^2 / n_{\text{Gold}}^2 + n_2^2 \right)}
 \end{aligned}
 \tag{2.8}$$

Hierbei ist λ die Wellenlänge, θ der Einfallswinkel des einfallenden Strahls, n_{Gold} der Brechungsindex der Goldschicht und n_1 und n_2 die Brechungsindizes der beiden Medien.

Erhöht sich der Brechungsindex der Probe (n_2), zum Beispiel durch Bindung von Molekülen an der Oberfläche, erhöht sich die Feldvektor-Amplitude der Plasmonen.

Die Erfüllung der Resonanzbedingung kann somit durch Variation des Einfallswinkels θ , bzw. der Wellenlänge des einfallenden Lichts wieder hergestellt werden (Abb. 2.23).

Die zeitliche Änderung des Brechungsindex, bzw. des Resonanzwinkels, wird in so genannten „Resonanz Einheiten (RU)“ in einem Sensorgramm angegeben. Hierbei entsprechen 1000 RU einer Änderung des Resonanzwinkels um $0,1^\circ$, bzw. 1 ng/mm^2 .

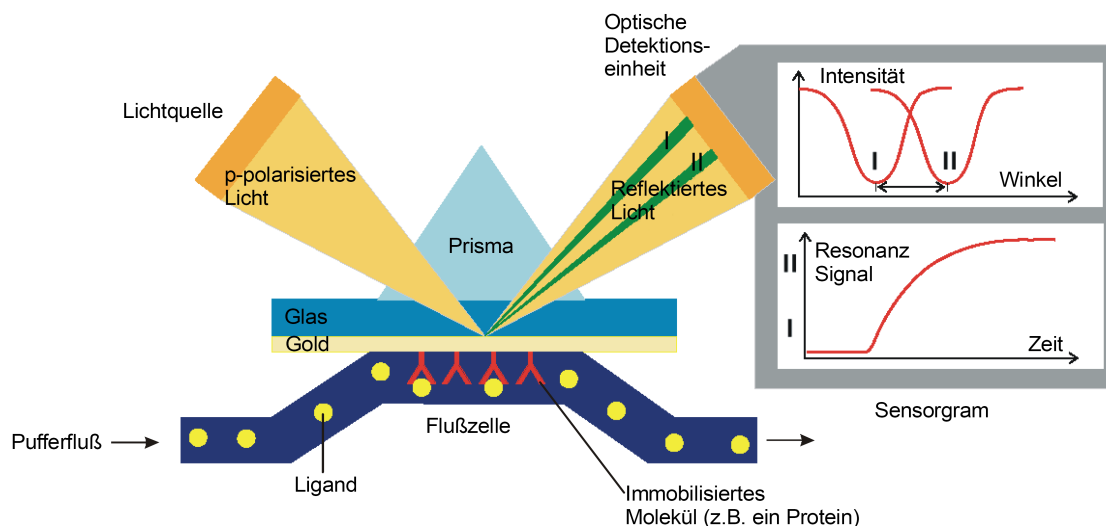


Abb. 2.23: Schematische Darstellung des Messprinzips der SPR; I: Winkel ohne Ligand, II: Winkel mit Analyt-Ligand-Wechselwirkung [144].

Der Sensorchip, auf dem einer der beiden Reaktionspartner immobilisiert wird, besteht aus einem Glasträger und einer dünnen Goldschicht (ca. 50 nm), die mit einer Carboxymethyl-Dextranschicht und verschiedenen Fängermolekülen beschichtet ist. Die Durchführung eines SPR-Experiments gliedert sich in Immobilisierung des Liganden, Bindung des Analyten an den Liganden und Reinigung bzw. Regeneration der Chipoberfläche (Abb. 2.24). Das System steht hierbei unter ständigem Fluss. So können Assoziation und Dissoziation der Reaktion getrennt voneinander unter Verwendung der gleichen Probe und identischen Bedingungen gemessen werden.

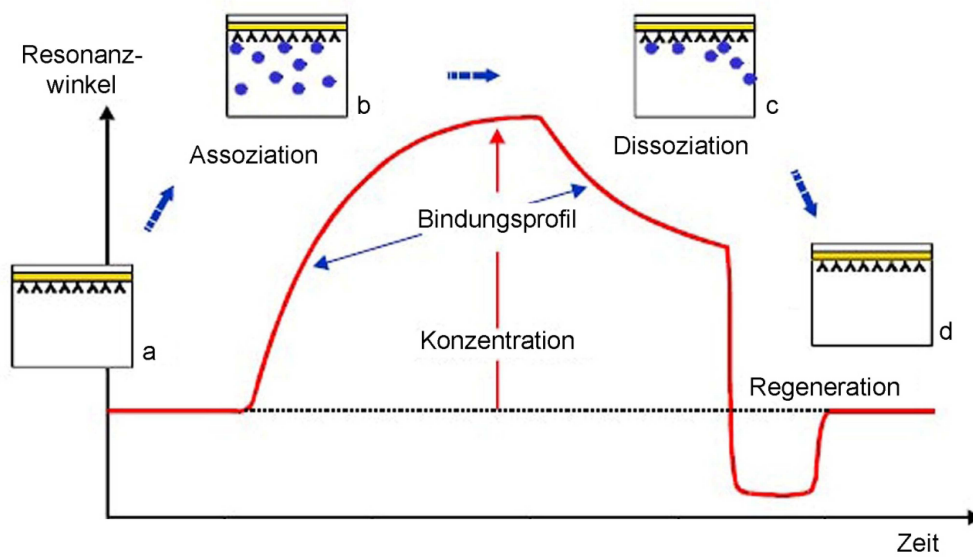


Abb. 2.24: Schematische Darstellung eines SPR-Experiments [144].

2.2.4.1 Durchführung der SPR-Experimente

Zur Präparation der Liposomen wurden Stamm-Lösungen in Chloroform vorbereitet und in den angegebenen molaren Verhältnissen gemischt. (Experimente mit N-Ras: DOPC, DPPC/Chol (7:3), DOPC/DPPC/Chol (1:2:1), DOPC/DOPG (1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phospho-(1'-*rac*-Glycerol)) (7:3) und DOPC/DOPE (1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin) (7:3); Experimente mit K-Ras4B und H-Ras: POPC, POPC/POPS (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phospho-L-Serin) (4:1) und POPC/POPS (3:2). Das Chloroform wurde zunächst mit Stickstoff verdampft. Zur vollständigen Entfernung wurden die Proben über Nacht im Lyophilisator getrocknet und bei -20 °C gelagert.

Am Tag des Experiments wurden die Proben in 1 mL Laufpuffer (Laufpuffer N-Ras: 10 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)-Puffer (pH 7.4) mit 5 mM MgCl₂, Laufpuffer K-Ras4B und H-Ras: 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.4) mit 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl) gelöst und anschließend gemischt, um eine Konzentration von 3 mM zu erhalten. Die Lipidlösung wurde zunächst für 15 Minuten im Ultraschallbad bei 40 °C (65 °C für DPPC enthaltende Proben) behandelt, gefolgt von fünf Frier-Tau-Zyklen und abschließender kurzer Ultraschallbehandlung. Mit Hilfe

einer Extrusion der Lösung durch einen Filter mit 100 nm Porengröße wurden große unilamellare Vesikel (LUV) erhalten. Die beschriebene Methode ist eine bekannte und reproduzierbare Methode, um unilamellare Vesikel definierter Größe herzustellen [145]. Die extrudierte Lösung wurde anschließend auf 0,5 mM mit Laufpuffer verdünnt.

Die SPR-Experimente wurden an einem Biacore 3000 (Biacore, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Die Reinigung des Geräts wurde regelmäßig mit den von Biacore beschriebenen Prozeduren „*Desorb*“ (0,5% SDS (Natriumdodecylsulfat), 50 mM Glycin, pH 9,5) und „*Sanitize*“ (verdünnte Hypochlorid-Lösung) durchgeführt. Zusätzlich wurde alle ein bis zwei Monate ein spezielles Reinigungsprogramm „*Super-Clean*“, entwickelt von D. G. Myszka [146], durchgeführt. Hierbei wird das Gerät jeweils einmal mit 0,5% SDS, 6 M Harnstoff, 1 % Essigsäure und 0,2 M Natriumbicarbonat mit dem „*Prime*“-Programm durchspült. Im Anschluss erfolgt ein zweifaches Durchspülen mit 40 °C warmen Reinstwasser. Abschließend wurde zur Desinfektion das „*Sanitize*“-Programm durchgeführt. Zur Überprüfung des Geräts wurde nach jeder „*Super-Clean*“ Reinigung ein „*System Check*“ mit 15 % Sucrose in HBS EP-Puffer durchgeführt.

Zur Untersuchung von Protein-Membran-Wechselwirkungen wurde ein L1-Chip (Biacore, Uppsala, Schweden) verwendet. Dieser Chip wurde speziell zur Immobilisierung von doppellagigen Lipidschichten entwickelt. Er besteht aus einer dünnen Dextranschicht auf einer Goldoberfläche. Um Vesikel an der Chip-Oberfläche „einzufangen“, wurde die Dextranschicht mit lipophilen Substanzen modifiziert, welche sich in die Lipiddoppelschicht einlagern. Bisher ist immer noch unklar, in welchem Maße sich intakte Vesikel oder fusionierte Lipiddoppelschichten auf dem Chip befinden ([147-150]). Alle Experimente wurden bei 25 °C durchgeführt, wobei die Proben vor der Messung bei 13 °C gekühlt wurden.

Vor dem Experiment wurden der L1-Chip viermal mit Laufpuffer (s.o.) mit dem sogenannten „*Prime*“-Programm durchspült, um das gesamte System mit Puffer zu benetzen.

Bei Durchführung der H-Ras und K-Ras4B SPR-Messungen wurde die Chipoberfläche zunächst mit einem Reinigungsprogramm gesäubert. Hierbei wurden 30 µL Isopropanol/ 50 mM NaOH (2:3), 10 µL 40 mM Oktyl-β-D-Glukopyranosid und 30 µL

20 mM Chaps, 100 mM NaCl, 20 mM CaCl₂ bei einer Flussrate von 5 µL/min injiziert. Zur Immobilisierung der Vesikel wurden zweimal 15 µL der Lösung bei einer Flussrate von 2 µL/min injiziert, gefolgt von 50 µL Laufpuffer bei einer Flussrate von 100 µL/min und drei Injektionen von 10 µL 25 mM NaOH bei einer Flussrate von 5 µL/min zur Stabilisierung. Abschließend wurde die Lipidoberfläche mit einer Injektion von 40 µL Laufpuffer bei 20 µL/min stabilisiert. Für jede Lipidzusammensetzung wurde eine separate Flusszelle verwendet. Nachdem sich die Basislinie stabilisiert hatte, wurden 40 µL des Analyten bei einer Flussrate von 20 µL/min injiziert und die Dissoziation 30 Minuten lang verfolgt. Durch Verwendung von hohen Flussraten werden Effekte wie Rückbindung bzw. das Problem der Massentransferlimitierung reduziert. Hiernach wurde die Chipoberfläche durch das oben beschriebene Reinigungsprogramm regeneriert. Der Grad der Lipidbedeckung wurde mit Hilfe von 0,5 µM BSA (Albumin aus Kälberserum) bestimmt und betrug bei allen Lipidzusammensetzungen mindestens 75%, meist sogar mehr als 80%. Um den Bindungseffekt des Protein-Puffers an den L1-Chip zu berücksichtigen, wurde dieser vom Hauptsignal subtrahiert.

Bei Durchführung der N-Ras Experimente wurde die Chipoberfläche mit einem Reinigungsprogramm gesäubert. Hierbei wurden 20 µL Isopropanol/ 50 mM NaOH (2:3), 3 M Guanidinhydrochlorid und 40 mM Oktyl-β-D-Glukopyranosid bei einer Flussrate von 10 µL/min injiziert. Zur Immobilisierung der Vesikel wurden zweimal 15 µL der Lösung bei einer Flussrate von 2 µL/min injiziert, gefolgt von 50 µL Laufpuffer bei einer Flussrate von 100 µL/min und drei Injektionen von 10 µL 25 mM NaOH bei einer Flussrate von 5 µL/min zur Stabilisierung. Für jede Lipidzusammensetzung wurde eine separate Flusszelle verwendet. Nachdem sich die Basislinie stabilisiert hatte, wurden 150 µL des Analyten bei einer Flussrate von 100 µL/min injiziert und die Dissoziation für 30 Minuten verfolgt. Durch Verwendung von hohen Flussraten werden Effekte wie Wiederbindung und das Problem der Massentransferlimitierung reduziert. Hiernach wurde die Chipoberfläche durch das oben beschriebene Reinigungsprogramm regeneriert. Hierzu wurde, wenn nötig, 20 mM CHAPS hinzugefügt, falls das herkömmliche Programm nicht effizient genug war. Der Grad der Lipidbedeckung wurde mit Hilfe von 0,5 µM BSA bestimmt und betrug bei allen Lipidzusammensetzungen mindestens 80%, meist sogar mehr als 90%. Um den Bindungseffekt des Protein-Puffers und den Effekt von unspezifischen Bindungen an

den L1-Chip zu berücksichtigen, wurde der Anteil an unspezifischen Bindungen, bestimmt durch den Grad der Bindung von BSA und des Proteinpuffers bestimmt und vom Hauptsignal subtrahiert.

Alle Lösungen wurden vorher durch einen 0,2 µm Filter filtriert und entgast. Alle Sensorgramme wurden mit einer Datenaufnahmefrequenz von 10 Hz aufgenommen. Für die Auswertung wurde die Basislinie des Protein-Bindungs-Sensorgramms vor der Injektion auf null gesetzt.

Für alle durchgeführten Messungen wurden die Assoziations- und Dissoziationsphase separat ausgewertet. Der anfängliche Bereich des Assoziationsprozess (für $t \rightarrow 0$), der direkt proportional zu $k_{on,1}$ ist wurde mit Hilfe von linearer Regression in der Software BIAevaluation 4.1 ausgewertet. Die Dissoziationsphase wurde an eine biexponentielle Funktion mit Hilfe der Software Origin 7 (OriginLab Corporation, USA) angepasst.

$$R = A_1 \cdot e^{-k_{off,1}(t-t_0)} + A_2 \cdot e^{-k_{off,2}(t-t_0)} + offset \quad (2.9)$$

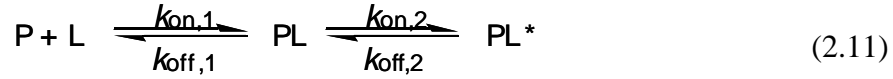
Diese Auswertung gibt Auskunft über zwei voneinander unabhängige Konstanten, z.B. von einem schwach gebundenen und einem zusammengelagerten Zustand, und ihren jeweiligen Beiträgen A_1 und A_2 zur Dissoziationsphase. Der Zeitpunkt t_0 gibt den Anfang der Dissoziationsphase an. Für H-Ras und K-Ras4B wurden nur die ersten Minuten der Dissoziationsphase angepasst, um eine eventuelle spätere Rückbindung auszuschließen. Bei den N-Ras-Versuchen wurde der Bereich aufgrund der extrem hohen Flussrate mit ausgewertet. Hieraus lässt sich nun die mittlere Dissoziationskonstante \bar{k}_{diss} berechnen:

$$\bar{k}_{diss} = \frac{A_1}{A_1 + A_2} \cdot k_{off,1} + \frac{A_2}{A_1 + A_2} \cdot k_{off,2} \quad (2.10)$$

Die N-Ras Experimente wurden zusätzlich mit Hilfe eines „Zwei-Schritt-Modell“ ausgewertet. Dieses Modell wird beschrieben durch einen ersten Bindungsschritt, z.B. durch elektrostatische Wechselwirkungen, gefolgt von einem Insertions- bzw. Dissoziationsprozess des Proteins in bzw. aus der hydrophoben Umgebung als auch

durch Reorientierung und eventuelles Clustern der Proteine in der Membran, welche bereits in vorherigen AFM-Studien beobachtet wurde [122].

Das Modell beschreibt zwei Reaktionsschritte, die bezogen auf die Protein-Lipid-Wechselwirkungen folgendermaßen beschrieben werden:



Hierbei bindet das Protein (P) an die auf dem Chip immobilisierten Lipide (L). Der hieraus resultierende erste Protein-Lipid-Komplex (PL) reagiert in einem zweiten Schritt durch Umwandlung zu einem zweiten Protein-Lipid-Komplex (PL*). Die Parameter $k_{\text{on},1}$, $k_{\text{on},2}$, $k_{\text{off},1}$ und $k_{\text{off},2}$ bezeichnen die Assoziations- und Dissoziationsraten der jeweiligen Reaktionsschritte. Zusätzlich wurde ein Parameter für Massentransferlimitierung k_t hinzugefügt. Hierdurch wird berücksichtigt, dass die Bindung des Proteins an Oberflächen mit hoher Bindungskapazität durch Diffusion limitiert sein kann. Die kinetischen Gleichungen werden wie folgend beschrieben. Die Anfangskonzentration $c = c(t)$ zum Zeitpunkt $t = 0$ in der Lösung und an der Lipidoberfläche sind folgendermaßen definiert:

$$c_P(\text{bulk}) = c_P^0, c_P(0) = 0, c_L(0) = R_{\text{max}}, c_{PL}(0) = 0, c_{PL^*}(0) = 0 \quad (2.12)$$

Hierbei gibt R_{max} die maximale Bindungskapazität der immobilisierten Membran an.

$$\begin{aligned} -\frac{dc_P}{dt} &= k_{\text{on},1} \cdot c_P \cdot c_L - k_{\text{off},1} \cdot c_{PL} - k_t(c_P^0 - c_P) \\ \frac{dc_L}{dt} &= -(k_{\text{on},1} \cdot c_P \cdot c_L - k_{\text{off},1} \cdot c_{PL}) \\ \frac{dc_{PL}}{dt} &= k_{\text{on},1} \cdot c_P \cdot c_L - k_{\text{off},1} \cdot c_{PL} - k_{\text{on},2} \cdot c_{PL} + k_{\text{off},2} \cdot c_{PL^*} \\ \frac{dc_{PL^*}}{dt} &= k_{\text{on},2} \cdot c_{PL} - k_{\text{off},2} \cdot c_{PL^*} \end{aligned} \quad (2.13)$$

Das aufgenommene Signal R (in RU) ist proportional zur Proteinmenge, die an die immobilisierte Lipidmembran gebunden hat (c_{PL} , c_{PL^*}), basierend auf dem Unterschied zwischen Probe und Laufpuffer. Die Evaluierung wurde mit Hilfe des Marquardt-Levenberg Algorithmus durchgeführt. Die berechneten Sensorgramme

wurden durch numerische Integration der Differentialgleichungen berechnet, die das oben genannte Reaktionsschema beschreiben. Die angegebene Auswertungsprozedur war in der Evaluierungssoftware BIAevaluation 4.1 (Biacore, Uppsala, Schweden) implementiert.

Der relative Anteil an quasi-irreversibel gebundenem Protein wurde durch Relativierung des *Offsets* zur anfänglichen Amplitude zum Zeitpunkt $t \rightarrow 0$ der Dissoziationsphase bestimmt.

Bei den angegebenen Fehlerbalken handelt es sich um die Standardabweichung von mindestens drei bis zu sechs durchgeführten Experimenten. Um einige der Ergebnisse auf Signifikanz zu prüfen, wurde ein einseitiger „Zwei-Proben t-Test“ durchgeführt. Das Signifikanzniveau betrug 5 %.

2.2.5 *Stopped-Flow-Messungen*

Die *Stopped-Flow*-Technik wurde im Jahr 1940 von Britton Chance entwickelt und eignet sich besonders für Fluoreszenzmessungen von schnellen Kinetiken im Sekunden- bis Millisekundenbereich. Bei der Durchführung werden die Analytlösungen der beiden Reaktanden in getrennte Spritzen gegeben, woraufhin sie durch eine Rampe in eine Mischkammer zusammengeschossen werden (Abb. 2.25). Nach einer Totzeit von ungefähr 1 ms kann in dieser die zeitabhängige Änderung des Fluoreszenzsignals verfolgt werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass durch die geringe Totzeit schnelle Kinetiken, mit Halbwertszeiten, die größer als die Totzeit sind, gut erfasst werden können und aufgrund des geringen Probenvolumens der Mischkammer (220-400 μL) die Messung auch bei kostenintensiven Proben häufig wiederholt werden kann.

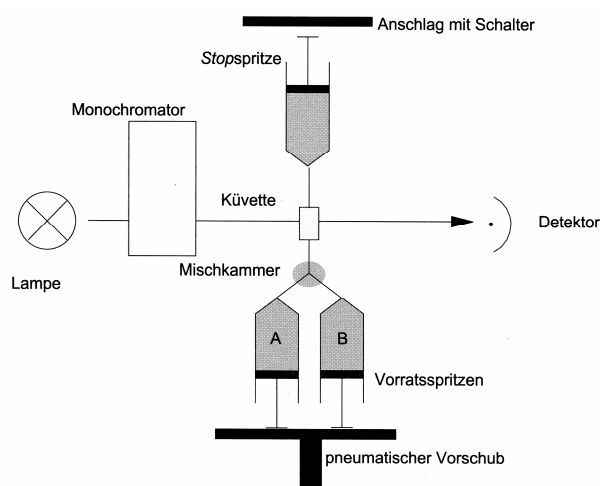


Abb. 2.25: Aufbau einer Stopped Flow Apparatur [151].

Die erhaltenen Daten können mit Hilfe einer biexponentiellen Funktion ausgewertet werden.

$$F(t) = F_{\max} + A_1 \cdot e^{-k_{\text{on},1(\text{obs})} \cdot t} + A_2 \cdot e^{-k_{\text{on},2(\text{obs})} \cdot t} \quad (2.14)$$

Hierbei ist $F(t)$ die gemessene Fluoreszenz zum Zeitpunkt t . A_1 und A_2 sind die Amplituden der jeweiligen Exponentialfunktion und $k_{\text{on},1(\text{obs})}$ und $k_{\text{on},2(\text{obs})}$ sind die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der beteiligten Prozesse.

2.2.5.1 Durchführung der Stopped Flow Experimente

Untersucht wurde die Bindungskinetik von N-Ras HD/Far an DOPC-Vesikeln. Hierzu wurden Bodipy FL-markierte N-Ras-Proteine und Texas Red DHPE (Texas Red® 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin) markierte DOPC-Vesikel verwendet. Die Herstellung der großen unilamellaren Vesikel mit einem Durchmesser von 100 nm erfolgte wie im Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben, wobei ein Fluorophoranteil von 0,2 % hinzugefügt wurde. Der Messpuffer enthielt 20 mM (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) Tris und 5 mM MgCl_2 bei einem pH von 7,4. Gemessen wurde das Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) –Signal, übertragen von Bodipy FL auf Texas

Red bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm bei Raumtemperatur. Die Emission wurde durch einen Langpass-Filter (> 570 nm) gemessen. Die Messungen wurden in einer Stopped Flow SX20-Apparatur (Applied Photophysics, Surrey, UK) durchgeführt und mit Hilfe der Software Pro Data 2.0.7 (Applied Photophysics, Surrey, UK), aufgenommen. Die Messkurve wurde mit Hilfe der oben genannten Funktion (Gleichung (2.14)) unter Verwendung der Software Origin 7 (OriginLab Corporation, USA) ausgewertet.

2.2.6 Zytotoxizitäts-Assay

2.2.6.1 Kultivierung von INS-1E Zellen

Für die Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von hIAPP wurde die Zelllinie INS-1E (Abb. 2.26) verwendet, welche ein Geschenk von Pierre Maechler (klinische Universität Genf, Schweiz) war. Diese Tumor-Zelllinie wurde aus einem strahlungsinduzierten Tumorgewebe aus dem Pankreas der Ratte isoliert [98]. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 2 mM Glutamin, 5 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, 10 mM HEPES, 50 μ M 2-Mercaptoethanol, 100 U/mL Penicillin, und 100 μ g/mL Streptomycin bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator mit einem CO₂-Gehalt von 5 %.

Die Zellen wurden einmal pro Woche bei einer Konfluenz von ca. 80 % mit Trypsin passagiert und zweimal pro Woche wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Vor der Trypsinierung wurden die Zellen mit 10 mL Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Hiernach wurden 3 mL Trypsin auf die Zellen gegeben und für ca. 5 Minuten inkubiert. Von der Zellsuspension wurde ein Drittel der Lösung in eine neue Kulturflasche gegeben und mit 25 mL des oben beschriebenen Zellkultur-Mediums versetzt.

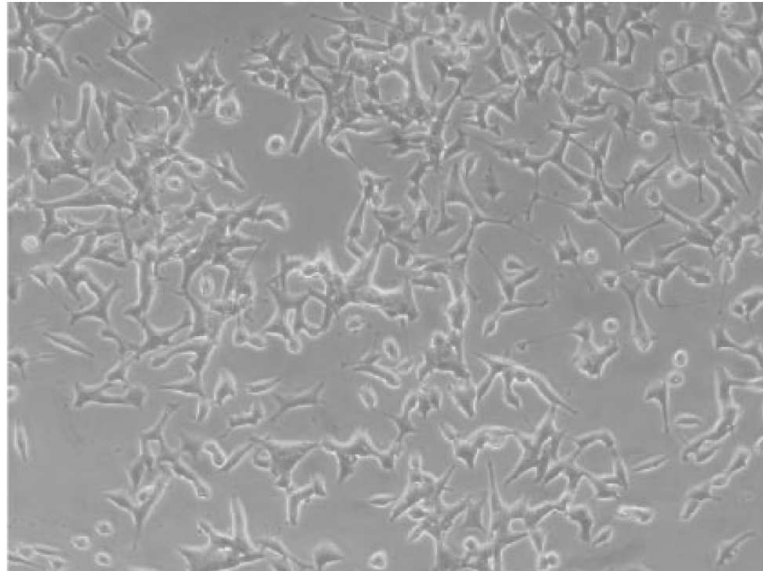


Abb. 2.26: Phasenkontrast-mikroskopische Aufnahme von INS-1E-Zellen (Passage 99) mit 200-facher Vergrößerung, 4 Tage nach Aussaat [98].

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen nach der Trypsinierung für 2 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 mL Einfriermedium (Kultivierungsmedium mit 10 % DMSO) resuspendiert und in 200 μ L Aliquots aufgeteilt. Diese wurden langsam abgekühlt (15 Minuten bei 4 °C, 2 Stunden bei -20 °C, über Nacht bei -80 °C) und schließlich in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Im Gegensatz zur langsamen Kryokonservierung ist das Auftauen der Zellen ein schneller Vorgang, um die zytotoxische Wirkung von DMSO bei Raumtemperatur zu verhindern. Hierzu werden die Kryoröhrchen mit den Zellen bei 37 °C in einem Schritt aufgewärmt. Der Inhalt wird in 25 mL vorgewärmten Kultivierungsmedium verdünnt und für 10 Minuten bei 500 g bei 37 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde hiernach verworfen und das Zellpellet in 200 μ L Kultivierungsmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen mit einer bestimmten Dichte ausgesät und die Adhäsion der Zellen in den folgenden Tagen beobachtet.

2.2.6.2 Der WST-1 Zell-Proliferations-Test

Mit Hilfe des WST-1-Proliferations-Tests kann die metabolische Aktivität der Zellen kolorimetrisch untersucht werden.

Das Tetrazolium Salz WST-1 wird durch metabolisch aktive Zellen gespalten, wodurch Formazan entsteht, welches eine typische dunkelgelbe Färbung aufweist. Diese Reduktion wird vorwiegend durch zelluläre Enzyme (Reduktasen und Reduktionsäquivalente), wie mitochondriale Dehydrogenasen, durchgeführt (Abb. 2.27). Da das Reduktionsprodukt proportional zu der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen ist, kann man durch die Bestimmung des Grades der Gelb-Färbung auf den Anteil an lebendigen intakten Zellen schließen. Die Quantifizierung der Formazanfärbung erfolgte mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts (Infinite M200, Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die zugehörige Referenzmessung erfolgte bei 620 nm.

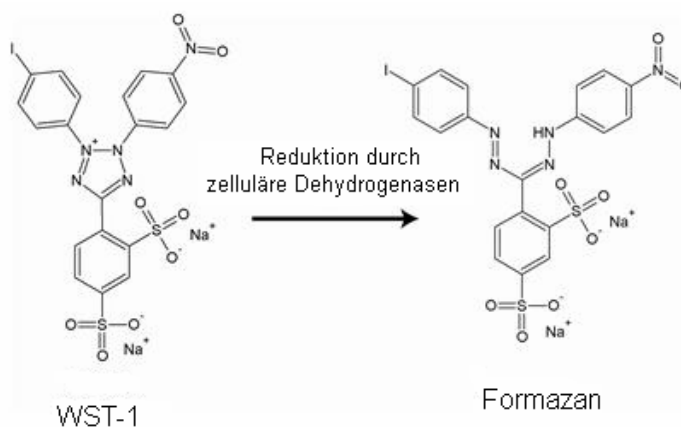


Abb. 2.27: Spaltung des Tetrazoliums Salzes WST-1 zu Formazan durch zelluläre Dehydrogenasen.

Der WST-1 Test ist im Gegensatz zum MTT, XTT und MTS Test, bei denen es sich ebenfalls um Tetrazoliums Salze handelt, zu bevorzugen, da hierbei ein wasserlösliches Spaltprodukt erzeugt wird. Es ist sehr stabil und zeigt daher eine geringe Abbaurate. Darüber hinaus benötigt der Test weder einen zusätzlichen Waschschrift, noch müssen die Zellen für die Auslesung des Tests geerntet werden. Der gesamte Zellviabilitäts-Test kann also auf einer einzigen Mikrotiterplatte durchgeführt werden. Zusätzlich weist der WST-1 Test eine schnellere Farbentwicklung im Vergleich zu anderen Farbstoffen auf.

2.2.6.2.1 Die Durchführung des WST-1 Tests

Die Zellen werden nach dem Trypsinieren wieder in Kultivierungsmedium überführt und deren Zahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hiernach wird die Zellsuspension so mit weiterem Kultivierungsmedium verdünnt, dass in jede Vertiefung durch Pipettieren von 100 μL der Zellsuspension 10^4 Zellen in die entsprechenden Vertiefungen einer 96-Mikrotiterplatte gegeben werden. Jedes Experiment wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach Aussaat werden die Zellen für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert.

Am folgenden Tag wurde das Medium entfernt und die mit Kultivierungsmedium verdünnten Substanzen (10 μM hIAPP, rIAPP und Resveratrol), mit der die Zellen behandelt werden sollten, in jeweils 100 μL zu den Zellen gegeben. Zusätzlich wurden sowohl nicht behandelte Zellen als auch „Wells“ ohne Zellen mit 100 μL der Verdünnungslösung versehen. Diese Proben entsprechen später dem 100%-Wert, bzw. der Blindprobe. Hiernach wurden die Zellen wieder für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 im Inkubator inkubiert.

Das WST-1 Reagenz wurde zunächst im Verhältnis 1:4 mit PBS und diese Lösung schließlich 1:10 mit Kultivierungsmedium verdünnt. Nach Entfernen der inkubierenden Testsubstanz werden jeweils 100 μL des verdünnten WST-1 Reagenzes auf die Zellen gegeben und erneut bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Das Ergebnis des Tests wurde nach 24 Stunden mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts (Infinite M200, Tecan) ausgelesen. Die Quantifizierung der Formazanfärbung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die zugehörige Referenzmessung erfolgte bei 620 nm.

2.2.6.3 Isolierung von hIAPP-Oligomeren und ihre Zytotoxizität

Zuerst wurden 3 mL einer 108 μM hIAPP Lösung in Hexafluoroisopropanol (HFIP) hergestellt. Hiervon wurden 100 μL abgenommen und beide Lösungen über Nacht lyophilisiert. Am nächsten Tag wurde die Probe mit dem geringeren Peptidgehalt für ThT (Thioflavin T)-Messungen in 10 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,5, und 50 μM

ThT auf eine Konzentration von 100 μM verdünnt. Die andere Probe wurde in 10 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,5, ebenfalls auf eine Konzentration von 100 μM verdünnt und für 5 Wochen bei 10 °C gelagert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden auf Eis Proben für Zytotoxizitäts-Tests und AFM-Messungen entnommen, sofort in Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung der hIAPP-Oligomere wurden die zuvor eingefrorenen Proben auf Eis aufgetaut und mit Kultivierungsmedium auf eine Konzentration von 10 und 20 μM verdünnt. Der WST-1-Test wurde wie in Kapitel 2.2.6.2 beschrieben durchgeführt. In diesem Fall wurde zu der Blindprobe und dem 100%-Wert mit 10 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,5) entsprechend verdünntes Kultivierungsmedium gegeben.

Die zeitliche Verfolgung der Bildung der IAPP-Oligomere und der späteren Fibrillenbildung erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzeigenschaften von ThT. Dieser Fluorophor ist ein Benzothiazol-Farbstoff, dessen Fluoreszenz durch kovalente Bindung an amyloide Fibrillen verstärkt wird. ThT besitzt zwei Anregungsmaxima (ex1: 335 nm; em1: 438 nm und ex2: 440 nm; em2: 482 nm), wobei nur das zweite für die hier durchgeführten Versuche von Bedeutung ist. Bis heute ist unklar, wie genau der Fluorophor an die Amyloid-Fibrillen bindet. Es wird angenommen, dass die planare Form durch die Bindung von ThT an die Fibrillen stabilisiert wird [152]. Eine andere Hypothese besagt, dass die positive Ladung von ThT eine Rolle bei dessen Mizellenbildung spielt, welche dann an die Fibrillen binden [153].

In den hier durchgeführten Versuch erfolgte die Anregung von ThT bei 440 nm, wohingegen die Emission bei 482 nm detektiert wurde. Die gemessenen Daten wurden in Relation zu der Fluoreszenz zum Zeitpunkt der vollständig entwickelten Fibrillen gesetzt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Membranwechselwirkung und Zytotoxizität des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP)

3.1.1 Mechanismus der IAPP-Fibrillenbildung an der Lipid-Grenzfläche (IRRAS)

Das Ziel dieser Studie war es, Einblicke in die strukturellen Änderungen der Konformation und der Dynamik des IAPP während des Aggregationsvorgangs mit Hilfe der IRRAS-Methode zu gewinnen. Hierzu wurde das Aggregationsverhalten an verschiedenen Grenzflächen, bestehend aus Lipiden, oder an der Wasser-/Luft-Grenzfläche gemessen und mit der Fibrillenbildung korreliert. Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Blume (Martin-Luther-Universität, Halle/Saale) durchgeführt. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden teilweise in Referenz [138] veröffentlicht.

Zuerst wurde das Aggregationsverhalten von hIAPP an der Wasser-/Luft-Grenzfläche untersucht. Diese Art der Grenzfläche stellt eine ideale hydrophobe Modell-Grenzfläche dar. Die Peptidkonzentration betrug 1 μM . Ausgewertet wurde die Amid-I-Bande, deren charakteristisches Bandenmaximum für α -helikale Strukturen bei 1655 cm^{-1} liegt.

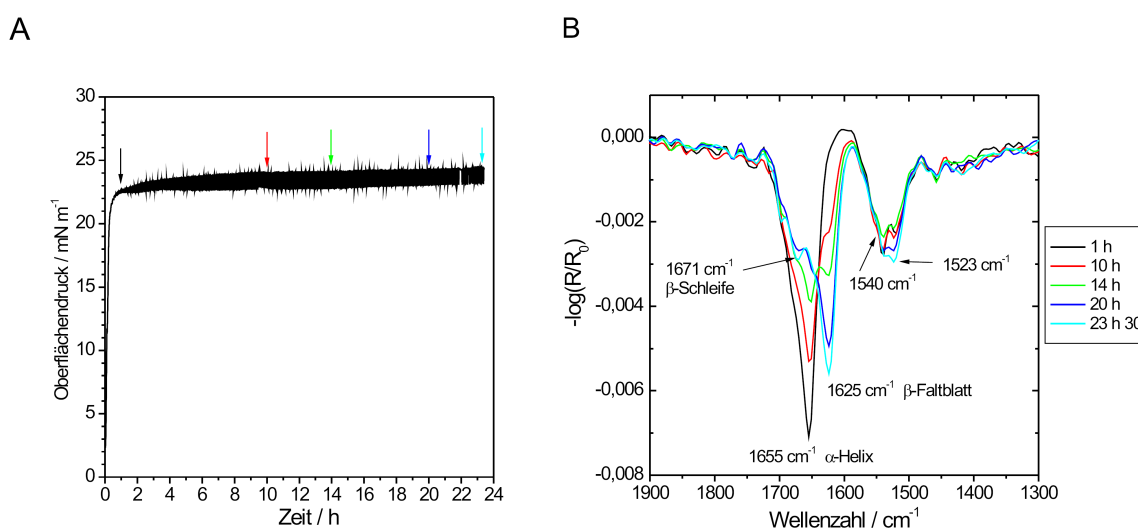


Abb. 3.28: Zeitliche Änderung des Oberflächendrucks (A) und IRRA-Spektren (40° , p -polarisiert) (B) bei Adsorption von $1 \mu\text{M}$ hIAPP an der Luft-/Wasser-Grenzfläche. Die farbigen Pfeile in (A) geben die jeweiligen Zeitpunkte der IRRA-Spektren in (B) an.

Eine Injektion des Peptids bei genannter Konzentration bewirkt einen schnellen Anstieg des Oberflächendrucks, der nach bereits einer Stunde in ein Plateau übergeht (Abb. 3.28 A). Wie man deutlich in Abb. 3.28 B erkennen kann, geht der schnelle Anstieg des Oberflächendrucks mit einer langsamen Änderung der Sekundärstruktur des Peptids einher. Während der ersten Stunden befindet sich die Hauptbande der Amid-I-Bande bei ungefähr 1655 cm^{-1} , was auf eine α -helikale Struktur des Peptids schließen lässt. Nach ungefähr 10 Stunden verschiebt sich das Maximum der Bande nach 1625 cm^{-1} , was für eine Neuordnung der Konformation in eine β -Faltblatt-Struktur spricht. Zusätzlich ist eine Bande bei 1671 cm^{-1} zu erkennen, welche die Präsenz von β -Schleifen nachweist. Der Adsorptionsprozess ist nach ungefähr 20 Stunden beendet. In der Amid-II-Bande lassen sich diese Änderungen auch nachweisen, sind aber weniger ausgeprägt. Die Hauptbande bei 1540 cm^{-1} verschiebt sich mit der Zeit zu 1523 cm^{-1} , was ebenfalls auf einen Übergang von einer α -helikalen zu einer β -Faltblatt-Struktur schließen lässt. Die Amid-II-Bande wurde aufgrund ihrer geringeren Intensität und dadurch schlechterem Signal-zu-Rausch-Verhältnis seltener für quantitative Analysen verwendet und wird im Folgenden nicht weiter diskutiert. Eine von der Grenzfläche entnommene Probe wurde mit Hilfe von AFM untersucht. Hierbei wurde jedoch keine Bildung von amyloiden Fibrillen beobachtet (Abb. 3.35 A).

Bei zuvor durchgeführten Messungen von hIAPP an einer zwitterionischen POPC-Grenzfläche konnten sowohl im Oberflächendruckprofil als auch in den IRRA-Spektren keine Wechselwirkungen des Peptids mit der Monoschicht nachgewiesen werden [138]. Um die Wechselwirkungen von hIAPP mit geladenen Lipid-Modellmembranen genauer zu untersuchen wurden IRRAS-Messungen an einer negativ geladenen POPG-Monoschicht durchgeführt.

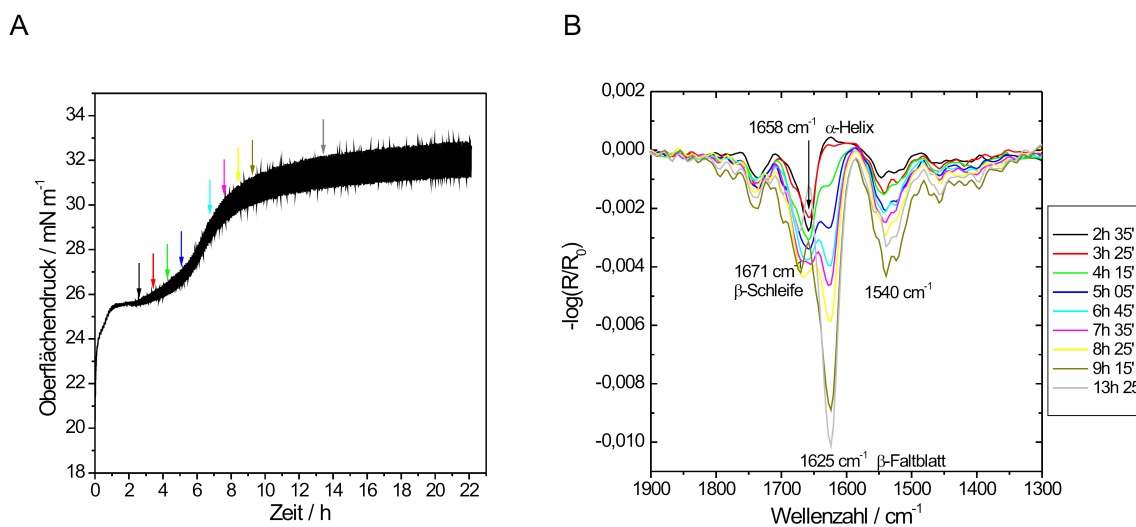


Abb. 3.29: Zeitliche Änderung des Oberflächendrucks (A) und IRRA-Spektren (40°, p-polarisiert) (B) bei Adsorption von 1 μM hIAPP an der POPG-Monoschicht (π_{Anfang} : 10 mN/m). Die farbigen Pfeile in (A) geben die jeweiligen Zeitpunkte der Aufnahme der IRRA-Spektren in (B) an.

Hierzu wurde die Lipidlösung bis zu einem bestimmten Oberflächendruck (10 und 30 mN/m) auf der Grenzfläche gespreitet und die Insertion des Peptids (1 μM) in die Monoschicht beobachtet. Bei 10 mN/m (Abb. 3.29) ist ein anderes Verhalten zu beobachten als bei einer reinen Luft-/Wasser-Grenzfläche. Der Oberflächendruck steigt anfänglich wie bei der Wasser-/Luft-Grenzfläche schnell an, erreicht ein erstes Plateau jedoch erst nach 2 Stunden bei einem Oberflächendruck von 25 mN/m. Es folgt ein weiterer langsamer Anstieg, bis nach ungefähr 20 Stunden ein weiteres Plateau bei ungefähr 32 mN/m erreicht ist. Dieses Zweischnitt-Profil korreliert mit einer ebenfalls in zwei Schritten stattfindenden Änderung der Peptidkonformation. Die anfängliche Hauptbande der Amid-I-Bande, welche bei 1658 cm⁻¹ liegt, was typisch für α -helikale Strukturen ist, spaltet sich nach vier bis fünf Stunden, bei Erreichen des ersten Plateaus des Oberflächendruckprofils, in zwei unterschiedliche Banden auf: eine Bande hoher

Intensität bei 1625 cm^{-1} ((parallele) intermolekulare β -Faltblätter) und eine weitere bei 1671 cm^{-1} (β -Schleifen).

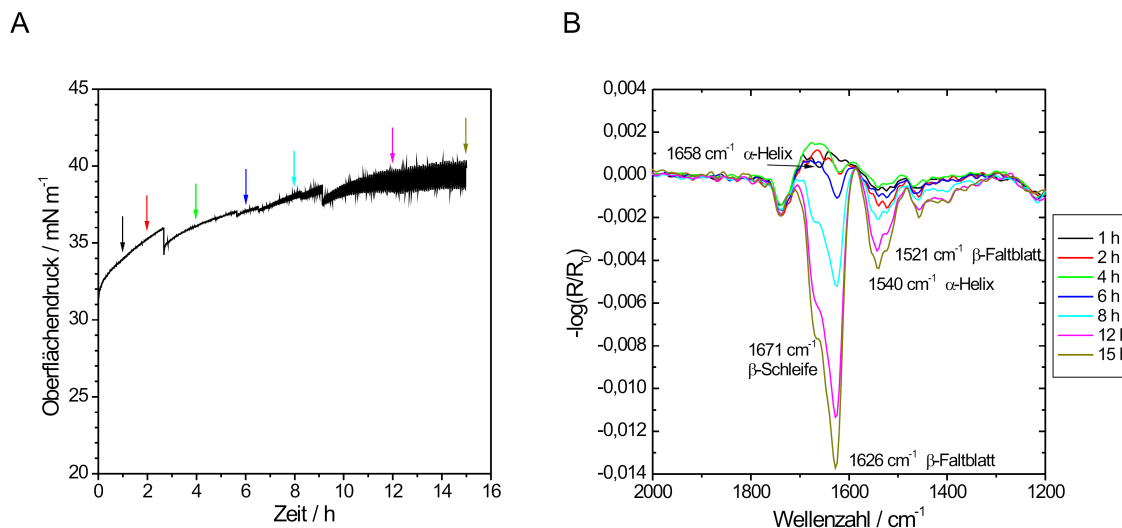


Abb. 3.30: Zeitliche Änderung des Oberflächendrucks (A) und IRRA-Spektren (40° , p -polarisiert) (B) bei Adsorption von $1\ \mu\text{M}$ hIAPP an der POPG-Monoschicht (π_{Anfang} : 30 mN/m). Die farbigen Pfeile in (A) geben die jeweiligen Zeitpunkte der Aufnahme der IRRA-Spektren in (B) an.

Wird eine nicht variierende Orientierung der Übergangsdipolmomente bei der Proteinadsorption angenommen, kann durch eine Abschätzung der Änderungen in der Intensität der Amid-I-Bande auf die Menge an adsorbiertem Peptid und auf die relativen Änderungen der Sekundärstrukturelemente geschlossen werden (Abb. 3.31). In Abb. 3.31 B ist zu sehen, dass nach zwei Stunden eine relative Abnahme der Intensität der α -helikalen Strukturen und der β -Schleifen zu verzeichnen ist, wohingegen die relative Intensität der β -Faltblätter ab diesem Zeitpunkt zunimmt. Nach ungefähr zehn Stunden scheint der Adsorptionsvorgang des Peptids abgeschlossen zu sein (Abb. 3.31 A), wobei auch nach diesem Zeitpunkt weitere Änderungen in der Konformation stattfinden. Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei einem anfänglichen Oberflächendruck von 20 mN/m beobachtet. Die entsprechenden Plateaus im Oberflächendruckprofil wurden nach einer Stunde bei 28 mN/m und nach sieben Stunden bei 35 mN/m detektiert. Die jeweiligen Änderungen in der Amid-I-Bande der gemessenen IRRA-Spektren sind vergleichbar (siehe Anhang Abb. 9.57).

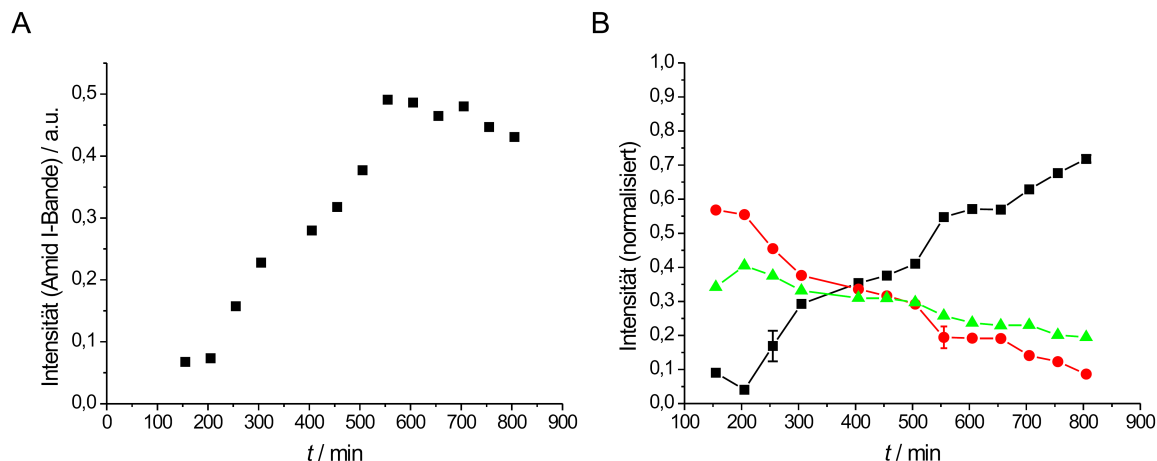


Abb. 3.31: (A) Zeitabhängige Entwicklung der Intensität der Amid I-Bande von $1 \mu\text{M}$ hIAPP an einer POPG-Monoschicht (π_{Anfang} : 10 mN/m), (B) Entsprechende relative Änderungen der Sekundärstrukturelemente α -Helix (rot), β -Faltblatt (schwarz) und β -Schleifen (grün).

Die Packungsdichte der Lipide in einer biologischen Membran entspricht π -Werten von 31 bis 35 mN/m [154]. Um zusätzlich die Insertionsfähigkeit von hIAPP unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden daher Experimente bei einem anfänglichen Oberflächendruck von 30 mN/m durchgeführt (Abb. 3.30). Der zeitabhängige Anstieg des Oberflächendrucks weist auf eine starke Wechselwirkung und Insertion in die POPG-Monoschicht hin, die bei 40 mN/m in ein Plateau mündet. Die Spitzen im Oberflächendruckprofil können durch Übergangs-Umordnungen und Entspannung des Lipidfilms durch Insertion des Peptids erklärt werden. Die ersten spektralen Änderungen bezüglich der Amid-I-Bande finden schneller statt und sind in den ersten zwei Stunden zu beobachten. Der generelle spektrale Verlauf ähnelt dem bei niedrigeren anfänglichen Oberflächendrücken, wie in Abb. 3.31 dargestellt. Hierbei sind Änderungen der Banden bei $1623\text{-}1626 \text{ cm}^{-1}$ zu beobachten, die eine höhere Intensität aufweisen als bei Messungen mit niedrigeren anfänglichen Oberflächendrücken.

Der ähnlich große Anstieg des Oberflächendrucks von 7 bis 9 mN/m nach Zugabe des Peptids ist unabhängig vom anfänglichen Oberflächendruck und zeigt, dass hIAPP in der Lage ist, in eine POPG-Monoschicht einzudringen. Der Grenzoberflächendruck von 40 mN/m ist deutlich höher als in einer biologischen Membran, was dafür spricht, dass hIAPP in der Lage ist, auch *in vivo* in biologische Membranen zu insertieren. Weiterhin weisen die Daten darauf hin, dass bei der Insertierung des Peptids eine konformelle Neuordnung von einer hauptsächlich α -helikalen Anordnung zu einer β -faltblattreichen Struktur stattfindet. Die intensive Bande bei 1625 cm^{-1} deutet auf die

Bildung eines Proteinnetzwerks aus parallelen β -Faltblättern in der Grenzfläche hin. Es scheint, dass je höher der Oberflächendruck, desto stärker ist die Bindung des adsorbierten Proteinnetzwerks. Alle Experimente wurden in 10 mM Phosphatpuffer mit 100 mM NaCl bei einem pH von 7,4 durchgeführt. Bei diesem pH befindet sich die positive Ladung vornehmlich im N-terminalen Abschnitt des Peptids. Dieser Bereich könnte für die Insertion verantwortlich zu sein, wie dies auch schon für andere negativ geladene Lipidsysteme berichtet wurde [155]. Um detailliertere Aussagen über die Struktur des Peptids an der Grenzfläche zu machen, wurde mit Hilfe von AFM eine von der Grenzfläche entnommene Probe nach Abschluss des IRRAS-Experiments analysiert. Die AFM-Aufnahmen von 1 μ M hIAPP an der POPG-Grenzfläche zeigen Filamente mit einer Weite von 35 bis 70 nm und einer Höhe von 3 bis 5 nm (Abb. 3.35 B). Diese Größe ist charakteristisch für amyloide Fibrillen [68, 156-161]. Die strukturellen Einzeleinheiten der Fibrillen betragen im Durchmesser 2 bis 5 nm und scheinen aus zwei bis sechs β -Faltblättern zu bestehen. Diese Protofilamente winden sich umeinander, um seilartige Fibrillen von 7 bis 13 nm Weite zu bilden, bzw. binden sie lateral aneinander um lange Bänder zu bilden, die eine Dicke von 2 bis 5 nm aufweisen und bis zu 30 nm breit sind [161]. Die hier gemessenen Höhen könnten in der Größenordnung von ein bis zwei Protofilamenten liegen [161-163].

Unter der Annahme, dass der N-terminale Bereich des IAPP verantwortlich für die Insertion in die Membran ist, sollte rIAPP aufgrund seiner sequenziellen Ähnlichkeit im N-Terminus ebenfalls in der Lage sein, in die POPG-Monoschicht einzudringen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden zusätzliche Experimente mit einer POPG-Monoschicht durchgeführt, beginnend mit einem Oberflächendruck von 20 mN/m (Abb. 3.32). Es wurde beobachtet, dass rIAPP in einer α -helikalen Anordnung in die Monoschicht inseriert. Darüberhinaus ist ein ähnlich großer Anstieg des Oberflächendrucks auf 31 mN/m sichtbar. Im Gegensatz hierzu konnte keine Verschiebung des Maximums der Amid-I-Bande detektiert werden, bis auf einen leichten Rückgang der Intensität der Amid-I-Bande während des gesamten Adsorptionsprozesses. Diese Messungen bestätigen frühere Studien, in denen gezeigt wurde, dass die N-terminale Region des Peptids nicht an der Fibrillenbildung, sondern lediglich an dem anfänglichen Insertionsprozess beteiligt ist [67, 162, 164]. Nach Beendigung des IRRAS-Experiments wurde mit Hilfe von AFM auch eine von der

Grenzfläche entnommene Probe mit rIAPP und POPG untersucht. Hierbei wurden nur oligomere Strukturen mit einer Höhe von ungefähr 3 nm detektiert (Abb. 3.35 C). Es wurden keine Fibrillen beobachtet.

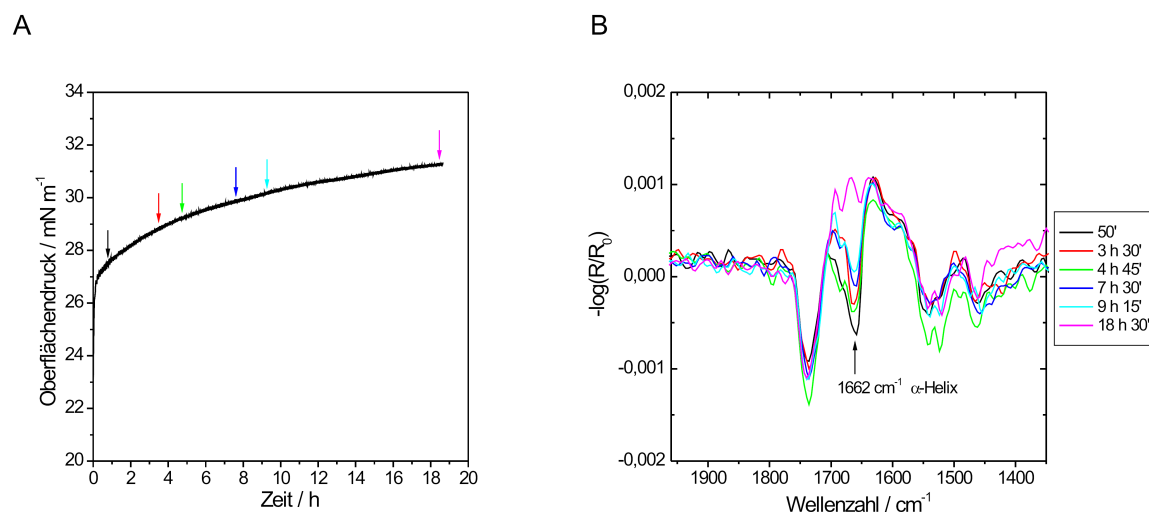


Abb. 3.32: Zeitliche Änderung des Oberflächendrucks (A) und IRRA-Spektren (40° , p -polarisiert) (B) bei Adsorption von $1 \mu\text{M}$ rIAPP an der POPG-Grenzfläche (π_{Anfang} : 20 mN/m). Die farbigen Pfeile in (A) geben die jeweiligen Zeitpunkte der Aufnahme der IRRA-Spektren in (B) an.

Bisher gibt es unterschiedliche Prognosen bezüglich der Struktur des aggregierenden hIAPP (Abb. 3.33). Es wurde berichtet, dass die Aggregation der C-terminalen Region (Aminosäuren 20 bis 29 und 30 bis 37) wahrscheinlich durch hydrophobe Wechselwirkungen verursacht wird. Insbesondere die Aminosäuren 20 bis 29 sollen an der Fibrillenbildung maßgeblich beteiligt sein [165]. Es ist daher vorstellbar, dass die Aminosäuren 20 bis 37 zur Ausbildung von β -Faltblättern neigen. Die Prognose der Sekundärstrukturanteile des IAPP zeigt, dass im N-terminalen Bereich (Aminosäuresequenz 8 bis 14) die Bildung von α -helikalen Strukturen wahrscheinlich ist und weitere drei Abschnitte mit β -Faltblättern existieren. An der Position 31 wurde eine β -Schleife vorhergesagt, was zu einem antiparallelen β -Faltblatt führen könnte.

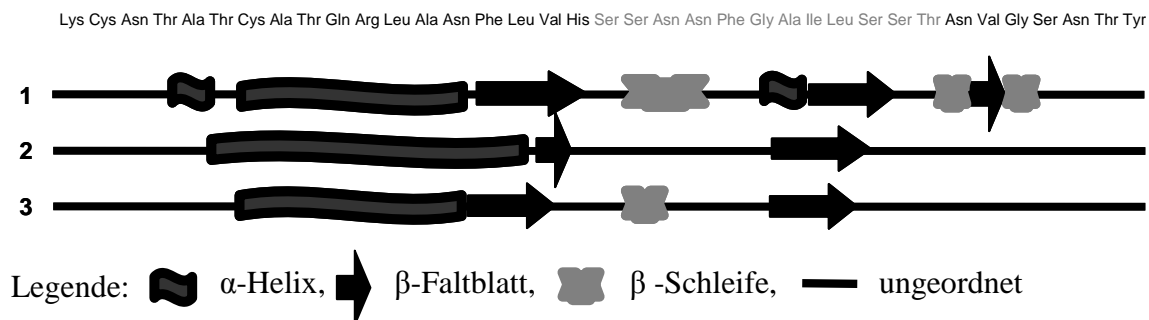


Abb. 3.33: Sekundärstruktur-Prognosen für hAPP (Algorithmen: 1. Doppelprognose; 2. Hierarchische neurale Netzwerk-Klassifizierung; 3. Selbst-optimierte Prognosen-Methode).

Durch Verwendung von s-polarisiertem Licht können nur Übergangsdipolmomente parallel zur Oberfläche detektiert werden, wohingegen durch p-polarisiertes Licht Übergangsdipolmomente sowohl parallel als auch senkrecht zur Oberfläche messbar sind. Aus diesem Grund ändert sich bei Verwendung von p-polarisiertem Licht die Intensität der Bande in der Nähe des Brewster-Winkels. Die Änderungen in Form, Intensität und Position der Bande lassen Aussagen über die Orientierung der Sekundärstrukturelemente zu [127, 135, 137]. Das Übergangsdipolmoment der Haupt- β -Faltblatt-Komponente, welche sich bei ungefähr 1627 cm^{-1} befindet, liegt senkrecht zur Peptidkette. In diesem Abschnitt der Arbeit wurden IRRAS-Messungen mit p-polarisiertem Licht bei verschiedenen Einfallswinkeln im Gleichgewichtszustand des Systems (Plateau im Oberflächendruckprofil) durchgeführt. Hierdurch kann auf die Orientierung der β -Faltblätter an der Wasser/Luft-, bzw. der Lipid-Grenzfläche geschlossen werden.

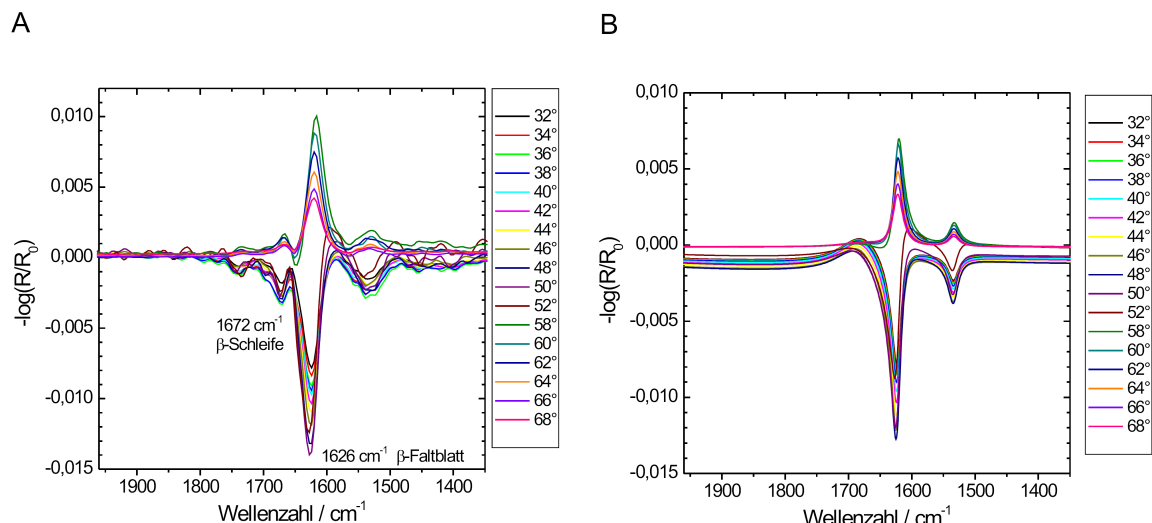


Abb. 3. .34: (A) *p*-polarisierte IRRA-Spektren von 1 μM hIAPP adsorbiert an einer POPG-Monoschicht (verschiedene Einfallswinkel, π_{Anfang} : 32,2 mN/m). (B) Simulationen der IRRA-Spektren einer β -Faltblatt-Struktur, die flach an der Wasser-/Luft-Grenzfläche liegt. Die Berechnungen wurden für *p*-polarisiertes Licht und verschiedene Einfallswinkel für die Amid I- und II- Bande durchgeführt.

Bei Messungen von hIAPP an der Luft-/Wasser-Grenzfläche betrug der Oberflächendruck 23,6 mN/m (Abb. 3.28). Bei entsprechenden Experimente von hIAPP an der POPG-Grenzfläche betrug der Oberflächendruck 32,2 mN/m, wobei hier ähnliche Beobachtungen gemacht wurden (Abb. 3. .34 A). Die zugehörigen Simulationen der Amid-Banden, entsprechen einer parallel zur Grenzfläche verlaufenden Orientierung des hIAPP an der POPG-Grenzfläche bei Verwendung von *p*-polarisiertem Licht und verschiedenen Einfallswinkeln, ist in Abb. 3. .34 B zu sehen. Bei Vergleich der experimentellen und simulierten Daten kann man darauf schließen, dass die β -Faltblätter flach an der Lipid-Grenzfläche liegen. Der Vergleich der Experimente und Simulationen an der Wasser-/Luft-Grenzfläche zeigten eine ähnliche Orientierung des Peptids an der Grenzfläche (siehe Anhang Abb. 9.58).

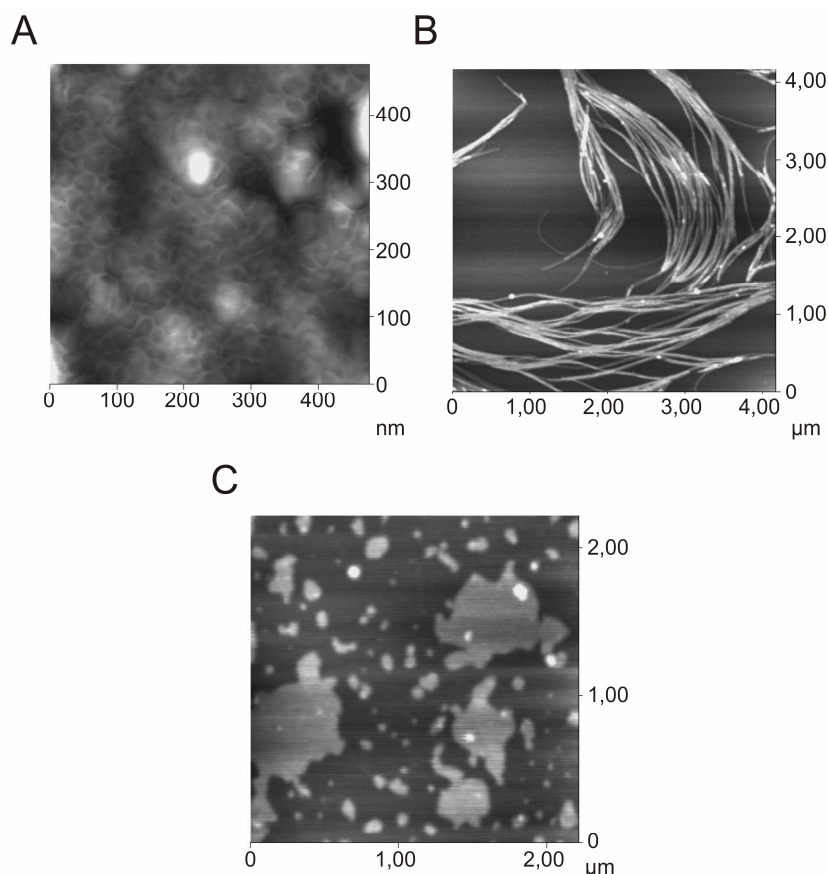


Abb. 3.35: AFM-Aufnahmen der Aggregat-Strukturen des IAPP nach Erreichen des Gleichgewichts der Reaktion: (A) hIAPP ($1 \mu\text{M}$) entnommen von einer Wasser-/Luft-Grenzfläche, (B) hIAPP ($1 \mu\text{M}$) entnommen von einer POPG-Monoschicht, (C) rIAPP ($1 \mu\text{M}$) entnommen von einer POPG-Monoschicht.

3.1.1.1 Diskussion

Zur Untersuchung der Fibrillenbildung des IAPP hinsichtlich seiner Sekundärstruktur und Orientierung an der Wasser/Luft-, bzw. Lipid-Grenzfläche wurden IRRAS-Messungen an einem Langmuir-Trog durchgeführt. Hierdurch konnten Einblicke in die Struktur des hIAPP und die anfänglichen Schritte während der hIAPP-Membran-Wechselwirkungen und folgenden Fibrillenbildung gewonnen werden. So konnte eine starke Interaktion von hIAPP mit negativ geladenen Membranen (POPG) nachgewiesen werden. hIAPP scheint vornehmlich durch elektrostatische Wechselwirkungen mit seinem α -helikalen N-Terminus an die Membran zu binden. Nach einer Verzögerungsphase, die abhängig von der Peptidkonzentration und des anfänglichen

Oberflächendrucks ist, findet die Umordnung der Struktur in β -Faltblätter mit einhergehender Fibrillenbildung statt. Dies lässt darauf schließen, dass die anfängliche α -helikale Struktur einer „Vor-Organisation“ des Peptids zur anschließenden Bildung größerer Komplexe (Abb. 3.36) dient. Die beobachtete transiente Bildung α -helikaler Strukturen scheint zum einen ein Übergangszustand bei der Amyloidbildung zu sein, zum anderen aber auch wichtig für die partielle Insertierung in die Membran zu sein, da die letztendlichen Fibrillen nicht in der Lage sind, mit dem Lipidfilm zu interagieren. Dieses Verhalten wurde zuvor in einer anderen Studie mit einem ähnlichen Lipidsystem beobachtet [155].

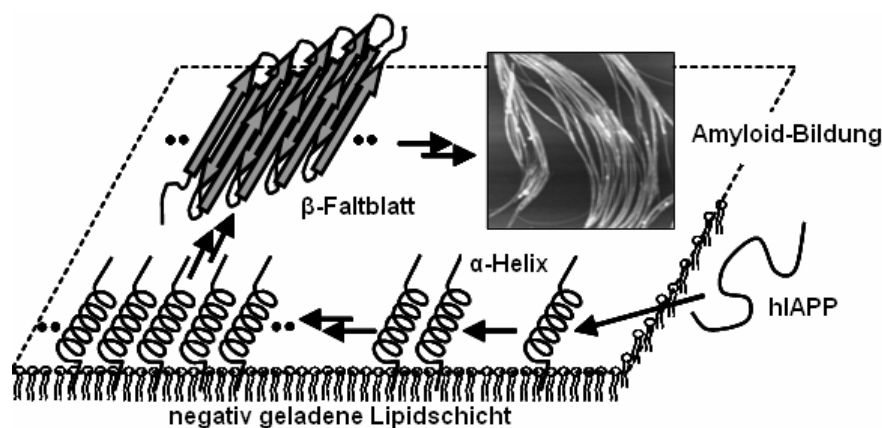


Abb. 3.36: Modell der hIAPP-POPG-Monoschicht-Wechselwirkung, lipidinduzierte Konformationsänderung des hIAPP und anschließende Fibrillenbildung.

Es wurde bereits berichtet, dass die Aminosäuren 8 bis 14 von hIAPP dazu neigen, α -helikale Strukturen auszubilden, wohingegen die isolierte Aminosäuresequenz 8 bis 20 Fibrillen bilden kann [157]. Die erhöhte Peptidkonzentration und die reduzierte Beweglichkeit erleichtern die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen des membrangebundenen α -helikalen Peptids und führen zu einer fibrillären β -Faltblattstruktur. Aus den IRRA-Spektren konnte entnommen werden, dass diese fibrilläre Struktur hauptsächlich aus parallelen β -Faltblättern besteht, aber auch einen kleinen Anteil an β -Schleifen enthält. Es wurde bereits in früheren Studien berichtet, dass auf eine partielle Insertion des N-Terminus in die Membran in einer parallelen Helix-Orientierung eine beschleunigte Umordnung zu einer antiparallelen β -Faltblattstruktur folgt [63].

Eine ähnliche Umwandlung wird ebenfalls für hIAPP an der Wasser-/Luft-Grenzfläche (reine hydrophobe Grenzfläche) beobachtet. Aus den hier gemessenen IRRAS- und den unterstützenden AFM-Messungen kann daher geschlossen werden, dass hIAPP sowohl an hydrophobe als auch an negativ geladene hydrophile Grenzflächen adsorbiert. Die Bildung von Fibrillen findet jedoch nur an negativ geladenen Oberflächen statt. An hydrophoben Oberflächen wurden nur kleine amorphe Aggregate detektiert. Die Ergebnisse des rIAPP weisen zudem darauf hin, dass das nichtamyloidogene Peptid zwar in negativ geladene Membranen inseriert, dort aber nur α -helikale Strukturen ausbildet, wie dies auch schon für IAPP aus der Maus nachgewiesen wurde [155]. Der N-Terminus scheint also ausschließlich an der Insertion des Peptids in die Membran beteiligt zu sein, nicht aber an der Bildung der Fibrillen.

Es wird angenommen, dass die Bildung von α -helikalen Strukturen vornehmlich in nativen unstrukturierten amyloiden Proteinen/Peptiden stattfindet [68, 158-160]. Das an der Entstehung der Alzheimer-Krankheit beteiligte A β bildet α -helikale Strukturen in Mizellen aus. Zudem wurde gezeigt, dass A β in wässriger Lösung ebenfalls α -helikale Strukturen ausbildet, bevor diese sich zu amyloiden Fibrillen umwandeln [158, 159]. Auch der N-Terminus des α -Synuklein, welches an der Entstehung von Parkinson beteiligt ist, bildet α -Helices aus, wodurch die Amyloidbildung und Toxizität erheblich beeinflusst wird [160]. Die transiente Bildung α -helikaler Strukturen scheint daher ein weit verbreiteter Mechanismus im Verlaufe der Amyloidbildung von nativ unstrukturierten Proteinen/Peptiden zu sein.

3.1.2 Die Zytotoxizität von IAPP und ihre Inhibierung

Die hier durchgeführten Versuche dienten zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung des IAPP und dessen Inhibition. Die hier erhaltenen Ergebnisse wurden in den Referenzen [166] und [167] veröffentlicht. Im Speziellen wurde analysiert, in welchem Stadium der Fibrillenbildung des IAPP die Zytotoxizität am höchsten ist. Als Zellmodell wurde hier die Zelllinie INS-1E verwendet. Dabei handelt es sich um β -Zellen, welche aus dem Pankreas der Ratte stammen und somit ein geeignetes Modell für die Untersuchung der toxischen Wirkung des IAPP im zellulären System darstellen.

3.1.2.1 Zytotoxizität der IAPP-Oligomere und Fibrillen

Die Bildung der amyloiden Fibrillen kann mit Hilfe von fluoeszzenzspektroskopischen Messungen der Fluoreszenzintensität des amyloid-spezifischen extrinsischen Fluorophors Thioflavin T (ThT) quantifiziert werden. Bei Präsenz von amyloiden Fibrillen emittiert er bei einer Wellenlänge von 482 nm, nachdem er bei 440 nm angeregt wurde [152]. Der *ThT-Assay* von 100 μM hIAPP in 10 mM Acetat-Puffer (pH 5,5) bei 10 °C zeigt in den ersten 100 Stunden eine langsame Kinetik typisch für eine Nukleationsphase. Dieser folgt eine langsame exponentielle Wachstumsphase. Nach ungefähr 400 Stunden scheint die Bildung der Fibrillen abgeschlossen zu sein (Abb. 3.37).

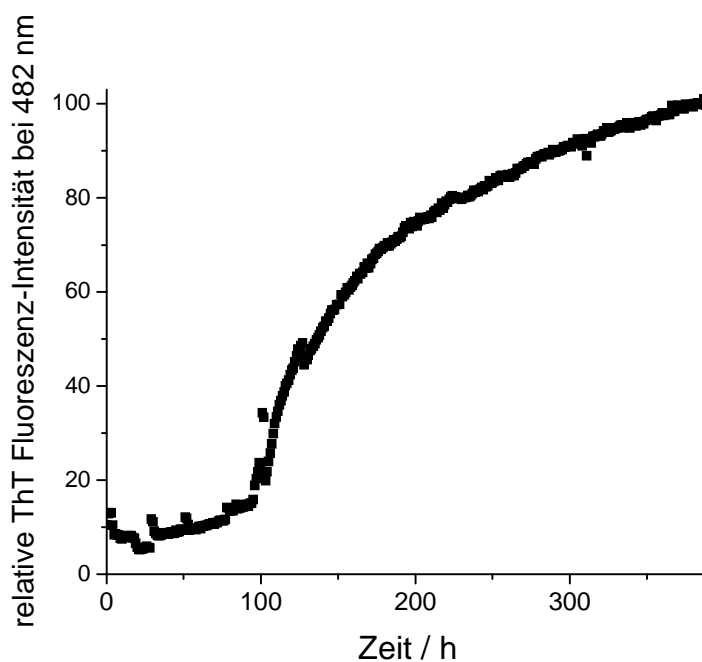


Abb. 3.37: Zeitabhängige fluoeszzenzspektroskopische Messung von 100 μM IAPP mit 50 μM ThT in 10 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) bei 10 °C. Die Fluoreszenzintensität wurde auf den höchsten Wert (nach 400 h) normiert.

Die langsame Kinetik der Aggregation erleichtert die Analyse der unterschiedlichen hIAPP-Aggregations-Stadien zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Um die Zytotoxizität der unterschiedlichen hIAPP-Aggregationsspezies zu untersuchen, wurden Proben nach 0, 7, 25, 50, 100, 150, 250, 504 und 672 Stunden nach Beginn des

Aggregationsprozesses entnommen. Zusätzlich wurden auch zu den Zeitpunkten 0, 100 und 150 Stunden Proben der Aggregationspezies von 100 μM rIAPP entnommen, welches zuvor wie das hIAPP behandelt wurde.

Die Zytotoxizität der entnommenen Proben wurde mit Hilfe des WST-1-Tests an der β -Zelllinie aus dem Pankreas der Ratte INS-1E getestet. In Abb. 3.38 und Abb. 3.39 ist deutlich zu erkennen, dass die toxische Wirkung des hIAPP von der Dauer der Aggregatbildung abhängt. Der Vergleich mit der ThT-Fluoreszenz zeigt einen deutlichen Zusammenhang zwischen der *Lag*-Phase der ThT-Fluoreszenzintensität und der gemessenen Zytotoxizität der in dem Zeitraum (0-100 Stunden) entnommenen Aggregatspezies. Bis 100 Stunden zeigt hIAPP bei einer Konzentration von 10 μM eine Zellviabilität von nur 3,5 bis 10 % (Abb. 3.38) und bei 20 μM eine Überlebensrate der Zellen im Bereich von 1-2 % (Abb. 3.39).

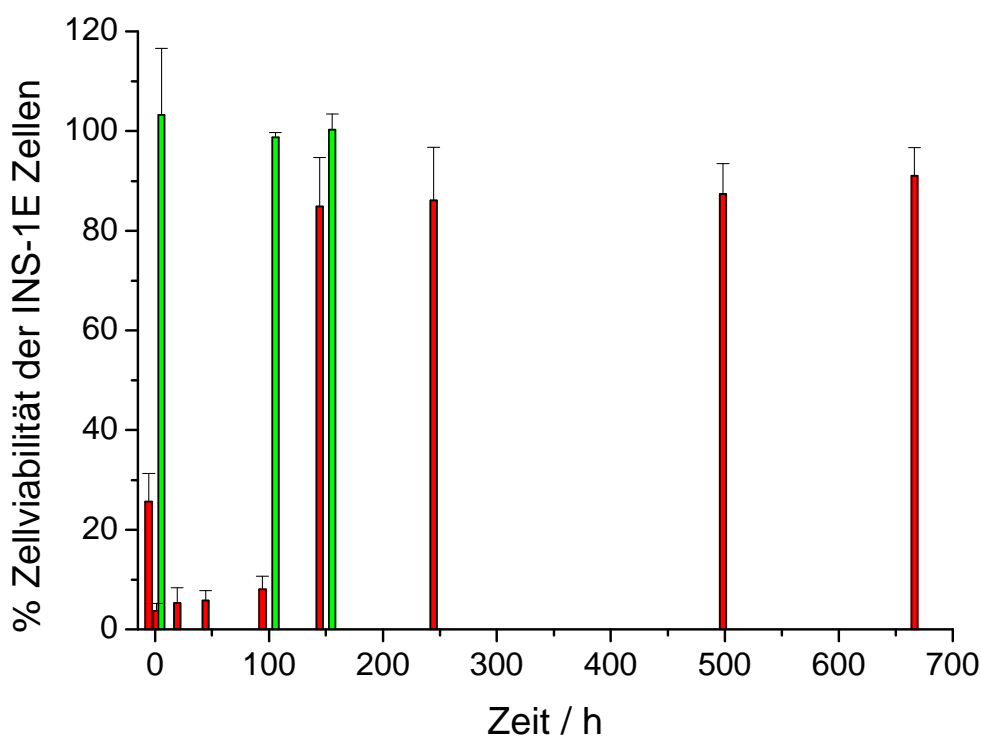


Abb. 3.38: Überlebensrate der pankreatischen β -Zelllinie INS-1E nach 24-stündiger Inkubation mit den isolierten IAPP-Aggregatspezies (10 μM) von hIAPP (rot) und rIAPP (grün), quantifiziert durch einen WST-1-Zellviabilitätsassay.

Mit fortschreitender Zeit nimmt die ThT-Fluoreszenzintensität zu, was auf eine zunehmende Bildung amyloider Fibrillen schließen lässt. Dies geht einher mit einer drastischen Abnahme der Zytotoxizität der isolierten Aggregatspezies. Während der exponentiellen Wachstumsphase (150-250 Stunden) beträgt die Zellviabilität 80-85 % für 10 μM und für 20 μM hIAPP 50-60 %. Nach einer Aggregationszeit von 3 bis 4 Wochen beträgt die Überlebensrate der Zellen ungefähr 90 % für 10 μM und 75-80 % für 20 μM des hIAPP. Zusätzlich ist eine konzentrationsabhängige Wirkung der Aggregatspezies hinsichtlich ihrer Zytotoxizität zu beobachten,

Des Weiteren wurde die Zytotoxizität des rIAPP untersucht. In Abb. 3.38 und Abb. 3.39 ist deutlich zu erkennen, dass sowohl für eine Konzentration von 10 μM als auch für 20 μM kein zytotoxischer Effekt innerhalb der ersten 150 Stunden zu verzeichnen ist.

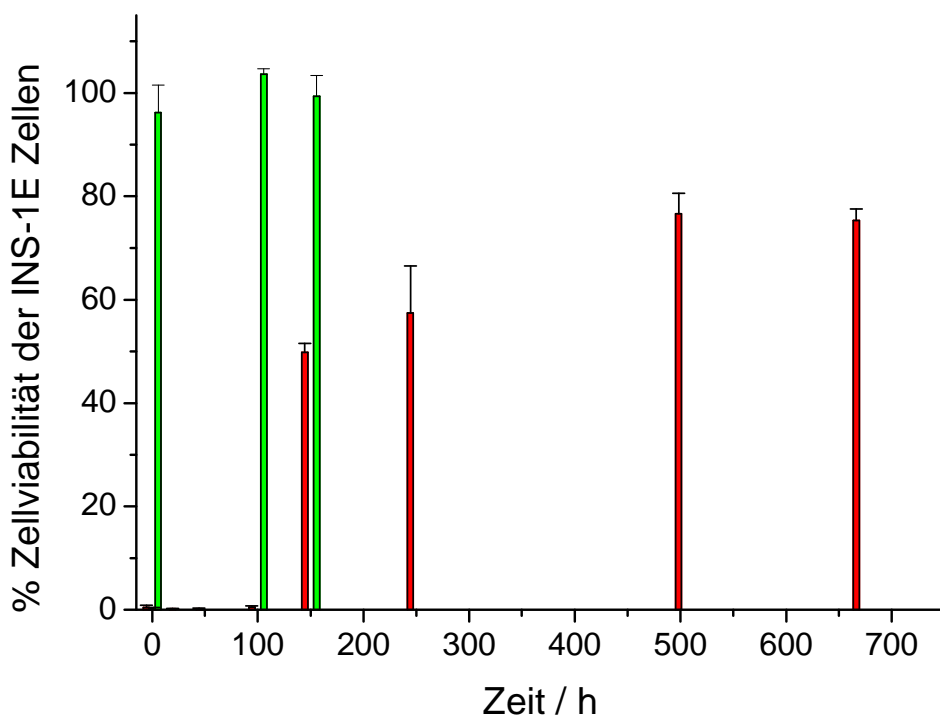


Abb. 3.39: Überlebensrate der pankreatischen β -Zelllinie INS-1E nach 24-stündiger Inkubation mit den isolierten IAPP-Aggregatspezies (20 μM) von hIAPP (rot) und rIAPP (grün), quantifiziert durch einen WST-1-Zellviabilitätsassay.

3.1.2.1.1 Diskussion

Die Analyse der verschiedenen isolierten hIAPP-Spezies wurde in dieser Studie mit Hilfe eines Zytotoxizitäts-Tests und der Messung der ThT-Fluoreszenzintensität durchgeführt. Die erhaltenen Daten belegen die Vermutung, dass es sich bei der toxischen Spezies des hIAPP um Oligomere und nicht die vollständig ausgebildeten Fibrillen handelt, da diese die niedrigste Überlebensrate der INS-1E Zellen bei Durchführung des WST-1 Tests aufzeigten. Die Morphologie der isolierten hIAPP-Spezies wurde zudem mit AFM charakterisiert, was die Hypothese der toxischen Oligomere bestätigte. Die vollständig ausgebildeten hIAPP-Fibrillen wiesen hingegen nur eine geringe Zytotoxizität auf und scheinen die weniger reaktive Spezies zu sein. Diese sind wahrscheinlich bereits durch intermolekulare Wechselwirkungen stabilisiert. Durch ihr größeres Ausmaß im Vergleich zur monomeren Form des Peptids ist es den ausgebildeten Fibrillen immer noch möglich, mechanischen Stress auf die Zellmembran auszuüben, was somit zu Störungen der Barrierefunktion führen kann. Dies könnte für die schwache Toxizität, die bei den voll ausgebildeten Fibrillen zu beobachten ist, verantwortlich sein, welche für 10 μM bei ca. 10 % und für 20 μM bei ungefähr 25 % liegt. Als Kontrolle wurde rIAPP verwendet, welches unter den gleichen Bedingungen in den ersten 150 Stunden im Gegensatz zum hIAPP keine toxische Wirkung auf die Zellen hat. Neuere, nicht veröffentlichte Untersuchungen zeigen jedoch einen leichten anfänglichen toxischen Effekt des rIAPP bei einer Konzentration von 20 μM . Dies kann durch eine mögliche negative Beeinflussung des im Überschuss vorliegenden zelleigenen Peptids auf den Stoffwechsel der Zelle erklärt werden. Die Identifizierung und Charakterisierung der zytotoxischen Spezies ist von großer Bedeutung für die Erforschung der amyloid-bezogenen Krankheiten. Die Aufklärung des Zusammenhangs zwischen Peptidwechselwirkung und Zytotoxizität könnte die Grundlage für die Entwicklung anti-amyloider bzw. anti-fibrillenbildender Inhibitoren sein.

3.1.2.2 Resveratrol als Inhibitor der hIAPP-Zytotoxizität

Zur Untersuchung der Inhibierung der zytotoxischen Wirkung des hIAPP wurde die niedermolekulare Verbindung Resveratrol verwendet. Dieser natürliche vorkommende Inhibitor gehört zur Gruppe der Polyphenole und ist vor allem in roten Weintrauben enthalten. Er zeigte bereits in zuvor durchgeführten Studien eine inhibierende Wirkung bezüglich der Zytotoxizität des A β [95]. Zusätzlich wurde bereits in *in vitro* Studien gezeigt, dass Resveratrol ein starker Inhibitor der amyloiden IAPP-Fibrillenbildung sein könnte [167].

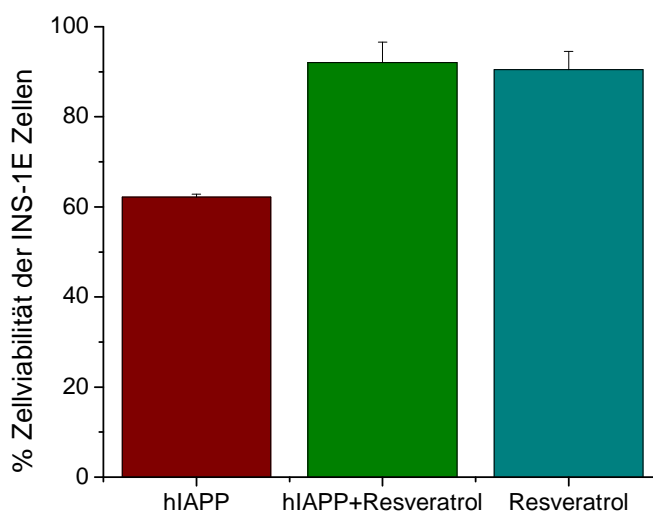


Abb. 3.40: Überlebensrate der pankreatischen β -Zelllinie (INS-1E) nach Behandlung mit 10 μ M hIAPP (rot), 10 μ M hIAPP und 10 μ M Resveratrol (grün) und 10 μ M Resveratrol (türkis).

In Kontrollexperimenten wurde beobachtet, dass eine alleinige Inkubation der Zellen mit 10 μ M hIAPP nach 24 Stunden zu einer Überlebensrate der Zellen von 60 % führt. Eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit jeweils 10 μ M hIAPP und der Inhibitorsubstanz führte hingegen zu einer Zellviabilität von 90 %. Resveratrol an sich weist in den hier durchgeführten Versuchen fast keine zytotoxische Wirkung auf (Abb. 3.40). Die Ergebnisse dieser *in vivo*-Analyse zeigen, dass Resveratrol ein geeigneter Inhibitor der zytotoxischen Wirkung des hIAPP sein könnte.

3.1.2.2.1 Diskussion

Die Inhibierung der Bildung von oligomeren und fibrillären Spezies während der Amyloidformierung ist eine wichtige Fragestellung auf dem Gebiet der amyloidbezogenen Krankheiten. Zuvor wurde bereits eine synthetisch hergestellte Substanz namens Phenolsulfonphthalein aufgrund seiner anti-amyloiden Wirkung als potentieller Inhibitor bezüglich der IAPP-Fibrillenbildung angesehen [168]. Aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften der synthetisch hergestellten Wirkstoffe sind jedoch weitere Untersuchungen und Optimierungen notwendig, bevor diese als potentielles Medikament in Betracht gezogen werden können. Natürlich vorkommende Polyphenole haben dagegen den Vorteil, dass sie eine nur sehr geringe toxische Wirkung auf die Zellen haben und zudem eine hohe Biokompatibilität aufweisen. Die charakteristischen Eigenschaften von natürlich vorkommenden Polyphenolen wurden bereits weitreichend hinsichtlich ihrer inhibierenden Wirkung für A β sowie auch für andere amyloid-bezogene Krankheiten untersucht. So wurde für das Polyphenol Epigallocatechingallat (EGCG) eine inhibierende Wirkung für A β und α -Synuklein nachgewiesen, in dem es die Bildung von Oligomeren fördert, aus denen keine amyloiden Fibrillen mehr gebildet werden können [169]. Auch für Resveratrol wurde bereits eine Aufhebung der zytotoxischen Wirkung des A β (25-35) und dessen Fibrillenbildung beobachtet [94, 170, 171].

In der hier durchgeführten Studie wurde die inhibierende Wirkung von Resveratrol hinsichtlich der Amyloidbildung des humanen IAPP untersucht. Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass durch seine Zugabe die zytotoxische Wirkung des hIAPP fast aufgehoben werden kann und es selbst kaum eine toxische Wirkung auf die Zellen hat. Es wird angenommen, dass Polyphenole ihre Wirkung durch Wechselwirkung mit den hydrophoben Taschen, die sich bei der Bildung der amyloiden Fibrillen bilden, ausüben. Weiterhin wurde berichtet, dass diese Art von Inhibitoren nicht mit den monomeren Formen der amyloidogenen Peptide/Proteine interagiert, sondern eher mit den präfibrillären Strukturen wechselwirkt [91, 93]. Dies wurde auch anhand von AFM-Aufnahmen gezeigt, in denen nur kleine sphärische Strukturen nach Zugabe von Resveratrol detektiert wurden [167]. Zudem zeigten abgeschwächte totalreflexionsinfrarotspektroskopische- (ATR-FTIR)- [167], Röntgen-Reflexions-[172]

und Fluoreszenzmikroskopie- [173] Studien ebenfalls eine inhibierende Wirkung des Resveratrols hinsichtlich der Fibrillenbildung des hIAPP. In einer früheren Studie wurde zudem von einer anti-oxidantischen Wirkung des Resveratrols berichtet [171].

Niedermolekulare Substanzen wie Resveratrol besitzen aufgrund ihrer inhibierenden Wirkung und hohen Biokompatibilität ein großes Potenzial für die Wirkstoffentwicklung zur Behandlung von Diabetes Mellitus Typ II.

3.1.3 Isolation der Plasmamembran aus INS-1E-Zellen

Bisher ist noch sehr wenig über die Zusammensetzung der Plasmamembranen von β -Zellen im Pankreas bekannt. Für ein besseres Verständnis der Interaktion von hIAPP mit der Membran wäre dies von großer Bedeutung. Hieraus könnten neue Erkenntnisse sowohl zur anfänglichen Wechselwirkung als auch dem Mechanismus der Fibrillenbildung unter physiologischen Bedingungen gewonnen werden. Aus diesem Grund wurde die Plasmamembran der INS-1E-Zellen isoliert. Zur Isolierung wurde das „Qproteome Plasma Membrane Protein Kit“ von Qiagen verwendet. Dieses Kit wurde bereits erfolgreich bei HeLa- [140] und HUVEC [141]-Zellen angewendet. Nach Gefriertrocknung der aus den INS-1E Zellen erhaltenen Probe wurden als Resultat ca. 170 mg Isolat erhalten, welches sich aus Lipiden, Proteinen und Puffersalzen zusammensetzt. Der mit dem Bradford-Test bestimmte Proteingehalt betrug 7,15 $\mu\text{g/mL}$.

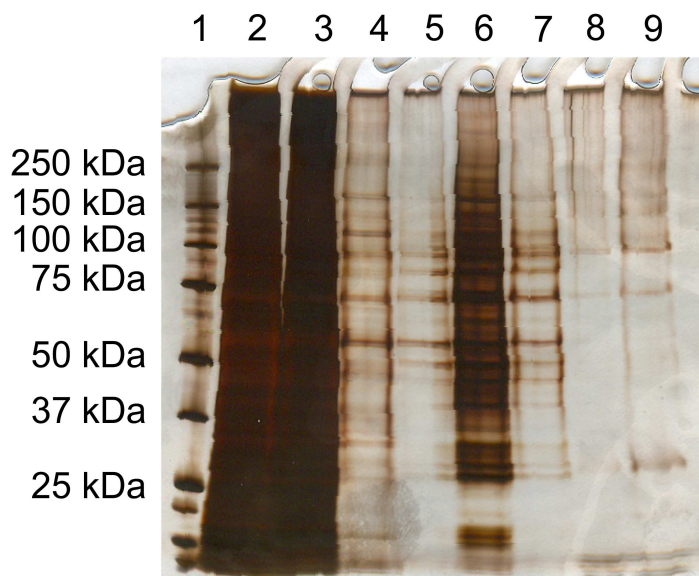


Abb. 3.41: Bis-Tris-Gel der jeweiligen Fraktionen nach den einzelnen Waschschrinen: 1.: Marker, 2.: Zelllysat, 3.: Überstand nach Bindung an magnetische Kügelchen, 4.+5.: erste und zweite Lyse, 6.+7.: erster und zweiter Waschdurchgang, 8.+9.: endgültige vereinigte Plasmamembran-Fraktionen (10 und 20 μ L).

Die Reinheit des Isolats wurde mit einem Bis-Tris-Gel und anschließender Silberfärbung bestimmt. Hierbei sollten sich in der endgültig vereinigten Plasmamembran-Fraktion hauptsächlich hochgewichtige Proteine, wie Cadherine oder auch die Na/K-ATPase, welche ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa und höher aufweisen, befinden. Eine Bande bei 50 kDa würde für das Vorkommen von Calreticulin, einem Protein aus dem endoplasmatischen Retikulum sprechen. Proteine aus dem Zytosol wie GAPDH, aus dem Golgi-Apparat wie GS28 oder aus dem Mitochondrium wie TIM23 sollten entsprechend Banden bei 26 kDa, 29 kDa und 22 kDa aufweisen. In dem hier gezeigten Gel sind in den finalen Fraktionen hauptsächlich Proteine mit einem Molekulargewicht höher als 100 kDa und eine Bande bei 25 kDa zu finden.

3.1.3.1 Diskussion

Bei den hier durchgeführten Experimenten handelt es sich um die ersten Versuche der Isolation der Plasmamembran aus INS-1E Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass der Reinheitsgrad der gereinigten Isolate bei ~ 70 % zu liegen scheint. Es sind auf dem Gel fast nur Proteinbanden oberhalb von 100 kDa zu finden, was für die Präsenz von Plasmamembranproteinen spricht. Die zusätzliche Bande bei 25 kDa könnte dem

zytosolischen Protein GAPDH entsprechen. Zur genaueren Analyse der Lipidzusammensetzung werden die Proben mit Hilfe der Massenspektroskopie charakterisiert.

Sollte dies erfolgreich sein, können die so isolierten Plasmamembranen für weitere IAPP-Studien mit z.B. ATR-FTIR oder auch FCS verwendet werden. Zudem können durch die Angabe der Lipidzusammensetzung weitere Faktoren, die für die Interaktion des IAPP mit der Membran von Bedeutung sind, gefunden werden.

3.2 Wechselwirkungen der Ras-Isoformen mit Membranen

3.2.1 Ladungsabhängiges Bindungsverhalten von H-Ras und K-Ras4B an Membranen (SPR)

In der hier durchgeführten Studie wurde das Bindungsverhalten von H-Ras und K-Ras4B an Membranen mit unterschiedlichen Anteilen negativer Ladung mit Hilfe der SPR untersucht. K-Ras4B besitzt in seiner HVR eine Polylysinsequenz, die sich in der Nähe des Farnesylrests befindet und daher wahrscheinlich an der Wechselwirkung mit der Membran beteiligt ist. Aus diesem Grund wurden POPC-Membranen mit unterschiedlichen negativen Ladungsanteilen (0, 20 und 40 % POPS) angefertigt. Es standen mehrere Modifikationen des K-Ras4B Proteins zur Verfügung. Zum einen wurde eine am Serin 181 phosphorylierte Version des Proteins (pKRas) untersucht. Diese Modifikation ist dafür bekannt, für die Dissoziation und Translokation des Proteins von der Plasmamembran verantwortlich zu sein [121]. Zudem wurden der Austausch von Serin 181 mit Glutaminsäure (K-Ras S181E, eine Analogon zum pK-Ras), die Entfernung der Carboxymethylierung am C-Terminus (K-Ras-OH), nicht-farnesyliertes K-Ras und ein einfach farnesyliertes H-Ras untersucht (Abb. 1.16). Alle untersuchten Proteine befinden sich im GDP-gebundenen Zustand. Diese wurden im Rahmen einer Zusammenarbeit von Dr. Sebastian Koch (AG Waldmann (MPI, Dortmund)) zur Verfügung gestellt. Bei Betrachtung der erhaltenen Sensorgramme, z.B. für die natürliche Form des K-Ras4B (Abb. 3.42), wird deutlich, dass die Bindung des K-Ras4B an die Membran ladungsabhängig ist. Mit steigender Konzentration an negativ geladenem POPS ist ein Anstieg des Assoziationssignals zu beobachten.

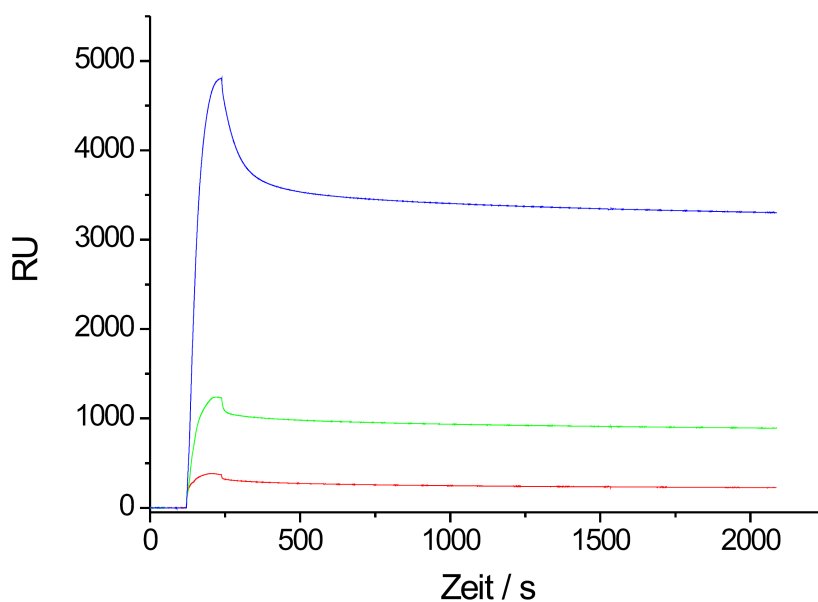


Abb. 3.42: SPR-Sensorgramme von K-Ras4B an POPC (rot), POPS mit 20 % POPS (grün) und POPC mit 40 % POPS (blau).

Die Auswertung der Assoziationsphase der erhaltenen Bindungs-Sensorgramme der genannten K- und H-Ras Proteine an die unterschiedlich geladenen Membranen erfolgte mit Hilfe linearer Regression, um relative Aussagen über den anfänglichen Integrierungsprozess des Proteins in die Membran machen zu können. Die Anfangsphase der Dissoziation wurde an eine biexponentielle Funktion (2.9) angepasst. Bei der Anpassung der gesamten Dissoziationskurve wäre eventuell ein triexponentielles Modell geeigneter gewesen. Um aber Effekte, wie Rückbindung, auf die intrinsischen kinetischen Parameter der Dissoziation zu verringern, wurde nur die anfängliche Phase der Dissoziation angepasst, was mit einem biexponentiellen Modell gut möglich war. Die zwei unterschiedlichen Dissoziationsphasen lassen sich z.B. mit zwei unterschiedlichen Bindungsprozessen, zum einen durch den Farnesylrest und zum anderen durch elektrostatische Wechselwirkungen der Polylysinequenz mit der Membran, erklären. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde aus den beiden Dissoziationsraten $k_{\text{off},1}$ und $k_{\text{off},2}$ eine mittlere Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante \bar{k}_{diss} nach Gleichung (2.10) berechnet. Alle ausgewerteten Konstanten geben hierbei relative Werte wieder, lassen aber einen sinnvollen Vergleich der Bindungsverhältnisse der verschiedenen Proteine an die verwendeten Membranen untereinander zu. In Abb. 3.43 sind die Ergebnisse der Assoziations- (A) und Dissoziationsdaten (B) grafisch dargestellt.

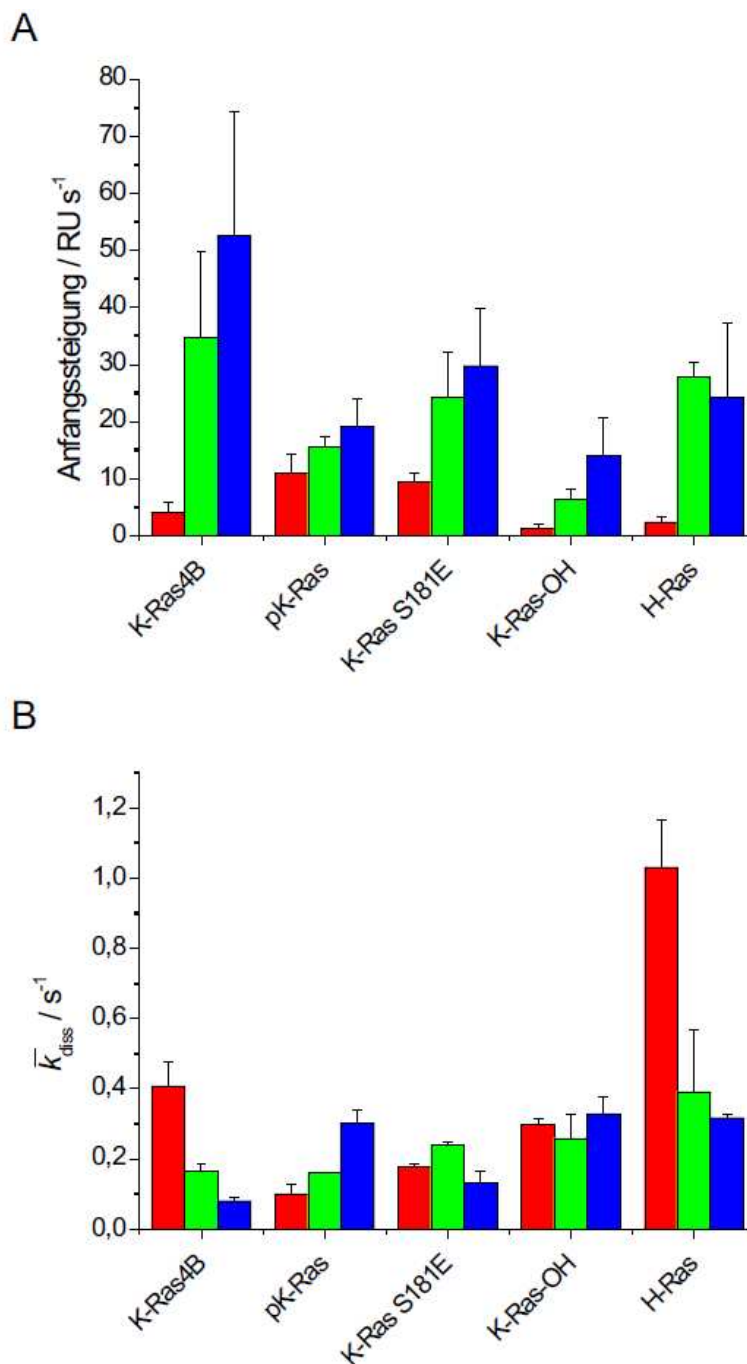


Abb. 3.43: SPR-Messungen der Bindung der H- und K-Ras Proteine (K-Ras4B, pK-Ras, K-Ras S181E, K-Ras-OH und einfach farnesyliertes H-Ras) an Membranen unterschiedlicher Ladungsdichte (POPC (rot), POPC/POPS (4:1) (grün) und POPC/POPS (3:2) (blau)).

Die Auswertung der Anfangssteigung (Abb. 3.43 A) lässt erkennen, dass alle Proteine mit zunehmender negativer Ladung in der Membran eine beschleunigte Bindung an diese aufweisen. Vor allem die nicht weiter modifizierte Form des K-Ras4B zeigt eine deutliche Ladungsabhängigkeit bei der Bindung an die Membran. Bei den Proteinen K-Ras S181E und H-Ras ist diese ebenfalls deutlich zu erkennen. Das phosphorylierte pK-

Ras und K-Ras-OH weisen hingegen innerhalb des Fehlers nur einen geringen Einfluss der erhöhten negativen Ladung der Membran auf die anfängliche Assoziation auf. Zudem sind die Werte der anfänglichen Assoziationssteigung des K-Ras-OH allgemein niedriger als die der anderen untersuchten K- und H-Ras Proteine.

Die Dissoziation der Proteine von der Membran verhält sich hinsichtlich ihrer Werte für \bar{k}_{diss} entgegengesetzt. Auch die Dissoziation des natürlichen K-Ras4B von der Membran scheint ladungsabhängig zu sein. Es weist mit einem \bar{k}_{diss} von $0,4 \text{ s}^{-1}$ die höchste Dissoziationsrate der untersuchten K-Ras Proteine auf. Mit steigender Ladung sinken die Werte weiter auf $0,16 \text{ s}^{-1}$ für 20 %igen und $0,07 \text{ s}^{-1}$ für 40 %igen POPS-Gehalt, wobei es sich bei letzterem System um das mit der langsamsten Membranbindungskinetik aller untersuchten K-Ras-Analoga handelt. Die am Serin 181 phosphorylierte Form des K-Ras4B, pKRas, weist im Gegensatz hierzu steigende \bar{k}_{diss} -Werte mit zunehmender Ladungsdichte der Membran auf. Von reinen zwitterionischen POPC-Membranen dissoziiert pK-Ras am langsamsten mit einem \bar{k}_{diss} -Wert im Bereich von $0,1 \text{ s}^{-1}$. Eine Erhöhung der negativen Ladungsdichte führt hierbei zu einem Anstieg der durchschnittlichen Dissoziationsrate bis zu $0,3 \text{ s}^{-1}$, was auf eine Destabilisierung der Bindung schließen lässt. Das Phosphat-Analogon K-Ras Ser181E weist hingegen keine eindeutige ladungsabhängige Tendenz auf. Es zeigt sowohl bei zwitterionischen als auch bei einem Anteil negativer Ladung von 20 % \bar{k}_{diss} -Werte im Bereich von $0,2 \text{ s}^{-1}$, welche bei einem Gehalt von 40 % POPS auf $0,12 \text{ s}^{-1}$ sinken. Die durchschnittlichen Dissoziationsraten des K-Ras OH, dem die Carboxymethylierung am C-Terminus fehlt, weisen innerhalb des Fehlers ebenso keine eindeutige auf- oder absteigende Tendenz auf und zeigen \bar{k}_{diss} -Werte im Bereich von $0,25 \text{ s}^{-1}$. Nicht-farnesyliertes K-Ras4B zeigte bei allen verwendeten Membranen eine viel geringere Signalstärke und damit Affinität (nicht gezeigt). Die Auswertung der Dissoziation des einfach farnesylierten H-Ras Proteins zeigt wie K-Ras4B sinkende \bar{k}_{diss} -Werte mit steigender Ladungsdichte. Diese beginnen für zwitterionische Membranen bei $1,0 \text{ s}^{-1}$ und fallen dann auf $0,32 \text{ s}^{-1}$ bei einem Ladungsanteil von 40 %.

3.2.1.1 Diskussion

Die Untersuchung der Bindungseigenschaften von K-Ras4B und der verschiedenen Analoga als auch von einfach-farnesyliertem H-Ras zeigen deutliche Unterschiede bezüglich der Assoziations- bzw. Dissoziationskinetik an Membranen unterschiedlicher Ladungsstärke auf. Die natürliche Form des K-Ras4B weist mit zunehmender negativer Ladungsstärke in der Membran eine ansteigende Assoziationsrate und eine sinkende Dissoziationsrate auf. Die phosphorylierte Form, pK-Ras, zeigt hingegen eine ansteigende Dissoziationsrate mit zunehmender Ladungsdichte. Die Membranbindung scheint also durch Modifizierung des Serin 181 durch ein Phosphat erheblich beeinflusst zu werden. Die beobachtete lineare Abhängigkeit der Bindungsaffinität von der Ladungsdichte der Membran spricht gegen vorherige Modellpeptid-Messungen, die von einem eher exponentiellen Verhalten berichten [174, 175]. Dies lässt darauf schließen, dass sich das Bindungsverhalten des Peptids von dem des vollständigen Proteins durch zusätzliche Wechselwirkungen des Proteinkorpus mit der Membran erheblich unterscheidet. Zuvor wurde berichtet, dass sich K-Ras S181E, bei dem Serin 181 gegen eine Glutaminsäure ausgetauscht worden ist, wie das phosphorylierte pK-Ras verhalten sollte und somit ein leichter zu synthetisierendes Analogon darstellt [121]. Bei Betrachtung seines Bindungsprofils an die Membranen unterschiedlicher negativer Ladungsdichte und dem Vergleich mit pK-Ras fällt auf, dass das Dissoziationsverhalten wie zwischen dem des K-Ras4B und pK-Ras liegt. Hinsichtlich ihrer Assoziationsstärke könnte man aber innerhalb des Fehlers darauf schließen, dass sich pK-Ras und K-Ras S181E in ihrer Membranwechselwirkung ähneln. Das unterschiedliche Dissoziationsverhalten könnte auf die unterschiedlichen pK_a -Werte des Phosphats und der Säuregruppe der Glutaminsäure zurückzuführen sein. Letztere liegt bei dem hier verwendeten pH von 7,4 nicht so stark dissoziiert vor wie die Phosphatgruppe und zeigt dementsprechend weniger negative Ladungen, die zur Abstoßung von ebenfalls negativ geladenen Membranen führen. Aus diesem Grund kann aus den hier vorliegenden Ergebnissen geschlossen werden, dass das K-Ras S181E kein geeignetes Analogon für pK-Ras ist.

Bezüglich des K-Ras OH wurden im Vergleich zum nicht-modifizierten K-Ras4B höhere Dissoziationsraten und niedrigere Assoziationsraten beobachtet. Dies belegt die

Wichtigkeit der C-terminalen Methylierung für eine stabile Membranassoziation. Erstaunlich ist zudem, dass die Lage der Carbonsäure am C-Terminus die Bindung an die Membran mehr beeinflusst als die eingeführte Glutaminsäure in K-Ras S181E. Dies lässt sich vermutlich auf die bessere Zugänglichkeit der Carbonsäure zurückführen, was zu einem vermehrten Einfluss der negativen Ladung führt. Über den abstoßenden Effekt der C-terminalen Carbonsäure wurde bereits in früheren Studien mit ein- und zweifach lipidierten Peptiden berichtet [176, 177].

Das untersuchte einfach-farnesylierte H-Ras wies unabhängig von der Ladungsdichte der Membran sehr hohe Dissoziationsraten auf. Dies zeigt, dass eine einfache Farnesylierung allein nicht für eine stabile Integration in die Membran ausreicht. Dies wurde auch für das einfach-farnesylierte N-Ras beobachtet (siehe 3.2.3). Die polybasische Sequenz des K-Ras4B scheint also einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität der Bindung an die Membran zu haben, wobei dies wahrscheinlich aber nur in Kombination mit einem zusätzlichen Lipid-Membrananker gilt.

Zuvor wurde bereits von einem diffusionsgetriebenen elektrostatischen Modell für die Bindung des K-Ras4B an die Membran berichtet [114]. Dieses Verhalten kann durch die hier erhaltenen Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden. Dies bedeutet, dass die Bindung von K-Ras4B an die Membran wahrscheinlich kein passiver Transport ist, sondern eher aktiv gerichtet erfolgt. So könnte es sein, dass die Verteilung des K-Ras4B über verschiedene Endomembranen, wie z.B. die des endoplasmatischen Retikulums, und anschließend über Delokalisierung durch Transportproteine wie PDE- δ erfolgt. Dieses Transportprotein besitzt im Vergleich zu ungeladenen Membranen eine höhere Affinität, jedoch eine niedrigere im Vergleich zu geladenen Membranen. Aus diesem Grund könnte es an der Extraktion aus der kaum POPS enthaltenden Endomembran des endoplasmatischen Retikulums und dem Transport zur geladenen Plasmamembran, die im Gegensatz zum ER mehr POPS enthält, beteiligt sein.

Von den hier berichteten Daten wurde der Anteil an unspezifischer Bindung noch nicht subtrahiert, da für die Referenzmessungen nicht mehr genügend Protein zur Verfügung stand. Da die Oberfläche des L1-Chips nicht komplett mit Vesikeln bedeckt war (mind. 75 % Lipidbedeckung), könnte es sein, dass das zu untersuchende Protein auch unspezifisch an die Chipoberfläche bindet. Diese besteht aus Alkylketten, die an eine

Dextranschicht gebunden sind [147]. Es befinden sich also ähnliche Eigenschaften auf dem reinen Chip wie in der untersuchten Membran. Zusätzlich ist die Lipidbedeckung der drei untersuchten Membranen sehr ähnlich, so dass die hier erhaltenen Ergebnisse nicht durch eine zunehmende unspezifische Bindung erklärt werden können. Somit dürfte die Subtraktion dieser Wechselwirkungen vom Gesamtsignal keine Änderung der hier erhaltenen relativen Ergebnisse ergeben.

3.2.2 Adsorptionsverhalten und Orientierung von N-Ras an Lipidgrenzflächen (IRRAS)

Die hier beschriebenen IRRAS-Messungen des N-Ras Far/Far (GDP) wurden hinsichtlich einer Vergleichsstudie mit den bereits untersuchten Proteinen N-Ras HD/HD (GDP) und N-Ras HD/Far (GDP) durchgeführt [127]. Aus diesem Grund wurde die Adsorption des Proteins ebenfalls an der POPC/BSM/Chol (50:25:25 mol%)- als auch an der Luft/D₂O-Grenzfläche vermessen. Zudem wurde der Einfluss einer an das Protein gekoppelten Fluoreszenzmarkierung (Bodipy-FL) untersucht, welche sich zum einen am Protein, zum anderen am Peptid, der HVR, befindet. Sobald sich ein Gleichgewicht eingestellt hatte, wurden sowohl mit p- als auch mit s-polarisiertem Licht winkelanhängige Spektren zur Ermittlung der Orientierung des Proteins an der Grenzfläche aufgenommen. Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Blume (Martin-Luther-Universität, Halle/Saale) durchgeführt.

Zunächst wurde die Adsorption von N-Ras Far/Far im normalen und markierten Zustand an der Luft-D₂O-Grenzfläche gemessen. Wie man in Abb. 3.44 A erkennen kann, gibt es kaum einen Unterschied zwischen den drei Varianten des N-Ras bezüglich der Oberflächenisotherme an der Luft-D₂O-Grenzfläche. Alle Proteine weisen einen ähnlichen exponentiellen Verlauf hinsichtlich des Oberflächendrucks auf und haben nach ungefähr sechs Stunden einen Gleichgewichtszustand bei ~22 mN/m erreicht. Die Amid-I Bande der aufgenommenen IRRA-Spektren weisen hingegen leichte Unterschiede hinsichtlich ihrer Intensität und Lage auf (Abb. 3.44 B). Die Amid-I Bande im Gleichgewichtszustand des unmarkierten Proteins weist seine Hauptbande bei 1639 cm⁻¹ auf, wohingegen diese Bande bei dem am Peptid markierten Protein in zwei

Banden bei 1648 cm^{-1} und 1636 cm^{-1} mit einer Schulter bei 1620 cm^{-1} aufgeteilt ist. Die Hauptbande des am Proteinkern markierten N-Ras liegt bei 1624 cm^{-1} . Die höchste Intensität weist das unmarkierte N-Ras Far/Far auf. Zusätzlich wurde die Adsorption der drei Proteine an einer POPC/BSM/Chol (2:1:1)-Grenzfläche bei einem anfänglichen Oberflächendruck von 10 mN/m gemessen. Die Lipidmischung weist bei Raumtemperatur eine Koexistenz von flüssig-geordneter und flüssig-ungeordneter Phase auf [20]. In Abb. 3.44 C und D sind die entsprechenden Oberflächendruckprofile und IRRA-Spektren dargestellt. Die Oberflächenisothermen geben ein ähnliches Verhalten des unmarkierten Proteins im Vergleich zum am Peptid-markierten wieder. Beide Proteine zeigen einen ähnlichen exponentiellen Verlauf und erreichen nach ungefähr fünf Stunden den Gleichgewichtszustand bei $\sim 25\text{-}27\text{ mN/m}$. Das am Protein markierte N-Ras Far/Far hingegen weist zwar auch einen ähnlichen anfänglichen exponentiellen Anstieg auf, erreicht seinen Gleichgewichtszustand allerdings erst nach ungefähr zwölf Stunden bei einem höheren Oberflächendruck ($\sim 30\text{ mN/m}$) im Vergleich zu den beiden anderen Proteine. Wie auch an der Luft-D₂O-Grenzfläche weisen die Amid-I Banden bei Adsorption an die POPC/BSM/Chol-Grenzfläche leichte Unterschiede auf. Das unmarkierte Protein zeigt eine Hauptbande bei 1640 cm^{-1} , wohingegen das am Peptid markierte Protein zwei Hauptbanden, bei 1636 cm^{-1} und 1648 cm^{-1} , mit einer Schulter bei 1621 cm^{-1} aufweist. Das Protein-markierte N-Ras Far/Far zeigt zwei Hauptbanden, bei 1648 cm^{-1} und 1636 cm^{-1} , mit einer Schulter bei 1621 cm^{-1} . Hierbei zeigt die Amid-Bande des unmarkierten Proteins erneut die höchste Intensität.

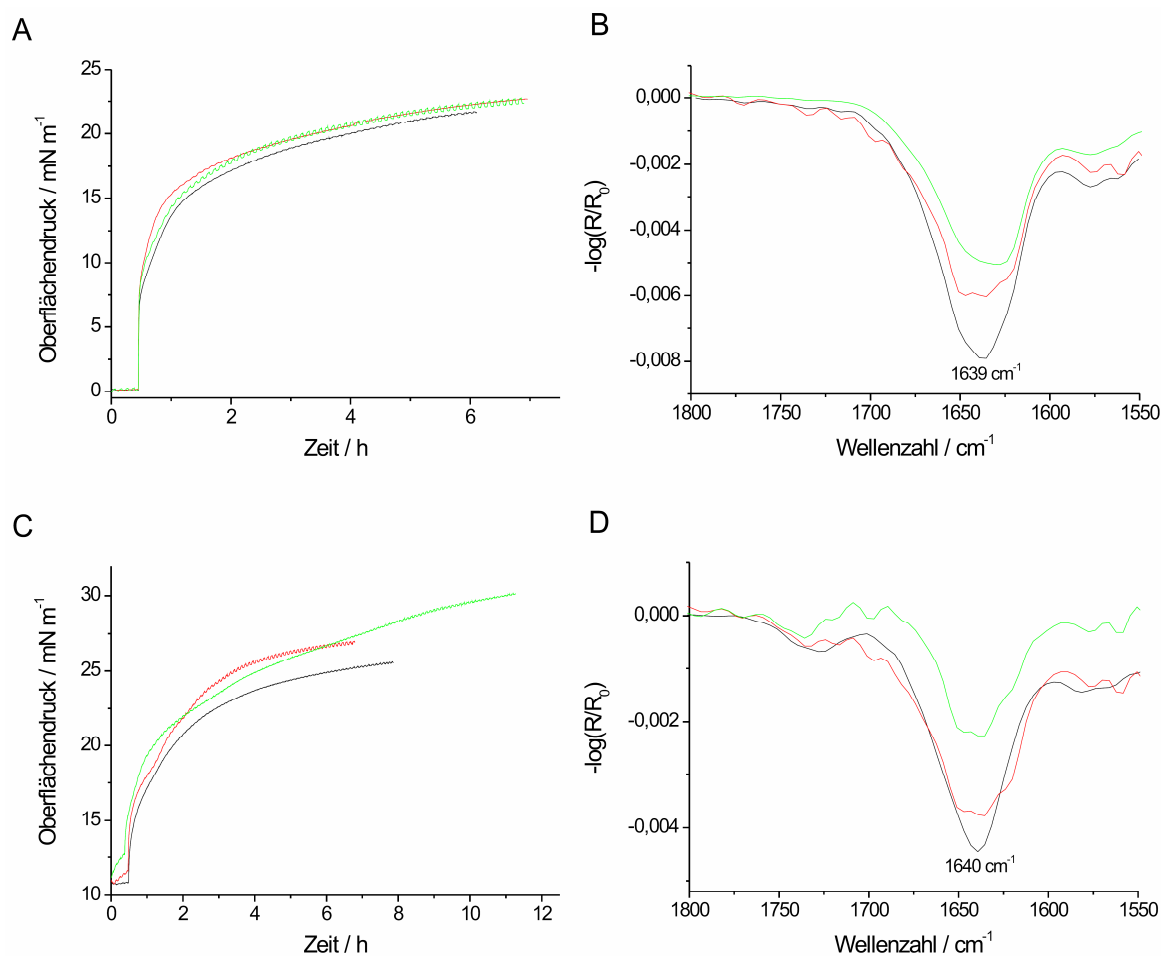


Abb. 3.44: Oberflächenisotherme und IRRA-Spektren von N-Ras Far/Far im unmarkierten (schwarz), am Peptid-markierten (rot) und am Proteinkern markierten (grün) Zustand an der Luft-D₂O-Grenzfläche (A und B) als auch an der POPC/BSM/Chol (50:25:25)-Grenzfläche (C und D) mit $\pi_{\text{Anfang}} = 10 \text{ mN/m}$. Alle Spektren wurden mit s-polarisiertem Licht bei einem Einfallswinkel von 40° aufgenommen.

Um Aussagen über die Orientierung des Protein an der Grenzfläche treffen zu können, wurden nach Einstellung des Gleichgewichts winkelabhängige Messungen sowohl mit p- als auch mit s-polarisiertem Licht durchgeführt. In Abb. 3.45 sind die resultierenden Amid-Banden der IRRA-Spektren für unmarkiertes N-Ras Far/Far an der Luft-D₂O-Grenzfläche als auch an der POPC/BSM/Chol-Grenzschicht dargestellt. Beim Vergleich der beiden Grenzflächen ist deutlich zu sehen, dass die Spektren fast identisch sind. Es gibt also keinen deutlichen Unterschied bezüglich der Orientierung an den beiden Grenzflächen. Zur Bestimmung der Orientierung des Proteins an der Grenzschicht müssen die aufgenommenen Spektren mit simulierten verglichen werden. Die Simulation der Daten wurden bereits von Andreas Kerth (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Evaluierung der Orientierungen von N-Ras HD/Far und N-Ras

HD/HD durchgeführt [127] und können somit auch für die hier durchgeführten Messungen des N-Ras Far/Far verwendet werden.

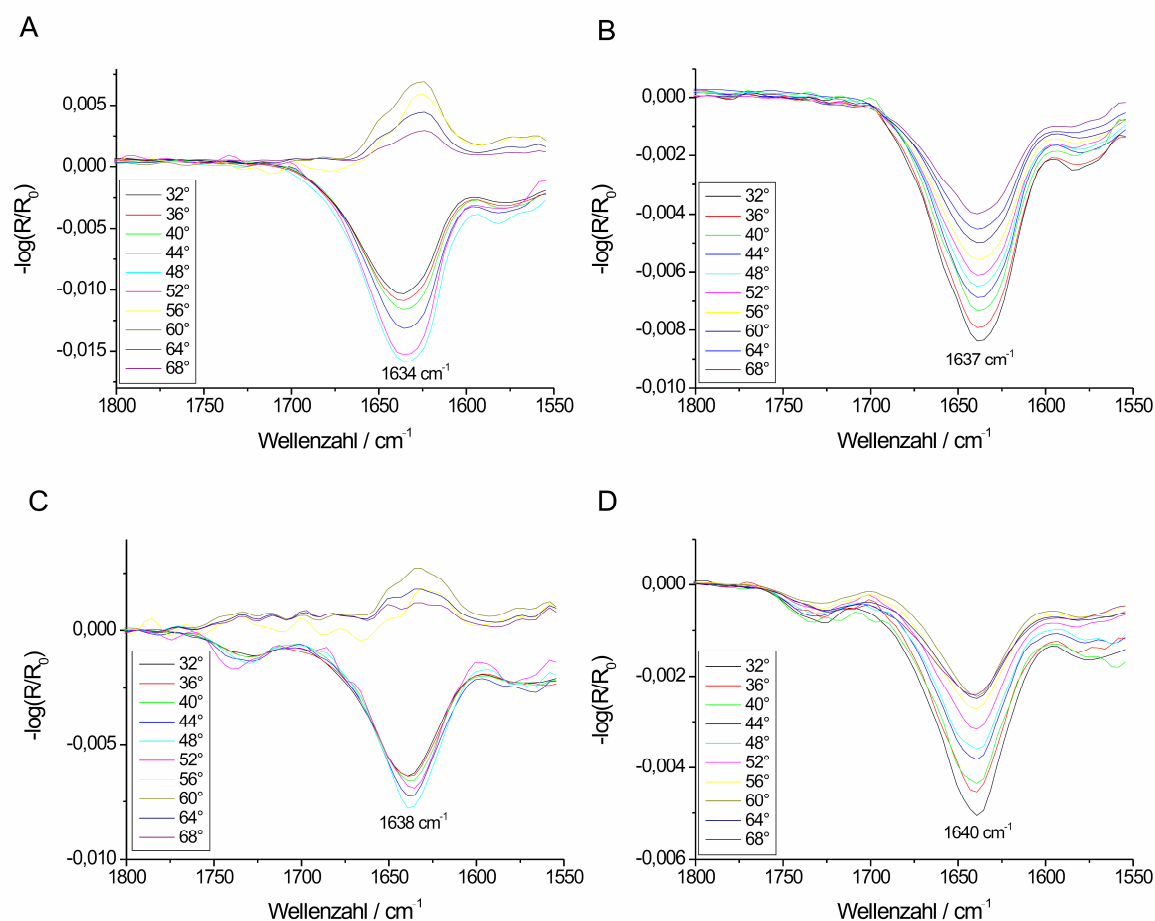


Abb. 3.45: *p*- und *s*-polarisierte IRRA-Spektren von NRas Far/Far ohne Markierung an der Luft- D_2O -Grenzfläche (A und B entsprechend) als auch an der POPC/BSM/Chol (2:1:1)-Grenzfläche (C und D entsprechend).

In Abb. 3.46 sind die für die Simulationen angenommen Orientierungen an der Luft- D_2O -Grenzfläche dargestellt. Bei Vergleich der experimentellen Daten mit den simulierten kann auf Orientierung B oder C geschlossen werden. Die simulierten Amid-Banden weisen bei diesen Orientierungen einen höheren (Orientierung B) bzw. einen gleichwertigen (Orientierung C) α -Helix-Anteil (1650 cm^{-1}) im Vergleich zur Bande des β -Faltblatts (1620 cm^{-1}) auf. Dies ist im Einklang mit der hier gemessenen Hauptbande von 1640 cm^{-1} .

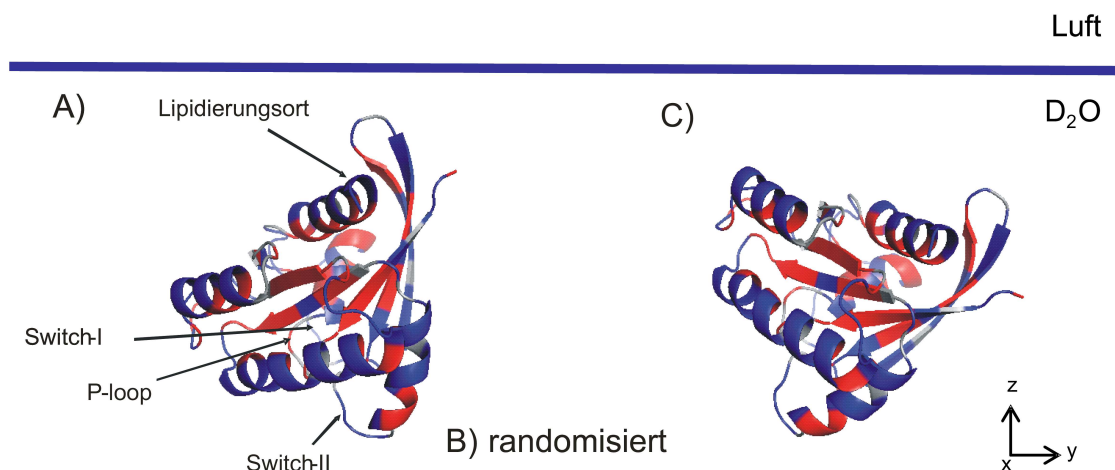


Abb. 3.46: Entsprechend den Simulationen angenommene Orientierungen (A bis C) eines Ras-Proteins der Einheitszelle (PDB: 121p)[178] relativ zur Normalen der Luft-D₂O-Grenzfläche. Die hydrophoben und hydrophilen Abschnitte des Proteins sind entsprechend rot und blau dargestellt (modifiziert nach [127]).

3.2.2.1 Diskussion

In der hier durchgeführten Studie wurde das Adsorptions- bzw. Insertierungsverhalten und die Orientierung von N-Ras Far/Far (GDP) an die Luft-D₂O- Grenzfläche und an eine POPC/BSM/Chol (2:1:1)-Grenzschicht mit Hilfe der IRRAS-Technik untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss eines extrinsischen Fluoreszenzmarkers auf die Adsorption und Orientierung analysiert.

Bei der letzteren Untersuchung handelt es sich um verschiedene Lokalisierungen der Fluoreszenzmarkierung am Protein. Zum einen wurde das Protein an der HVR, also am C-terminalen Ende des Peptids markiert und zum anderen unspezifisch über die Bindung des Markers an auf der Oberfläche des Proteinkern zugänglichen Lysine. Der Vergleich zeigt, dass das am Peptid markierte Protein am ehesten den Eigenschaften des nicht-markierten Proteins an den untersuchten Grenzflächen ähnelt. Sowohl an der Luft-D₂O-Grenzfläche, als auch an der POPC/BSM/Chol-Grenzfläche ist ein ähnliches Verhalten zu beobachten. Beide weisen in der Oberflächendruck/Zeit-Isotherme ein fast exponentielles Adsorptionsverhalten auf und enden bei einem ähnlichen Enddruck von ~ 22 mN/m bezüglich der Luft-D₂O-Grenzfläche, bzw. bei ~ 25-27 mN/m hinsichtlich der POPC/BSM/Chol-Grenzschicht (Abb. 3.44 A und C). Das Oberflächendruckprofil

des Peptid-markierte Proteins weist hingegen kleine Plateaus in der Isotherme auf, die für eine Umlagerung des Proteins sprechen könnten. Auch die Lage der Amid I-Bande in den IRRA-Spektren der zwei Proteine ist bei beiden untersuchten Grenzflächen ähnlich, wobei sie bei dem am Peptid-markierten Protein besser aufgelöst ist als bei dem nicht-markierten N-Ras Far/Far (Abb. 3.44 B und C). Das am Protein markierte N-Ras Far/Far weist zwar an der Luft-D₂O-Grenzfläche ein ähnliches exponentielles Adsorptionsverhalten auf, die Hauptbande der Amid I-Bande ist jedoch zu 1624 cm⁻¹ verschoben. An der POPC/BSM/Chol-Grenzschicht verhält es sich umgekehrt. Hier unterscheidet sich das Adsorptionsverhalten des proteinmarkierten N-Ras Far/Far deutlich von den beiden anderen Proteinen, wohingegen die Amid I-Bande sich zwar deutlich in ihrer Intensität, aber nicht in ihrer Struktur unterscheidet. Der Unterschied in der Intensität kann durch die Diffusion des Proteins in den Referenztrug erklärt werden, die bei hier nicht gezeigten winkelabhängigen s-polarisierten Messungen detektiert wurde. Diese zeigte entgegen den Erwartungen positive Banden. Es wurden zusätzlich auch Messungen bei einem Anfangsdruck von 30 mN/m durchgeführt (nicht gezeigt), aber auch hier wurde nach Einstellung des Gleichgewichts beobachtet, dass das Protein in den Referenztrug diffundiert war. In anderen Studien wurde bereits von einem Einfluss der Fluoreszenzmarkierung auf das Adsorptionsverhalten von Proteinen berichtet. Dieser sei aber konzentrationsabhängig und daher bei niedrigen Mengen kaum beobachtbar [179]. Es ist möglich, dass Markierungen am Protein einen Einfluss auf die Tertiärstruktur, und somit auf die Lage der Übergangsdipolmomente der Sekundärstruktur haben.

Somit kann aus dem Vergleich der unterschiedlich markierten Proteine geschlossen werden, dass sich das an der HVR markierte Protein am ehesten wie das nicht-markierte N-Ras Far/Far verhält. Es sind aber noch weitere Analysen, z.B. mit AFM oder ATR-FTIR notwendig, um endgültige Aussagen über den Einfluss der Fluoreszenzmarkierung treffen zu können.

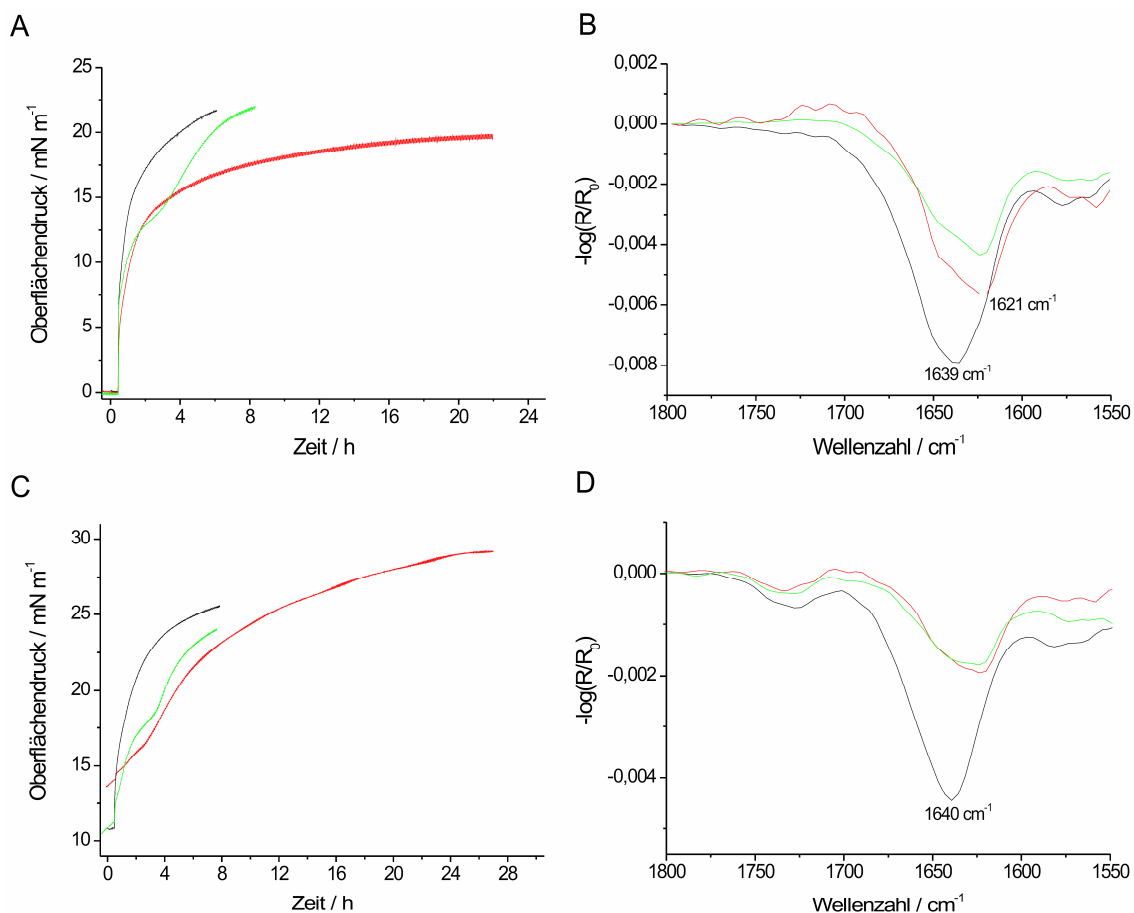


Abb. 3.47: Vergleich von N-Ras Far/Far (200 nM) (schwarz) mit HD/Far (rot) und HD/HD (grün) im GDP-gebundenen Zustand [127]. Alle Spektren wurden im Gleichgewichtszustand mit *s*-polarisiertem Licht bei einem Einfallswinkel von 40° aufgenommen.

Darüberhinaus wurde der Unterschied des N-Ras Far/Far zu anderen lipidmodifizierten N-Ras Proteinen (HD/Far und HD/HD) hinsichtlich des Adsorptionsverhaltens und der Orientierung an beiden Grenzflächen untersucht. Die Messungen des N-Ras HD/Far und HD/HD wurden zuvor am gleichen Gerät durchgeführt [127]. Die hier neu durchgeführten Versuche mit N-Ras Far/Far (Abb. 3.45) und mit Simulationen verglichenen IRRA-Spektren weisen eine Orientierung vom Typ B oder C (Abb. 3.46) auf. In bereits veröffentlichten Daten weisen die beiden Proteine mit den anderen Lipidmodifizierungen eher eine Orientierung vom Typ A auf. In dieser Position überwiegt der β -Faltblatt-Anteil gegenüber dem der α -Helix in den IRRA-Spektren. Der direkte Vergleich der Amid I-Banden im Gleichgewichtszustand (Abb. 3.47 B und D) lässt dies deutlich werden. Die Amid I-Bande der beiden anderen Proteine an den beiden untersuchten Grenzflächen ist im Vergleich zum N-Ras Far/Far zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben und zudem auch weniger intensiv. Auch das

Adsorptionsverhalten (Abb. 3.47 A und C) ist unterschiedlich. An beiden Grenzflächen weist N-Ras Far/Far ein beschleunigtes Adsorptionsverhalten auf. Wie auch bei dem N-Ras HD/Far ist dies exponentiell. Bei dem zuvor untersuchten N-Ras HD/Far handelt es sich um eine am Peptid fluoreszenzmarkierte Version des Proteins, welches sich nach den hier durchgeführten Versuchen ähnlich dem unmarkierten Verhalten sollte. Der Einfluss der Lipidmodifizierung von N-Ras auf die Insertierung in Membranen wurde in dieser Arbeit zusätzlich mit Hilfe von SPR untersucht. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls einen deutlichen Unterschied bezüglich des Bindungsverhaltens. Zudem lassen auch AFM-Messungen auf ein Lipidanker-abhängiges Bindungsverhalten des N-Ras Proteins an der Membran schließen [122].

3.2.3 Einfluss des Lipidankermotivs von N-Ras auf die Wechselwirkung mit Membranen (SPR)

Das Ziel der hier durchgeführten Studie war, den Einfluss verschiedener Lipidmodifikationen des N-Ras Proteins auf das Assoziations- und Dissoziationsverhalten an verschiedenen Membranen mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz zu untersuchen. Es wurden vier verschiedene Kombinationen an Lipidankern untersucht. Hierzu wurde zum einen monofarnesyliertes N-Ras als auch doppellipidiertes N-Ras HD/Far in seiner inaktiven (GDP-gebunden) und aktiven (GppNHp-gebunden als nicht-hydrolysierbares GTP-Analogon) Form analysiert. Die N-Ras Varianten wurden im Rahmen einer Zusammenarbeit von Dr. Gemma Triola (AG Waldmann (MPI, Dortmund)) zur Verfügung gestellt. Diese Proteine ähneln den natürlich vorkommenden N-Ras Proteinen *in vivo*. Darüberhinaus wurden zusätzlich N-Ras Proteine mit nicht-natürlich vorkommenden Lipidanker-Kombinationen (HD/HD und Far/Far) untersucht, um den Einfluss der einzelnen Lipidanker genauer zu untersuchen. Der Hexadecyl (HD)-Rest ist ein nicht-hydrolysierbares und somit stabileres Analogon des natürlich vorkommenden Palmitoylrests. Als Kontrolle wurde eine nicht lipidierte Variante des N-Ras Proteins verwendet. Die hier erhaltenen Ergebnisse wurden in Referenz [180] veröffentlicht.

Es wurden Membranen mit verschiedenen Eigenschaften hergestellt. Diese bestanden aus reiner ungeordneter Phase (l_d) (DOPC), reiner geordneter Phase (l_o) (DPPC/Chol 7:3, molar) als auch aus einer Lipidmischung, die Koexistenz der beiden vorangehenden Phasen zeigt (DOPC/DPPC/Chol 1:2:1, molar). Zusätzlich wurden Lipidmischungen zur Untersuchung des Einflusses von negativer Ladung (DOPC/DOPG 7:3, molar) als auch der Einfluss des Krümmungsbeitrags (DOPC/DOPE 7:3, molar) auf die Bindungseigenschaften von N-Ras an die Membran hergestellt.

Aufgrund der Komplexität des zugrunde liegenden Signalprozesses, in dem sich das N-Ras befindet, ist davon auszugehen, dass es sich beim Bindungsmechanismus um mindestens einen zweistufigen Prozess handeln muss. Dieser beschreibt eine anfängliche Bindung des Proteins an die Membran durch hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen und die darauf folgende Einlagerung der Lipidanker in die Membran. Es ist zudem möglich, dass sich das Protein an der Lipidoberfläche umlagert, zum Beispiel an Grenzflächen von Domänen und durch (membranvermittelte) Protein-Protein Wechselwirkungen Cluster bildet. Um dieses Verhalten näher zu untersuchen, wurden die Assoziations- und Dissoziationsphasen aller genannten Proteine vermessen und basierend auf einem Zweischritt-Modell (Gleichung (2.11)) ausgewertet. Ein Beispiel für Primärdaten ist in Abb. 3.48 gegeben.

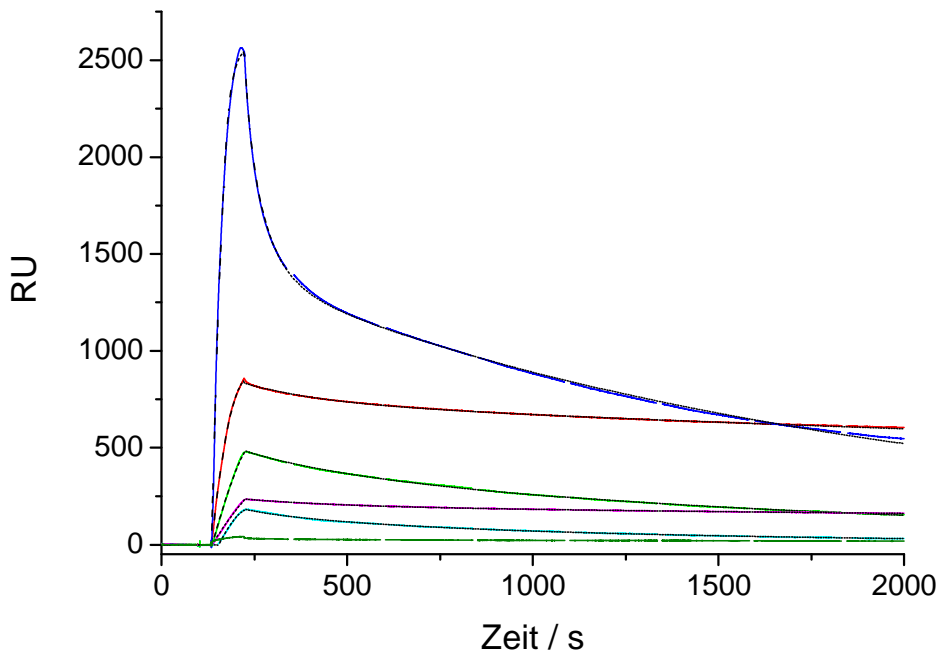


Abb. 3.48: Beispiel der aufgenommenen SPR-Sensorgramme von $1 \mu\text{M}$ N-Ras Far (blau), Far/Far (rot), HD/HD (türkis), HD/Far (GDP) (pink), HD/Far (GTP) (grün) und nicht-lipidiertem N-Ras (oliv) bei Bindung an eine DOPC-Membran. Die jeweiligen Anpassungen sind als schwarzgepunktete Linie dargestellt. Alle Sensorgramme wurden bei einer Frequenz von 10 Hz aufgenommen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Form der SPR-Sensorgramme abhängig von dem jeweiligen Lipidankersystem stark unterscheidet. Dies lässt darauf schließen, dass die Assoziations- und Dissoziationsraten entsprechend der Lipid-Modifikationen des N-Ras in der reinen fluiden Phase deutliche Unterschiede aufweisen. Es wurden quantitativ die beiden apparenten k_{on} - und k_{off} -Werte entsprechend Gleichung (2.13) ausgewertet. Zusätzlich wurden die Assoziations- und Dissoziationsbereiche einzeln behandelt: Die beginnende Assoziationsphase wurde mit Hilfe von linearer Regression ausgewertet, um über die anfängliche Insertierungsaffinität des Proteins in die Membran präzisere Aussagen machen zu können. Da die anfängliche Steigung der Assoziationsphase proportional zu $R_{\text{max}} - R(t)$ und c_p ist, können nur relative Aussagen über $k_{\text{on},1}$ -Werte gemacht werden. Die Dissoziationsphase wurde mit Hilfe einer biexponentiellen Gleichung analysiert (Gleichung (2.9)). Hieraus wurde schließlich die mittlere Dissoziationskonstante \bar{k}_{diss} (Gleichung (2.10)) berechnet. Alle kinetischen Daten sind in Balkendiagrammen dargestellt. Die genauen Werte der Auswertung mit Hilfe des Zweischritt-Modells befinden sich im Anhang (Tabelle 9.2). Zusätzlich wurde

der Anteil an quasi-irreversibel gebundenem Protein am Ende jeder Dissoziationsphase ausgewertet.

Die Bindungsdaten ($k_{on,1}$) des N-Ras Proteins an die verschiedenen Lipid-Membranen (Abb. 3.) weisen Werte im Bereich von $(1-3) \cdot 10^3$ bis $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf. Die schnellsten Assoziationsraten wurde für das einfach farnesylierte Protein (N-Ras Far) aufgenommen, wie dies auch schon deutlich aus den Primärdaten hervorgeht (Abb. 3.48). Im Gegensatz hierzu erfolgt die Bindung an eine rein flüssig-geordnete Membran (l_o) (DPPC/Chol 7:3) langsamer. Die schnelle Assoziation des einfach farnesylierten Proteins in flüssig-ungeordnete Membranen kann mit Hilfe der Analyse der beginnenden Steigung der Sensorgramme noch deutlicher visualisiert werden (Abb. 3.). Darüberhinaus zeigt das doppelfarnesylierte Protein höhere anfängliche Bindungsraten im Vergleich zu den anderen Proteinen, wobei die Insertierung in die reine flüssig-geordnete Phase deutlich langsamer verläuft.

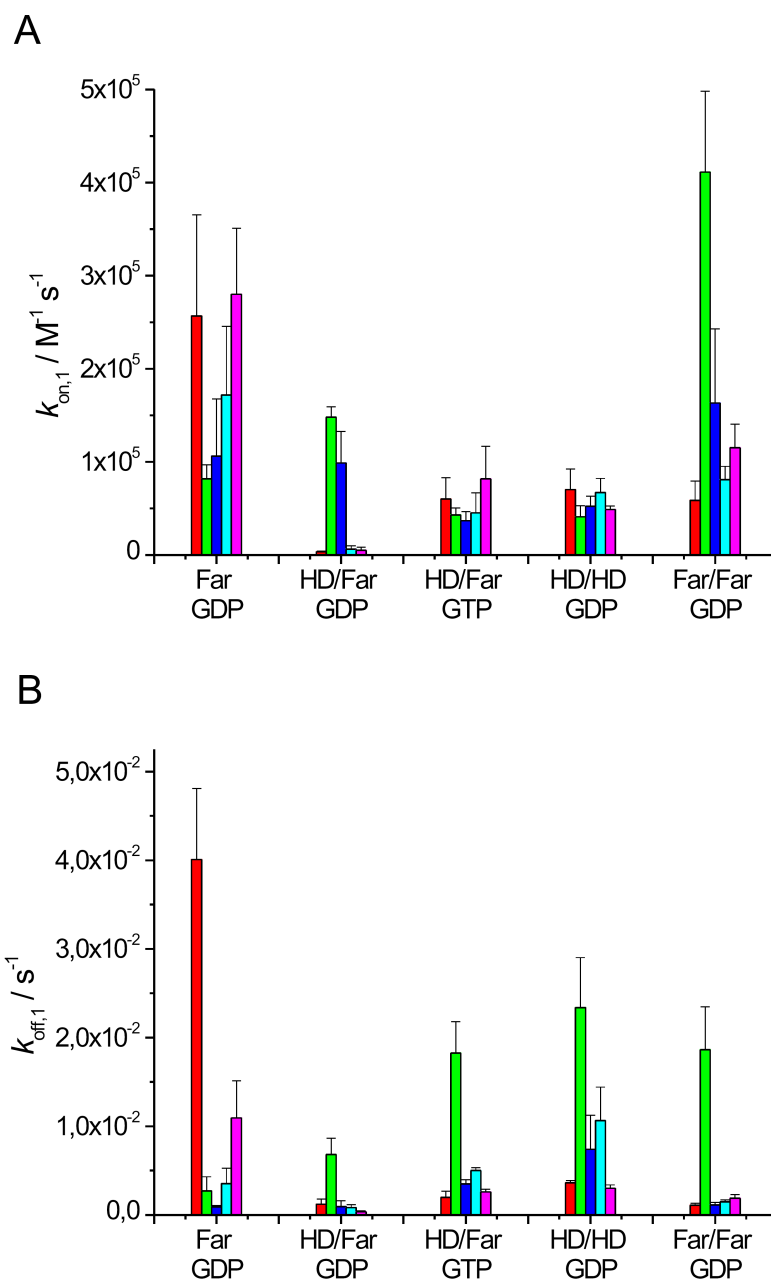


Abb. 3.49: (A) $k_{on,1}$ - und (B) $k_{off,1}$ -Werte von N-Ras Far (GDP), HD/Far (GDP), HD/Far (GTP), HD/HD (GDP) und Far/Far (GDP) bei Bindung an DOPC (rot), DPPC/Chol (7:3) (grün), DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) (blau), DOPC/DOPG (7:3) (türkis) oder an DOPC/DOPE (7:3) (pink) bei Anpassung der SPR-Daten an ein Zwei-Schritt-Modell.

Um das Bindungsverhalten an heterogene Membransysteme zu untersuchen, wurde die Assoziations- und Dissoziationskinetik zusätzlich an einer Modell-Raft-Lipidmischung (DOPC/DPPC/Chol (1:2:1)) untersucht, die bei 25 °C Koexistenz von l_d und l_o -Phase aufweist. [181]. Die anfängliche Steigung der Assoziation (Abb. 3. A) an die Modell-Raft-Membran gleicht der der reinen flüssig-ungeordneten Phase. Daraus lässt sich

schließen, dass N-Ras Far bei der Bindung an die heterogene Membran die flüssig-ungeordnete Phase bevorzugt.

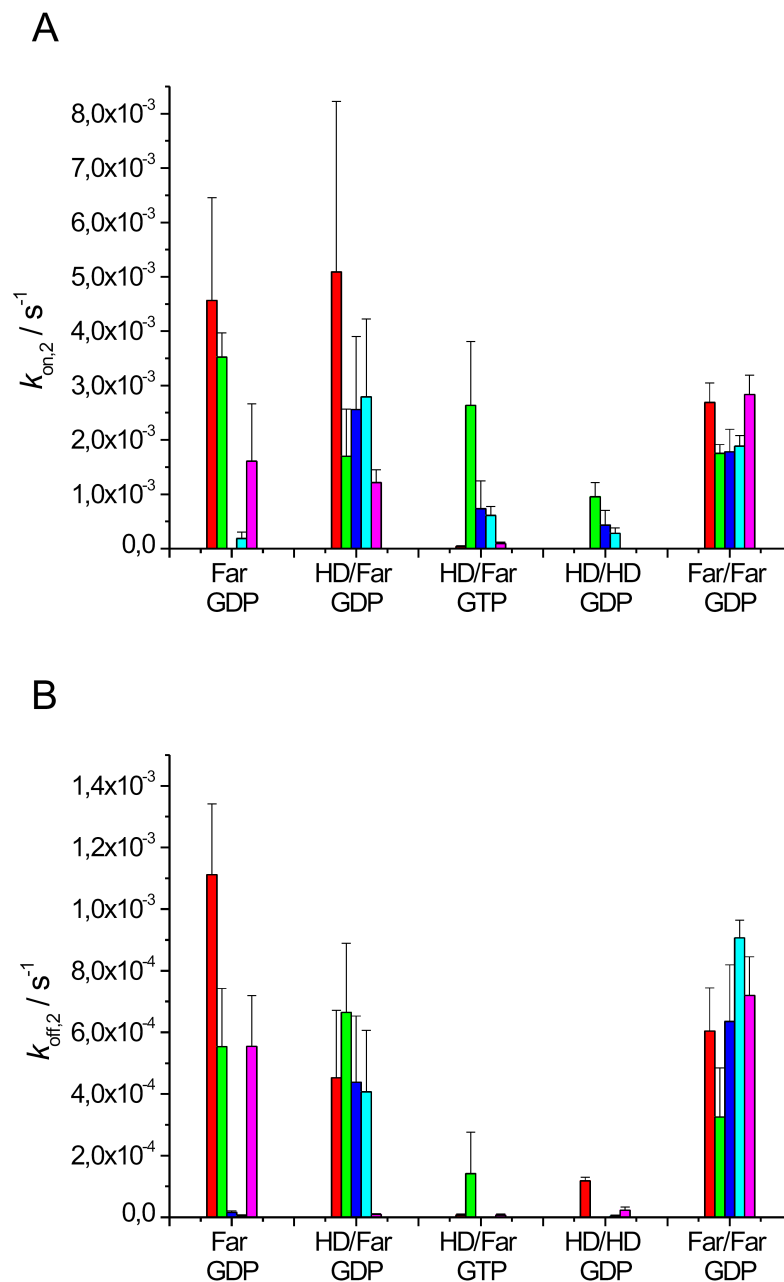


Abb. 3.50: (A) $k_{on,2}$ - und (B) $k_{off,2}$ -Werte von N-Ras Far (GDP), HD/Far (GDP), HD/Far (GTP), HD/HD (GDP) und Far/Far (GDP) bei Bindung an DOPC (rot), DPPC/Chol (7:3) (grün), DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) (blau), DOPC/DOPG (7:3) (türkis) oder an DOPC/DOPE (7:3) (pink) bei Anpassung der SPR-Daten an ein Zwei-Schritt-Modell.

Weiterhin wurde der Einfluss der Kopfgruppenladung der Lipide auf die anfängliche Bindung untersucht. Das N-Ras-Protein hat einen pI von 5,0 und ist daher bei pH 7,4 negativ geladen. Aus diesem Grund wurde die Auswirkung von negativer Ladung auf

die Wechselwirkung der Proteine mit der Membran untersucht. Es wurde eine Membran aus DOPC und DOPG (7:3) präpariert, welche einen signifikanten Anteil an negativ geladenen Lipiden enthält. Wie man deutlich in Abb. 3. A sehen kann, wird die anfängliche Bindung von N-Ras Far durch negative Ladung in der Membran kaum beeinflusst. Auch die Anfangssteigung des Assoziationsprozesses weist ähnliche Werte im Vergleich zu einer rein zwitterionischen DOPC-Membran auf.

Ein Großteil der Lipide in einer biologischen Membran gehört zu den Typ II Lipiden. Diese weisen eine Tendenz zum Aufbau von grenzflächiger Krümmung durch uneinheitliche Verteilung des lateralen Drucks zwischen den Lipiden auf. Bezüglich des amphiphilen Typ II-Lipide Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) beträgt die gespeicherte elastische Krümmungsenergie für jedes Lipid in einer ebenen Monoschicht ungefähr $1 k_B T$. Die Inkorporation von amphiphatischen Molekülen kann dem Krümmungsstress bei passender Geometrie teilweise entgegenwirken. Daher ist es möglich, dass der Krümmungsstress Einfluss auf die laterale Verteilung und Funktion von Proteinen in der Membran hat [182-184]. Die Zugabe von DOPE zu DOPC-Vesikeln erhöht aufgrund seiner kleinen Kopfgruppe die Krümmung zum Wasser. Durch Beimischung von 30 mol% DOPE in eine DOPC-Membran wurde der Einfluss des gespeicherten elastischen Krümmungsstress in Bezug auf die Bindungseigenschaften der lipidierten N-Ras Konstrukte untersucht.

Wie man in Abb. 3. A sehen kann, scheint der Krümmungsstress in dem hier untersuchten Fall keinen signifikanten Einfluss auf das Bindungsverhalten von N-Ras an Membranen zu haben. Innerhalb des Fehlers können keine Unterschiede bezüglich des $k_{on,1}$ und der anfänglichen Assoziationssteigungen (Abb. 3. A) nachgewiesen werden.

Aus den Abbildungen Abb. 3. A und Abb. 3. A geht hervor, dass eine Doppellipidierung zu einer 3- bis 5-fachen Verlangsamung des Assoziationsprozesses führt. Die $k_{on,1}$ -Werte befinden sich hierbei bei $5 \cdot 10^4 M^{-1} s^{-1}$, wobei dies weniger für das doppeltfarnesylierte Protein gilt. Es konnten innerhalb des Fehlers keine Unterschiede zwischen den verschiedenen fluiden Phasen nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass elektrostatische Wechselwirkungen und induzierter Krümmungsstress

keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungseigenschaften der verwendeten lipidierten Proteine haben.

Unter der Annahme von genäherten Gleichgewichtsbedingungen führt die Berechnung der Gleichgewichtskonstante des ersten Bindungsschritts zu PL, $K_{D1} = k_{\text{off},1}/k_{\text{on},1}$, zu Werten im Bereich von $(1-10) \cdot 10^{-8}$ M, wobei die Werte für N-Ras HD/Far (GTP) und HD/HD (GDP) in flüssig-geordneten Membranen mit K_{D1} -Werten bis zu $6 \cdot 10^{-7}$ M leicht erhöht sind. Insgesamt lassen die Messergebnisse aber auf eine stabile Bindung der zweifach lipidierten Proteine an die Membran schließen. Das einfach farnesylierte Protein und N-Ras HD/Far zeigen erhöhte K_{D1} -Werte im Bereich von $\sim(1-4) \cdot 10^{-7}$ M bei Bindung an flüssig-ungeordnete Lipidphasen.

Die Änderung des Nukleotids (GTP und GDP) beim natürlichen Protein N-Ras HD/Far scheint keinen Einfluss auf den anfänglichen Bindungsprozess des Proteins zu haben. Allgemein wurde für alle zweifach-lipidierten Proteine bei Bindung an flüssig-geordnete Membranen eine ähnliche Steigung für den initialen beginnenden Assoziationsprozess gemessen.

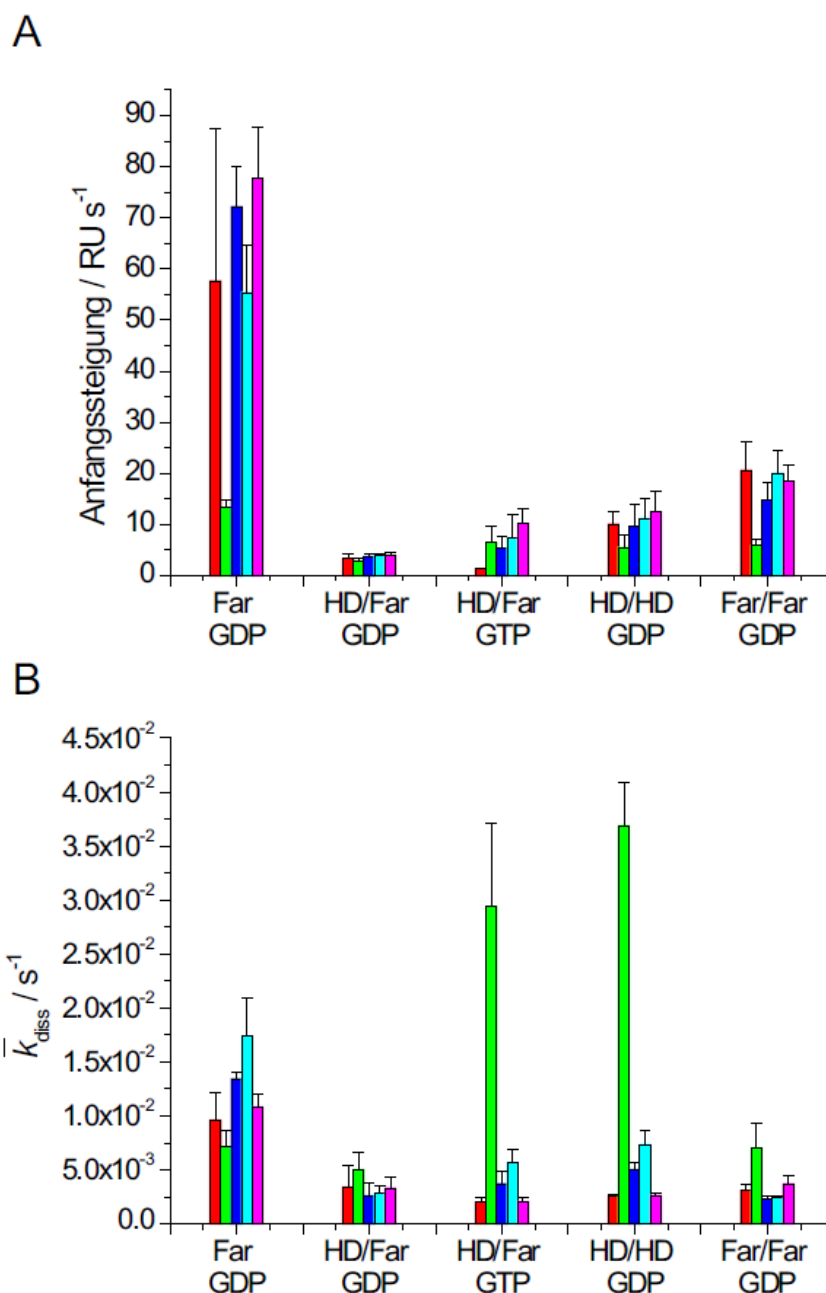


Abb. 3.51: (A) anfängliche Steigung und (B) gemittelte Dissoziationskonstante \bar{k}_{diss} von N-Ras Far (GDP), HD/Far (GDP), HD/Far (GTP), HD/HD (GDP) und Far/Far (GDP) bei Bindung an DOPC (rot), DPPC/Chol (7:3) (grün), DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) (blau), DOPC/DOPG (7:3) (türkis) oder an DOPC/DOPE (7:3) (pink).

Der schnellen Bindung des N-Ras Far an flüssig-ungeordnete Lipidphasen steht ein vergleichsweise schneller Dissoziationsprozess gegenüber (Abb. 3. B). Generell wurden $k_{\text{off},1}$ -Werte im Bereich von $(0.1-4) \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ detektiert, was gleichbedeutend mit Halbwertzeiten im Bereich von $7 \cdot 10^2$ bis 20 s ist. Die schnellste Dissoziation des ersten Bindungsschritts an flüssig-ungeordnete Membranen wurde beim einfach-farnesylierten

N-Ras Protein beobachtet (DOPC: $p < 0,0008$). (Die hier angegebenen p -Werte sind das Ergebnis eines einseitigen Zwei-Proben t-Test. Das Signifikanzniveau lag hierbei bei 5 %) Hinsichtlich der zweifach-lipidierten Proteine wurden niedrigere Werte gemessen, was auf eine stabilere Bindung hindeutet. Im Gegensatz hierzu erfolgt die Dissoziation von einer flüssig-geordneten Membran schneller, was wiederum auf eine weniger stabile Bindung der zweifach-lipidierten Proteine an Membranen hoher Ordnung schließen lässt ($p < 0,014$). Hierbei zeigen N-Ras HD/HD und die aktive Form des N-Ras, N-Ras HD/Far (GTP), leicht höhere Dissoziationsraten. Das GTP-gebundene N-Ras HD/Far scheint also im ersten Bindungsschritt schneller von der Membran zu dissoziieren als die inaktive Form, N-Ras HD/Far (GDP) ($p < 0,00121$). Diese Beobachtungen finden sich auch bei der Auswertung der mittleren Dissoziationsrate wieder (Abb. 3. B).

Es ist zu vermuten, dass dem ersten Bindungsschritt ein diffusionskontrollierter Reorganisationsprozess des Protein-Lipid-Komplexes innerhalb der Membran-Ebene folgt. In Abb. 3.50 A sind die entsprechenden $k_{on,2}$ -Werte dargestellt. Dieser Prozess führt zu einem PL*-Zustand (Gleichung (2.11)), der die Teilnahme von nicht-lipidhaltigen Komponenten des Proteins am Bindungsprozess sowie lokale Cluster-Bildung innerhalb der verschiedenen Phasen beinhalten könnte. Eine weitere Möglichkeit ist, dass sich das Protein bei heterogenen Modell-Raft-Membranen in der l_d/l_o -Grenzfläche anlagert, um die ungünstige Grenzflächenspannung zwischen den Domänen zu erniedrigen. Kürzlich durchgeführte AFM-Studien haben ein solches Verhalten der N-Ras-Proteine nachgewiesen [122]. Die niedrigen $k_{on,2}$ -Werte im Bereich von $(0.1-5) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, lassen auf einen eher langsamen Reorganisationsprozess schließen. Solche sekundären Assoziationsprozesse können für die meisten Systeme mit unterschiedlichen Zeitkonstanten beobachtet werden. Die schnellste Bildung von Assoziations-Clustern in flüssig-ungeordneten Membranen wurden für das monofarnesylierte N-Ras, N-Ras HD/Far (GDP) und Far/Far (GDP) detektiert. Im Gegensatz hierzu scheint die Cluster-Bildung der aktiven Form des N-Ras, N-Ras HD/Far (GTP), und des zweifach-hexadecylierten Proteins, N-Ras HD/HD, in flüssig-ungeordnete Membranen eine geringere Bedeutung zu haben (siehe auch weiter unten). Dies wurde auch in früheren AFM-Studien gezeigt. Hier wurde beobachtet, dass N-Ras HD/HD eine geringe Neigung zur Aggregatsbildung in heterogenen Raft-Membranen

aufweist. In derselben Studie wurde ebenfalls berichtet, dass zweifach-farnesylierte Proteine die stärkste Neigung zur Diffusion und Clusterbildung an der l_d/l_o -Grenzfläche der Modellmembran DOPC/DPPC/Chol 1:2:1 aufweisen [122].

Die Bildung von kinetisch stabilen PL*-Komplexen wird durch kleine Dissoziationsraten $k_{off,2}$ im Bereich von $3 \cdot 10^{-7}$ bis $1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ deutlich. Aufgrund der geringeren Affinität des Farnesyl-Rests an Membranen [176, 185, 186] wird die schnellste Dissoziation von der Membran für das monofarnesylierte Protein verzeichnet, wobei auch diese relativ langsam ist. Höhere Dissoziationsraten wurden hingegen für N-Ras HD/Far (GDP) und N-Ras Far/Far (GDP) gemessen. Die gesamte Gleichgewichtskonstante $K_D = (k_{off,1}/k_{on,1}) \cdot (k_{off,2}/k_{on,2})$ weist eher niedrige Werte im Bereich von 1-30 nM auf, wobei die niedrigsten Werte für zweifach-lipidierte Proteine in Modell-Raft-Membranen gemessen wurden. Dies lässt auf eine starke Clusterbildung der Proteine schließen. Höhere K_D -Werte im Bereich von ungefähr 10 μM wurden hingegen für N-Ras HD/HD in flüssig-ungeordneten Membranen detektiert. In früheren Studien zur Wechselwirkung von lipidierten Peptiden mit Membranen wurden ebenfalls Dissoziationskonstanten im nanomolaren bis mikromolaren Bereich gefunden [176].

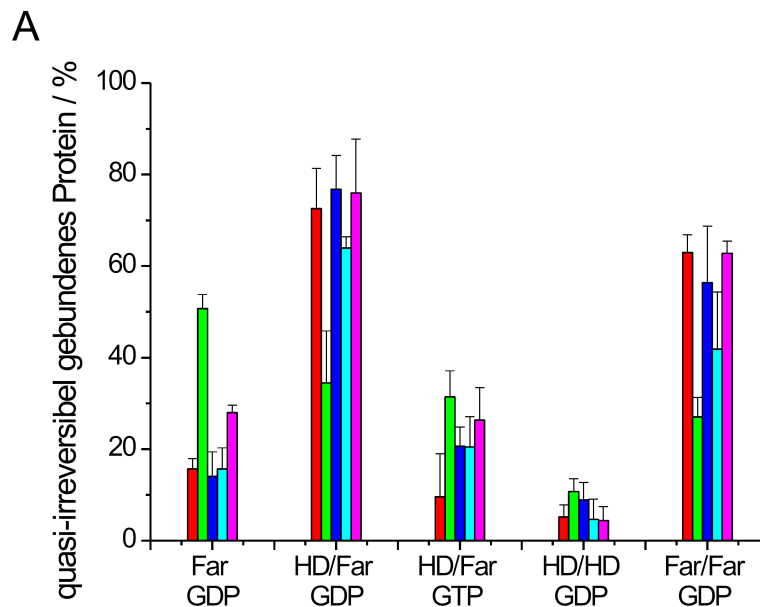


Abb. 3.52: (A) Quasi-irreversibel gebundener Anteil von N-Ras Far (GDP), HD/Far (GDP), HD/Far (GTP), HD/HD (GDP) und Far/Far (GDP) bei Bindung an DOPC (rot), DPPC/Chol (7:3) (grün), DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) (blau), DOPC/DOPG (7:3) (türkis) oder an DOPC/DOPE (7:3) (pink).

Ausgehend vom *Offset* der Dissoziationsphase, der durch Anpassung an eine biexponentielle Gleichung (2.9) erhalten wird, kann auf den relativen Anteil an quasi-irreversibel gebundenem Protein geschlossen werden. Bei Betrachtung der Primärdaten (Abb. 3.48) kann man bereits sehen, dass der *Offset* von der Art der Lipidierung des Proteins abhängt. In Abb. 3.52 ist der *Offset* relativ zur Gesamtamplitude, zum Zeitpunkt $t = 0$ der Dissoziationsphase, dargestellt. Dieser spiegelt qualitativ die Fähigkeit des Proteins stabil in ein Membransystem zu insertieren wieder. Diese starke Bindung ließe sich z.B. durch die Bildung stabiler Protein-Komplexe durch Bindung an die Membran erklären. Die erhaltenen Daten weisen deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Lipidierungen des Proteins auf. Zum einen zeigen sie eine starke, quasi-irreversible Bindung von N-Ras HD/Far (GDP) und Far/Far (GDP) insbesondere an flüssig-ungeordnete Membranen (DOPC: $p < 0,0022$), wohingegen der Austausch des Nukleotids zu GTP bei N-Ras HD/Far zu einer weniger stabilen Bindung führt, vor allem in reinen flüssig-ungeordneten Phasen, wie auch in den fluiden Domänen der Modell-Raft-Membran (DOPC: $p = 0,0053$). Der niedrigste Anteil an quasi-irreversibel gebundenem Protein wurde für das zweifach-hexadecylierte N-Ras Protein gefunden (für DOPC im Vergleich zu farnesylierten GDP-gebundenen Proteinen: $p < 0,00033$).

Die nicht-lipidierte Form des N-Ras wies bei allen verwendeten Membransystemen so gut wie keine Bindung auf.

3.2.3.1 Diskussion

Mit Hilfe der SPR konnten die Assoziations- und Dissoziationseigenschaften von verschiedenen N-Ras Konstrukten an Modellmembranen mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften untersucht werden. Abhängig von den verschiedenen Lipidierungen des Proteins konnten signifikante Unterschiede beobachtet werden. Die mehrfach-exponentielle Assoziations- und Dissoziationskinetik der aufgenommenen Sensorgramme spiegelt eine komplexe Wechselwirkung der Proteine mit den verwendeten Membranen wider. Die SPR-Daten wurden mit Hilfe eines Zwei-Schritt-Modells ausgewertet, welches eine anfängliche Bindung des Proteins an die Membran, gefolgt von einer Insertion/Dissoziation des Proteins in/aus der hydrophoben Umgebung

der Membran sowie einer Reorientierung und eventuelle Cluster-Bildung des Proteins im zweiten Schritt beschreibt. Da die gemessenen Sensorgramme am Ende der Dissoziationsphase nicht auf die Basislinie zurückgingen, kann man daraus schließen, dass ein bestimmter Anteil an Protein stabil an die Membran gebunden bleibt. Dieser Anteil an quasi-irreversibel gebundenem Protein könnte durch Lipid-vermittelte Clusterbildung der Proteine oder durch eine stabile Bindung des Proteins an die Membran verursacht worden sein.

Bei Auswertung der Bindung von N-Ras an eine flüssig-ungeordnete DOPC-Membran ist deutlich zu erkennen, dass die Art der Lipidierung an der hypervariablen Region des N-Ras einen erheblichen Einfluss auf das Bindungsverhalten hat. Generell weist das monofarnesylierte N-Ras (N-Ras Far) die höchsten Assoziations- und Dissoziationsraten bei Bindung an flüssig-ungeordnete Membranen auf. Diese befinden sich, abhängig von Art der fluiden Phase, im Bereich von einigen Sekunden bis zu einer Minute. Der Anteil an quasi-irreversibel gebundenem Protein durch Membraninsertierung und folgender Cluster-Bildung ist hierbei eher gering und liegt zwischen 10 und 20 %. Dieses beobachtete Verhalten ist in Einklang mit der vorhergesagten schwachen Wechselwirkung des monofarnesylierten N-Ras mit der Membran. Darüber hinaus stimmt es mit vorherigen Berichten überein, dass N-Ras Far leicht von der Membran los kommt, um dann entweder zum Golgi zurückzukehren oder aber Ubiquitin-abhängig abgebaut werden kann. [123].

Bei Vergleich der (anfänglichen) Assoziationsraten des einfach farnesylierten Proteins in flüssig-ungeordnete Membranen mit der in reine flüssig-geordnete Phasen aus DPPC/Chol (7:3) lassen sich generell höhere Assoziationsraten für die fluide Membran finden. Dieses Bindungsverhalten kann durch einen ausgeprägten hydrophoben *Mismatch* zwischen der hydrophoben Alkylkette des Farnesylrests und der *all-trans* C₁₆-Kette des geordneten DPPCs als auch der sperrigen rigiden Struktur der Farnesylgruppe erklärt werden. Es wurde bereits berichtet, dass eine Erhöhung an hydrophobem *Mismatch* zu einer verstärkten Cluster-Bildung der Proteine führen kann [187, 188]. Sogar ein kaum vorhandener hydrophober *Mismatch* kann immer noch zu einer, wenn auch transienten, Dimerbildung führen [188].

Eine zweifache Lipidierung des Proteins führt zu einer generellen fünffachen Abnahme der Assoziationskinetik in der flüssig-ungeordneten Phase, wobei dies weniger deutlich beim zweifach-farnesylierten Protein zu sehen ist. Eine doppelte Farnesylierung führt überdies zu einer signifikanten Zunahme an Proteinzusammenlagerungen (ca. 60 %) in fluiden Phasen (Abb. 3.52). Generell gesehen erfolgt die Dissoziation von einer flüssig-geordneten Membran schneller, was auf eine instabilere Bindung der zweifach-lipidierten Proteine an Membranen mit hoher konformeller Ordnung schließen lässt (Abb. 3. B und Abb. 3. B).

Zusätzlich wurde der Einfluss von negativen Ladungen auf das Bindungsverhalten der lipidierten N-Ras Proteine durch Beimischung von 30 mol% negativ geladenem DOPG zu einer DOPC-Membran untersucht. Der typische Gehalt an negativen Ladungen, der sich hauptsächlich in der inneren Schicht der Membran befindet, beträgt meist weniger als 20 % [2, 189, 190]. In der hier durchgeführten Studie wurden 30 mol% an negativ geladenen Lipiden verwendet um den maximalen Einfluss der Ladung auf das Bindungsverhalten zu untersuchen. Hinsichtlich der zweifach-lipidierten Proteine konnte kein bedeutender Unterschied der Assoziations- und Dissoziationskinetik zu der Bindung an eine reine DOPC-Membran festgestellt werden.

Weiterhin führte das Einfügen von 30 % DOPE in eine DOPC-Membran zu keiner nennenswerten Veränderung der Assoziations- und Dissoziationsprozesse im Vergleich zu einer reinen DOPC-Doppelschicht. Die Zugabe von DOPE erhöht den elastischen Krümmungsstress in der Membran und es wurde bereits berichtet, dass die Aufhebung des energetisch ungünstigen Zustands durch Insertierung von Membran-assoziierten Proteinen eine treibende Kraft sein kann, zum einen für die Insertierung selbst und darüber hinaus auch für Sortierungsprozesse der Proteine in der Membran [183, 184]. Phosphatidylethanolamine sind wie die negativ geladenen Lipide hauptsächlich auf der inneren Seite der Membran lokalisiert und tragen um bis zu 30 % zum Gehalt der Lipide in der Membran bei [2, 189, 190]. Da keine bedeutende Änderung der Bindungskinetiken bei Zugabe des DOPE gemessen wurde, lässt sich daraus schließen, dass die Erhöhung des elastischen Krümmungsstress keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten der lipidierten N-Ras Proteine an die Membran hat. Dieses Verhalten ist in Einklang mit der Vorstellung, dass das N-Ras Protein nur mit seinen Alkylketten in die Membran eindringt, dessen Interaktion hauptsächlich von

hydrophoben Wechselwirkungen der Alkylketten mit der Membran abhängt. Somit hat der Proteinkorpus bei der Bindung an die Membran nur einen geringen Einfluss.

Um zu belegen, dass N-Ras stärker an flüssig-ungeordnete l_d -Phasen als an flüssig-geordnete l_o -Phasen bindet, wurde zusätzlich das Bindungsverhalten von N-Ras an einer heterogenen DOPC/DPPC/Chol (1:2:1) Membran untersucht, welche bei 25 °C Koexistenz der beiden genannten Phasen aufweist. Bei Vergleich der k_{on} - und der gemittelten k_{off} -Werte fällt auf, dass das Bindungsverhalten an die heterogene Membran mehr dem an die l_d - als an die l_o -Phase ähnelt (Abb. 3.). Kleine Unterschiede lassen sich durch die höhere Ordnung der l_d -Phase in der heterogenen Membran als in der reinen DOPC-Membran erklären. Die bevorzugte Bindung der lipidierten N-Ras Proteine an fluide Membranen wurde zuvor bereits in Fluoreszenz-Mikroskopie-Studien an GUVs unter Verwendung von N-Ras Peptiden [191] als auch mit dem vollständigem Protein [192] gezeigt.

Der Austausch des Nukleotids (GTP und GDP) bezüglich des N-Ras HD/Far führt zu einer geringen Änderung der anfänglichen Bindung. Die aktive GTP-gebundene Form weist im Vergleich zur inaktiven GDP-gebundenen Form des Proteins hingegen leicht höhere Dissoziationsraten in der flüssig-geordneten Phase auf (Abb. 3. B und Abb. 3. B). Darüber hinaus ist der Anteil an stark gebundenem Protein bei der inaktiven GDP-gebundenen Form des Proteins signifikant höher (ca. 70 %) im Vergleich zur GTP-gebundenen Form, bei der der Anteil nur ungefähr 20 % beträgt. Dieses Verhalten lässt sich durch stärkere intermolekulare Lipid-vermittelte Protein-Protein-Wechselwirkungen (Cluster-Bildung) und /oder durch zusätzliche signifikante Beeinflussung der Bindung durch die hypervariable Region (HVR) des Proteins erklären, die durch Konformationsänderungen in den *Switch*-Regionen des Proteins hervorgerufen werden. Es ist möglich, dass die nicht lipidgebundenen Aminosäuren in der HVR die Bindungseigenschaften und Cluster-Bildung im zweiten Schritt nach der anfänglichen Bindung stark beeinflussen. In MD-Simulationen wurde bereits gezeigt, dass Änderungen in den *Switch*-Regionen die Orientierung von H-Ras an der Membran beeinflussen [193]. Hier wurde beobachtet, dass die Wechselwirkung mit der Membran durch bestimmte Aminosäuren in der Sequenz der HVR und durch die α 4-Helix, deren Orientierung sich beim Nukleotidaustausch ändert, beeinflusst wird. Dies führt zu einer veränderten Wechselwirkung des Proteins mit der Membran [193] und könnte somit

auch zu veränderten intermolekularen Wechselwirkungen der Membran-gebundenen Proteine führen. Es ist zudem berichtet worden, dass sich am Cystein 181 einfach-palmitoyliertes H-Ras ähnlich dem aktiven GTP-gebundenen N-Ras an der Membran verhält [115].

Das doppelhexadezylierte N-Ras Protein, N-Ras HD/HD, weist eine niedrige Tendenz zur stabilen Insertierung in die Membran auf, obwohl es ähnliche Assoziationsraten im Vergleich zu den anderen Proteinen zeigt (Abb. 3., Abb. 3.52). Dieses Verhalten kann durch die hohe Flexibilität der zwei Hexadecylreste erklärt werden. Ihre Insertion bedeutet einen hohen entropischen Verlust, insbesondere im Fall von verstärktem hydrophoben *Mismatch* zwischen der Membran und den Lipidankern des Proteins. Die Natur dieser hohen Flexibilität ist im Einklang mit kürzlich durchgeführten ^2H -NMR-Messungen [126, 192].

Zusammenfassend kann aus der hier durchgeführten Studie geschlossen werden, dass das natürliche monofarnesylierte N-Ras, N-Ras Far, bevorzugt und schnell in fluide Membranen mit seinem Farnesylrest eindringt. Eine zweifache Lipidierung, wie es bei N-Ras HD/Far der Fall ist, führt zu einer drastischen Verlangsamung der anfänglichen Bindungsraten, aber auch zu einer letztendlich stabileren Bindung (Abb. 3. A, Abb. 3.52). Die mittlere Dissoziationsgeschwindigkeit ist ebenso erniedrigt (Abb. 3. B). Dies steht im Einklang mit einer zuvor durchgeführten Studie, in der einfach-farnesylierte Modellpeptide ein kinetisch instabileres Verhalten in der Membran aufweisen als N-Ras HD/Far [176]. Zudem wurde berichtet, dass eine Depalmitoylierung des N-Ras Proteins zu einer retrograden Rückführung des Proteins von der Plasmamembran zum Golgi führt [194]. Ein Vergleich mit solchen Modell-Peptid-Studien ist jedoch nur bedingt möglich. Es wurde aber auch mit anderen Proteinen, wie dem Hedgehog-Protein [195] und durch Moleküldynamik-Simulationen [115, 193] von H-Ras an DMPC Membranen gezeigt, dass sowohl der Proteinkern, als auch die Art der Nukleotidbindung Einfluss auf die Lokalisierungsverhalten in der Membran, die Adsorptionskinetik als auch auf die Lipid-vermittelte Protein-Protein-Wechselwirkung und Cluster-Bildung hat. Die Beimischung von negativer Ladung oder die Erhöhung des elastischen Krümmungsstresses scheint keinen signifikanten Einfluss auf die Assoziations- bzw. Dissoziationskinetik von N-Ras an Membranen zu haben. Der Austausch des Nukleotids von GDP zu GTP bezüglich des N-Ras HD/Far führt sowohl zu einer leicht

veränderten Assoziations- und Dissoziationskinetik, als auch zu einer Änderung der Stabilität der Bindung. Diese Eigenschaft könnte bei der Regulation der örtlichen Trennung in der lateralen Ebene der Membran unterstützend wirken. Die natürliche inaktive Form des N-Ras, N-Ras HD/Far (GDP), weist eine stärkere quasi-irreversible Bindung auf, was auf eine stärkere Tendenz des Proteins zur Cluster-Bildung schließen lässt als dies bei der aktiven GTP-gebundenen Form der Fall ist. Allgemein wird erwartet, dass Proteincluster längere Lebenszeiten aufweisen und eine große Bedeutung bei biologischen Signalprozessen in der Zelle haben, welche die Wechselwirkungen mit Membran-gebundenen Effektoren und Regulatoren beinhalten. Im kinetisch stabilisierten Zustand dissoziiert das Protein von der Membran mit einer extrem langsamen Kinetik, wenn die Dissoziation nicht durch spezielle zelluläre Faktoren, wie die Matrix der Membran oder regulatorische Proteine, beschleunigt wird. Aus diesem Grund könnte die Wechselwirkung von Membran-gebundenen Effektormolekülen, wie z.B. Sos oder Galektinen, zu einer anderen Wechselwirkung mit N-Ras HD/Far (GTP) als mit HD/Far (GDP) führen.

3.2.4 Assoziationskinetik von N-Ras HD/Far (GDP) an fluide Membranen (*Stopped Flow*)

Zur zusätzlichen Charakterisierung der Assoziationskinetik des N-Ras HD/Far (GDP) an DOPC-Membranen wurden *Stopped-Flow*-Messungen durchgeführt. Hierzu wurden die unilamellaren DOPC-Vesikel (Durchmesser: 0,1 μm) mit einem Fluoreszenzmarker (0,2 mol% Texas-Red-DHPE) versehen und der FRET von Bodipy FL des Proteins auf den Texas Red-Marker der Membran gemessen. Das Ergebnis ist in Abb. 3.53 dargestellt.

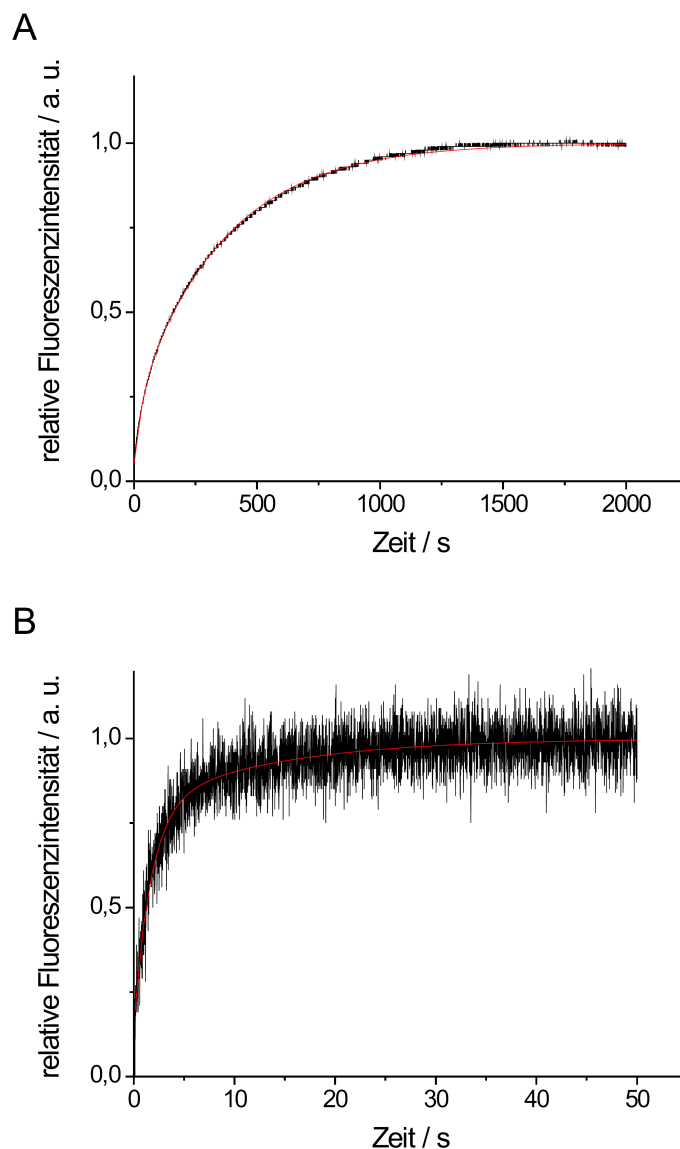


Abb. 3.53: Normierte Stopped Flow-Messungen des FRET-Signals von Texas Red-DHPE markierten DOPC-Vesikeln (0,25 mM) nach Anregung des Fluorophors von (A) N-Ras HD/Far-Bodipy FL (GDP) (0,25 μ M) und (B) Bodipy FL (0,125 μ M). Die gemessenen Daten sind in schwarz, die angepassten biexponentiellen Kurven in rot dargestellt. Man beachte die unterschiedliche Zeitskala.

Wie man in Abb. 3.53 A erkennen kann, erfolgt die Assoziation des N-Ras HD/Far an die DOPC-Membran sehr langsam. Ein Gleichgewicht der Bindung ist erst nach 25 Minuten erreicht. Eine Anpassung der Bindungskurve mit Hilfe von Gleichung (2.14) ergibt die beobachteten Assoziationsraten von $0,032 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für $k_{\text{on},1}$ und $0,00279 \text{ s}^{-1}$ für $k_{\text{on},2}$. Als Kontrolle wurde die Bindung von reinem Bodipy-FL (4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-bora-3a, 4a-Diaza-s-Indacen-3-Propionsäure) an die Membran gemessen, um auszuschließen, dass es sich bei der Messung des N-Ras HD/Far (GDP) um einen Bindungseffekt des extrinsischen und zum Teil einzeln in Lösung befindlichen

Fluorophors handelt. Hierfür wurde die gleiche Konzentration eingesetzt, mit der das N-Ras-Protein markiert worden war. Das Ergebnis ist in Abb. 3.53 B dargestellt. Die Einstellung des Bindungsgleichgewichts findet hierbei bereits nach ungefähr 25 Sekunden statt. Bei Anpassung der Messkurve an die biexponentielle Gleichung (2.14) wurden beobachtete Assoziationsraten von $0,59 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $0,076 \text{ s}^{-1}$ erhalten. Die Membranassoziation des Bodipy FL erfolgt also viel schneller als die des N-Ras HD/Far (GDP).

3.2.4.1 Diskussion

Die erhaltenen Stopped Flow-Daten belegen die SPR-Messungen des N-Ras HD/Far (GDP) an DOPC-Membranen. Auch hier wurde eine sehr langsame Assoziation des Proteins an die Membran beobachtet. In den SPR-Messungen konnte ebenfalls keine Einstellung des Bindungsgleichgewichts beobachtet werden. Die Kontrollmessungen der Bindung von Bodipy FL an die Membran belegen, dass die aufgenommenen Bindungsdaten von N-Ras HD/Far (GDP) an DOPC spezifisch für das Protein sind und kein Artefakt des Fluoreszenzmarkers ist. Die langsame Assoziation des N-Ras zeigt, dass die höhere Ordnung der beiden Lipidanker HD und Far beim Membraneinbau einen hohen Energieaufwand bedeutet, bzw. entropisch ungünstig ist. Sobald es jedoch gebunden ist, wirken die starken hydrophoben Wechselwirkungen mit den Lipidketten stabilisierend, so dass das Protein letztendlich stabil gebunden ist. Auch in ähnlich durchgeführten AFM-Messungen wurde eine sehr langsame Assoziation des N-Ras HD/Far (GDP) beobachtet [122]. Da die gemessenen Zeiten als physiologisch nicht relevant scheinen, liegt es nahe, dass die Bindung der N-Ras-Proteine an die Membran durch weitere Kofaktoren, wie z.B. GAPs, GEFs beeinflusst, bzw. katalysiert wird. Bei den hier durchgeführten Messungen muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Stopped-Flow-Methode aufgrund der durchwährenden Fluoreszenzanregung eher für schnelle kinetische Reaktionen anwendbar ist. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Aymelt Itzen (MPI, Dortmund) durchgeführt.

3.3 Entwicklung einer Temperaturzelle für FCS-Messungen

Zur Durchführung von fluoreszenzkorrelationsspektroskopischen Messungen in Lösung wurde eine Peltier-betriebene Temperaturzelle in Zusammenarbeit mit der Mechanik- und Elektronik-Werkstatt der TU Dortmund entworfen (Abb. 3.54). Ziel war es, eine vibrationsarme Zelle zu entwerfen, mit der es sowohl möglich ist unterhalb als auch oberhalb der Raumtemperatur zu messen. Aus diesem Grund wurden Peltier-Elemente als Temperaturregler verwendet. Dies sind elektrochemische Wandler, deren Prinzip auf dem Peltier-Effekt basieren. Sie erzeugen bei einer Temperaturdifferenz einen Stromfluss, bzw. ein Stromfluss führt zu einer Änderung der Temperatur. Ihr Vorteil ist gegenüber anderen Temperiermethoden, dass sie im Gegensatz zur Wassertemperierung keine zusätzlichen Vibrationen auf dem Mikroskopisch verursacht, welche die zu messende Diffusion der Moleküle beeinflussen könnten. Zum anderen können mit ihr auch Messungen unterhalb der Raumtemperatur durchgeführt werden, was mit normalen elektrisch beheizten Temperaturzellen nicht möglich ist.

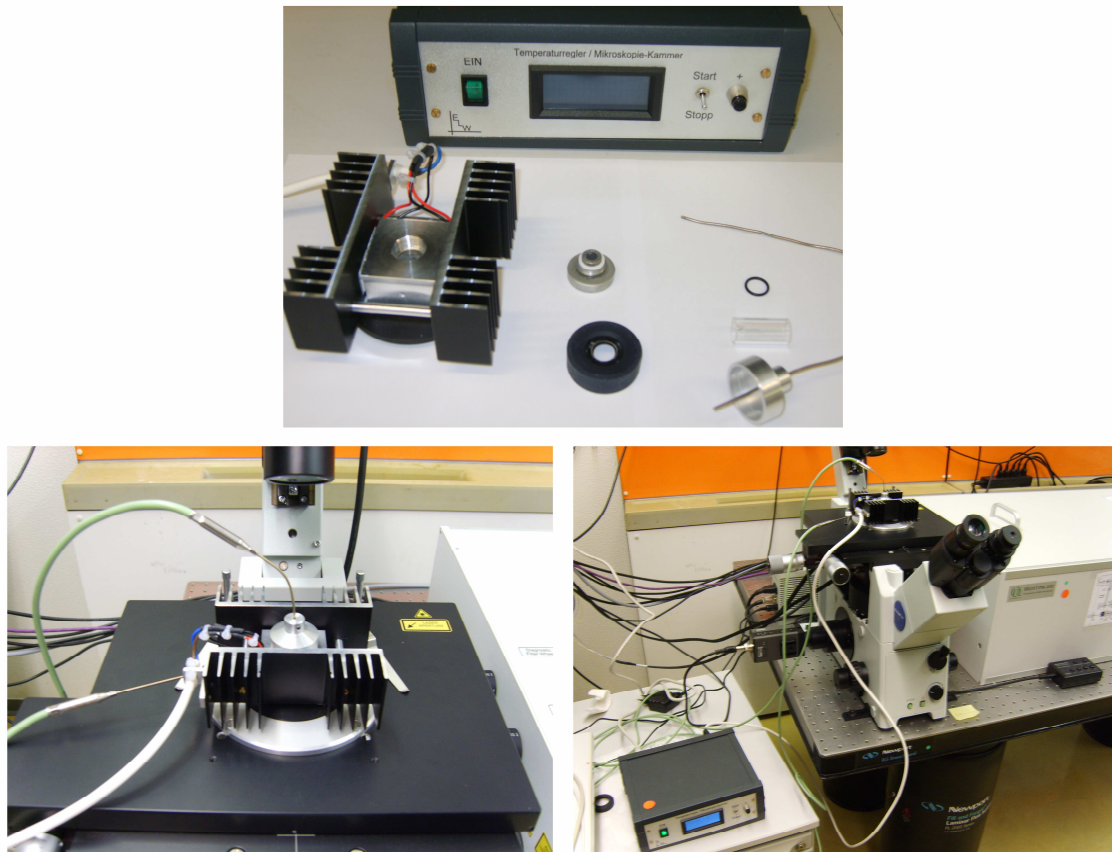


Abb. 3.54: Aufbau der Temperatur-Zelle. Oben: Einzelteile der Zelle, unten: Aufbau der Temperaturzelle auf dem Mikroskop.

Die Zelle besteht aus einem Aluminium-Gehäuse, in welcher die Peltier-Elemente integriert sind. Zur Gegenkühlung befinden sich an zwei gegenüberliegenden Seiten großflächige Metallplatten. Die Temperatur wird sowohl von der zu messenden Lösung als auch von dem umliegenden Gehäuse gemessen. Das Innenleben der Messzelle ist so konstruiert, dass die zu untersuchende Probe nur mit Glas in Kontakt kommt. In dem Aluminiumgehäuse befindet sich ein kleines Glasröhrchen von 1,2 cm Durchmesser und 2,6 cm Länge. Zum Objektiv hin ist die Zelle durch einen O-Ring zwischen Deckgläschen und Glasröhrchen abgedichtet. Nach oben hin ist die Zelle mit einem Schraubverschluss verschlossen, der ebenfalls einen O-Ring enthält. In diesem Schraubverschluss befindet sich eine zusätzliche Öffnung, durch die die Probe pipettiert und der Temperaturfühler in die Lösung eingetaucht werden kann. Ist der Fühler auf die Zelle gesetzt, so ist die Zelle vollständig abgedichtet. Zur zusätzlichen Temperaturkontrolle befindet sich im Aluminiumgehäuse ebenfalls ein Temperaturfühler. Somit kann eine Überhitzung des Mikroskopisches oder des

Objektivs verhindert werden. Der Temperaturbereich der Zelle erstreckt sich von 15 °C bis 60 °C.

Zur Überprüfung ihrer Funktionsfähigkeit wurde eine 1 nM Atto488-Lösung in Wasser gemessen. Die Auswertung der Diffusionszeiten erfolgte mit einem erweiterten Triplett-Modell (Gleichung (2.7)).

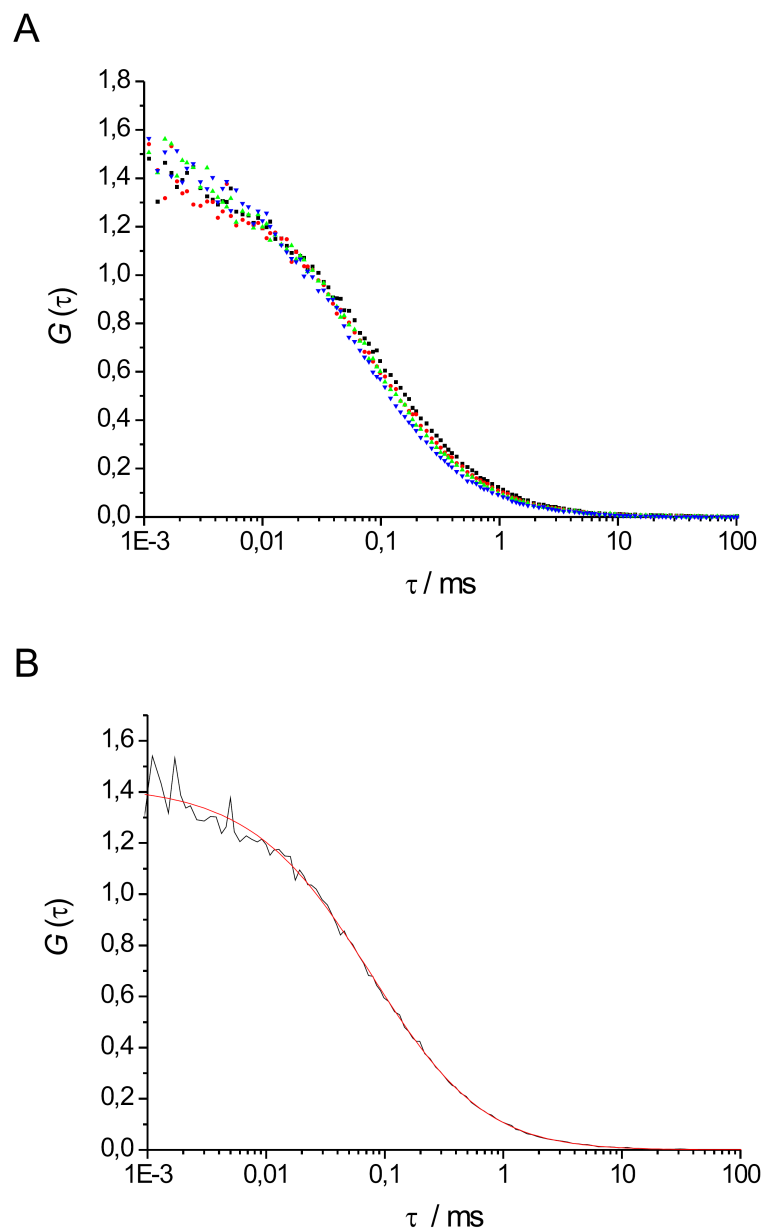


Abb. 3.55: FCS-Messungen von 1 nM Atto488 in Wasser. (A) gemessene Kurven bei 15 °C (schwarz), 25 °C (rot), 35 °C (grün); 45 °C (blau); (B) Vergleich der gemessenen Daten bei 25 °C (schwarz) mit dem verwendeten Modell (rot).

Die aufgenommenen FCS-Kurven und die zugehörigen Anpassungen an das genannte Modell sind in Abb. 3.55 wiedergegeben. Wie man in Abb. 3.55 A sehen kann, sinkt der Wendepunkt bei steigender Temperatur zu niedrigeren Diffusionszeiten. Nach Auswertung der Messkurven mit Hilfe des erweiterten Triplett-Modells (Abb. 3.55 B) wird dies auch quantitativ sichtbar. Hierzu wurde das konfokale Volumen mit Hilfe des Diffusionskoeffizienten von Atto488 bestimmt. Dieser beträgt bei 25°C $400 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ [132]. Das konfokale Volumen betrug in diesem Fall 0,91 fL, wobei die Exzentrizität κ 3,6 betrug. Zur Auswertung der anderen FCS-Kurven wurden das Volumen und κ konstant gehalten. In Abb. 3.56 sind die erhaltenen Diffusionszeiten und die mit Gleichung (2.4) berechneten entsprechenden Diffusionskoeffizienten dargestellt. Die Daten zeigen eine annähernd lineare Abnahme der Diffusionszeit, bzw. eine lineare Zunahme des Diffusionskoeffizienten mit steigender Temperatur.

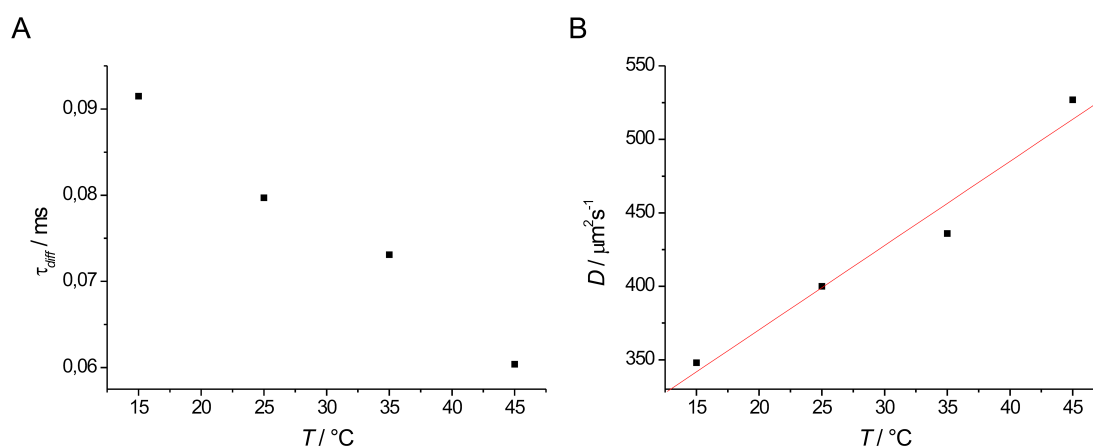


Abb. 3.56: (A) Diffusionszeit und (B) Diffusionskoeffizient von 1 nM Atto488 bei unterschiedlichen Temperaturen.

3.3.1.1 Diskussion

Zur vibrationsarmen temperaturabhängigen Messung von FCS-Spektren in Lösung wurde eine Peltier-betriebene Temperaturzelle entwickelt. Die Verwendung von Peltiers hat den Vorteil, dass sie im Gegensatz zur Wassertemperierung vibrationsarm ist und zudem im Gegensatz zu elektrischen Temperierungseinheiten auch zur Kühlung verwendet werden kann. Ihre Funktion wurde mit Hilfe von 1 nM Atto488 in Lösung

überprüft. Die erhaltenen Daten zeigen eine abnehmende Diffusionszeit mit steigender Temperatur. Dies ist in Einklang mit den erwarteten Ergebnissen. Die Temperaturzelle kann also für FCS-Messungen in Lösung, aber auch direkt an der Oberfläche, wie es bei immobilisierten Lipiddoppelschichten der Fall ist, verwendet werden.

4 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit war es Ziel, Protein-Membran-Wechselwirkungen ausgewählter Systeme mit Hilfe biophysikalischer Methoden zu untersuchen. Es waren zwei biologische Systeme im Fokus dieser Arbeit. Zum einen wurde die Wechselwirkung von Amylin mit der Membran mit Hilfe von Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie untersucht. Dieses Polypeptid zeigt bei erhöhter Konzentration, wie es bei Diabetes Mellitus Typ II der Fall ist, eine Neigung zur Fibrillenbildung, welche zur Störung der Integrität der Zellmembran von β -Zellen des Pankreas führt. Dies hat den Verlust der β -Zellen zur Folge, wodurch die Insulinproduktion und somit die Regulation des Blutzuckers erheblich gestört wird. In Gegenwart negativ geladener POPC-Monoschichten zeigt hIAPP nach einer transienten Bildung α -helikaler Strukturen eine Umordnung in parallel zur Grenzfläche orientierte parallele β -Faltblatt/ Schleifen-Strukturen. Die transiente α -helikale Struktur scheint maßgeblich an der Wechselwirkung mit der Membran beteiligt zu sein. Ein ähnliches Verhalten wurde an der Luft/Wasser-Grenzfläche beobachtet. Wie begleitende AFM-Aufnahmen jedoch zeigen, bilden sich nur an der POPG-Monoschicht Fibrillen aus. Die Untersuchung der Wechselwirkung von rIAPP mit der POPG-Monoschicht zeigte, dass die Interaktion mit dem positiv geladenen N-Terminus des Peptids erfolgt. rIAPP gleicht im N-terminalen Bereich dem hIAPP, weist jedoch keine amyloiden Eigenschaften, also keine Tendenz zur Fibrillenbildung auf. Diese Ergebnisse wurden durch Zytotoxizitätstests belegt. In diesen konnte gezeigt werden, dass es sich bei den toxischen Spezies nicht um die vollständig ausgebildeten Fibrillen, sondern vielmehr um deren Vorstufen handelt. Die toxische Wirkung von hIAPP konnte mit Hilfe des Polyphenols Resveratrol aufgehoben werden. Die Isolation der Plasmamembran aus der hier verwendeten β -Zelllinie INS-1E konnte erfolgreich mit einer Reinheit von ungefähr 70 % durchgeführt werden.

Zum anderen wurde die Wechselwirkung verschiedener Ras-Isoformen mit Modellbiomembranen untersucht. Ras-GTPasen spielen eine wichtige Rolle in vielen Signaltransduktion-Kaskaden, welche an Prozessen wie Zelldifferenzierung, Proliferation beteiligt sind. In ihrer funktionalen Form sind sie über verschiedene

Anker motive an die Membran gebunden. Um den Einfluss der Lipidanker und den Einfluss der Nukleotidbindung (GDP und GTP) auf die Membranbindung zu charakterisieren, wurden verschiedene semisynthetische Modifikationen der Ras-Isoformen K-, H- und N-Ras in Gegenwart von Membranen verschiedener Eigenschaften, das heißt unter Variation der Ladung, Phase und Krümmung, untersucht. Die Affinität von K-Ras4B im GDP-gebundenen Zustand in Abhängigkeit von Membranen unterschiedlicher Ladungsdichte wurde mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Technik charakterisiert. Es wurde neben der natürlichen Form des K-Ras4B, welche im C-terminalen Bereich neben einem Farnesylrest eine Polylysinsequenz als Membrananker-Motiv enthält, der Einfluss von negativer Ladung durch Anfügen eines zusätzlichen Phosphatrestes am Serin 181 und die Entfernung der Methylgruppe am C-terminalen Ende in der hypervariablen Region untersucht. Die Messungen zeigen eine zunehmende Stabilisierung der Bindung des K-Ras 4B mit steigendem Anteil an negativer Ladung in der Membran, was durch die starke elektrostatische Wechselwirkung der Polylysinsequenz des Proteins mit der negativen Oberflächenladung der Membran zu erklären ist. Phosphoryliertes K-Ras4B hingegen weist mit zunehmender Dichte negativer Ladung in der Membran ein instabileres Bindungsverhalten auf. Der Ersatz des am Serin 181 gebundenen Phosphats durch Glutaminsäure, welches häufig als Analogon zum Phosphat genutzt wird, führt zu einem im Vergleich zum phosphorylierten K-Ras4B unterschiedlichen Bindungsverhalten. Es weist kein eindeutiges ladungsabhängiges Bindungsverhalten auf. Die Entfernung der Methylgruppe am C-Terminus führt zu einer instabileren Bindung des Proteins an die Membran. Dies belegt, dass die C-terminale Methylierung für eine stabile Membraninsertion von großer Bedeutung ist. Zum Vergleich wurden Messungen mit einfach farnesyliertem H-Ras durchgeführt. Auch für dieses Protein wurde ebenfalls kein ladungsabhängiges Bindungsverhalten beobachtet, was die Wichtigkeit der Polylysinsequenz, welche im H-Ras fehlt, für eine stabile Membranbindung unterstreicht. Die Bindungseigenschaften von N-Ras wurden ebenfalls mit Hilfe verschiedener Lipidankermodifikationen (Far/Far (GDP), HD/Far (GDP), HD/HD (GDP) und Far (GDP)) und darüber hinaus auch der Einfluss der Nukleotidbindung durch zusätzliche Charakterisierung des N-Ras HD/Far (GppNHp) untersucht. Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie Messungen zeigten, eine

schnellere Insertion und zudem eine andere Art der Orientierung des doppelfarnesylierten N-Ras Proteins bei Bindung an eine POPC/BSM/Chol-Monoschicht im Vergleich zu bereits veröffentlichten Daten des N-Ras HD/Far und N-Ras. Zudem wurde hier der Einfluss von Fluoreszenzmarkierungen am Protein auf das Bindungsverhalten untersucht. Es wurde beobachtet, dass Fluoreszenzmarkierung am C-Terminus einen geringeren Einfluss auf das natürliche Bindungsverhalten hat, als eine Markierung am Proteinkern, der G-Domäne. Mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Technik wurde die Bindungskinetik der verschiedenen N-Ras-Konstrukte bei Insertion in Modellmembranen, welche eine reine flüssig-geordnete, eine reine flüssig-ungeordnete Phase und darüberhinaus deren Koexistenz aufwies, untersucht. Zudem wurde der Einfluss negativ-geladener Lipidkopfgruppen und von gespeichertem elastischem Krümmungsstress auf die Insertion der verschiedenen Proteine charakterisiert. Es wurden, abhängig von den verschiedenen Lipidanker-Motiven, signifikante Unterschiede im Bindungsverhalten beobachtet. N-Ras scheint bevorzugt an flüssig-ungeordnete Membranen zu binden. Elektrostatische Wechselwirkungen oder die Präsenz von elastischem Krümmungsstress scheinen bei der Bindung eine untergeordnete Rolle zu spielen. Einfach-farnesyliertes N-Ras weist allgemein die höchsten Assoziations- und Dissoziationsraten in fluiden Membranen auf. Zweifache Lipidierungen, vor allem Farnesylierungen, führen zwar zu einer langsameren Assoziation des Proteins an die Membran, sie bleiben aber letztendlich stabiler gebunden. Der Austausch des gebundenen Nukleotids des natürlich vorkommenden N-Ras HD/Far führt zu einem leicht veränderten Bindungsverhalten. Die inaktive GDP-gebundene Form des N-Ras HD/Far weist eine stärkere Membranbindung als die GTP-gebundene Form auf, was z.B. durch eine verstärkte Cluster-Bildung aus inaktivem Protein in der Membran erklärt werden kann. Die langsame und stabile Bindung des N-Ras HD/Far (GDP) an fluide Membranen wurde zudem durch *Stopped-Flow*-Messungen belegt.

Begleitend wurde zur Durchführung temperaturabhängiger Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie-Messungen eine vibrationsarme Peltier-betriebene Temperaturzelle entwickelt. Mit ihr ist es möglich, Daten unter- und oberhalb der Raumtemperatur aufzunehmen.

5 Literaturverzeichnis

1. Winter, R. and F. Noll, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Vol. 1. 1998: Teubner Verlag.
2. van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson, *Membrane lipids: where they are and how they behave*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(2): p. 112-24.
3. Mouritsen, O.G., *Life-as a matter of fat. The emerging science of lipidomics*, ed. Springer. 2005.
4. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. *Science*, 1972. **175**(23): p. 720-31.
5. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. *Nature*, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
6. Parton, R.G. and A.A. Richards, *Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms*. *Traffic*, 2003. **4**(11): p. 724-38.
7. Helms, J.B. and C. Zurzolo, *Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking*. *Traffic*, 2004. **5**(4): p. 247-54.
8. Prior, I.A., et al., *Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains*. *J Cell Biol*, 2003. **160**(2): p. 165-70.
9. Przybylo, M., et al., *Lipid diffusion in giant unilamellar vesicles is more than 2 times faster than in supported phospholipid bilayers under identical conditions*. *Langmuir*, 2006. **22**(22): p. 9096-9.
10. New, R.C., *Liposomes: a Practical Approach*. 1990: IRL Press at Oxford University Press.
11. Ulrich, A.S., *Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles*. *Biosci Rep*, 2002. **22**(2): p. 129-50.
12. Sivanandam, V.N., et al., *Phosphatidylcholine "wobble" in vesicles assessed by high-resolution ^{13}C field cycling NMR spectroscopy*. *J Am Chem Soc*, 2009. **131**(10): p. 3420-1.
13. Nicolini, C., et al., *Temperature and pressure effects on structural and conformational properties of POPC/SM/cholesterol model raft mixtures--a FT-IR, SAXS, DSC, PPC and Laurdan fluorescence spectroscopy study*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1758**(2): p. 248-58.
14. Marsh, D., *Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation and conformation of proteins in membranes*. *Biophys J*, 2007. **93**(11): p. 3884-99.
15. Mouritsen, O.G., *Theoretical models of phospholipid phase transitions*. *Chem Phys Lipids*, 1991. **57**(2-3): p. 179-94.
16. Munro, S., *Lipid rafts: elusive or illusive?* *Cell*, 2003. **115**(4): p. 377-88.
17. Veatch, S.L. and S.L. Keller, *Organization in lipid membranes containing cholesterol*. *Phys Rev Lett*, 2002. **89**(26): p. 268101.

18. Veatch, S.L. and S.L. Keller, *Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol*. Biophys J, 2003. **85**(5): p. 3074-83.
19. Veatch, S.L. and S.L. Keller, *A closer look at the canonical 'Raft Mixture' in model membrane studies*. Biophys J, 2003. **84**(1): p. 725-6.
20. de Almeida, R.F., A. Fedorov, and M. Prieto, *Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts*. Biophys J, 2003. **85**(4): p. 2406-16.
21. Nicolini, C., et al., *Visualizing association of N-ras in lipid microdomains: influence of domain structure and interfacial adsorption*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(1): p. 192-201.
22. Veatch, S.L., et al., *Liquid domains in vesicles investigated by NMR and fluorescence microscopy*. Biophys J, 2004. **86**(5): p. 2910-22.
23. Sunde, M., et al., *Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction*. J Mol Biol, 1997. **273**(3): p. 729-39.
24. Hirota-Nakaoka, N., et al., *Dissolution of beta2-microglobulin amyloid fibrils by dimethylsulfoxide*. J Biochem, 2003. **134**(1): p. 159-64.
25. Glenner, G.G. and W.D. Terry, *Characterization of amyloid*. Annu Rev Med, 1974. **25**: p. 131-5.
26. Kelly, J.W. and W.E. Balch, *Amyloid as a natural product*. J Cell Biol, 2003. **161**(3): p. 461-2.
27. Dobson, C.M., *The structural basis of protein folding and its links with human disease*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001. **356**(1406): p. 133-45.
28. Dobson, C.M., *Protein misfolding, evolution and disease*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(9): p. 329-32.
29. Chiti, F., et al., *Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3590-4.
30. Wiltzius, J.J., et al., *Atomic structure of the cross-beta spine of islet amyloid polypeptide (amylin)*. Protein Sci, 2008. **17**(9): p. 1467-74.
31. Skovronsky, D.M., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski, *Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications*. Annu Rev Pathol, 2006. **1**: p. 151-70.
32. Bhak, G., Y.J. Choe, and S.R. Paik, *Mechanism of amyloidogenesis: nucleation-dependent fibrillation versus double-concerted fibrillation*. BMB Rep, 2009. **42**(9): p. 541-51.
33. Jarrett, J.T. and P.T. Lansbury, Jr., *Amyloid fibril formation requires a chemically discriminating nucleation event: studies of an amyloidogenic sequence from the bacterial protein OsmB*. Biochemistry, 1992. **31**(49): p. 12345-52.
34. Tomski, S.J. and R.M. Murphy, *Kinetics of aggregation of synthetic beta-amyloid peptide*. Arch Biochem Biophys, 1992. **294**(2): p. 630-8.
35. Kelly, J.W., *Mechanisms of amyloidogenesis*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(10): p. 824-6.

36. Bhak, G., et al., *Granular assembly of alpha-synuclein leading to the accelerated amyloid fibril formation with shear stress*. PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4177.
37. Jarrett, J.T., E.P. Berger, and P.T. Lansbury, Jr., *The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Biochemistry, 1993. **32**(18): p. 4693-7.
38. Jarrett, J.T. and P.T. Lansbury, Jr., *Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?* Cell, 1993. **73**(6): p. 1055-8.
39. Gellermann, G.P., et al., *Raft lipids as common components of human extracellular amyloid fibrils*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(18): p. 6297-302.
40. Simons, K. and R. Ehehalt, *Cholesterol, lipid rafts, and disease*. J Clin Invest, 2002. **110**(5): p. 597-603.
41. Gorbenko, G.P. and P.K. Kinnunen, *The role of lipid-protein interactions in amyloid-type protein fibril formation*. Chem Phys Lipids, 2006. **141**(1-2): p. 72-82.
42. Sparr, E., et al., *Islet amyloid polypeptide-induced membrane leakage involves uptake of lipids by forming amyloid fibers*. FEBS Lett, 2004. **577**(1-2): p. 117-20.
43. Kakio, A., et al., *Formation of a membrane-active form of amyloid beta-protein in raft-like model membranes*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **303**(2): p. 514-8.
44. Arispe, N., H.B. Pollard, and E. Rojas, *beta-Amyloid Ca(2+)-channel hypothesis for neuronal death in Alzheimer disease*. Mol Cell Biochem, 1994. **140**(2): p. 119-25.
45. Jeworrek, C., et al., *Interaction of IAPP and insulin with model interfaces studied using neutron reflectometry*. Biophys J, 2009. **96**(3): p. 1115-23.
46. Karlsson, E., *IAPP as a regulator of glucose homeostasis and pancreatic hormone secretion (review)*. Int J Mol Med, 1999. **3**(6): p. 577-84.
47. Westermark, P., E. Wilander, and K.H. Johnson, *Islet amyloid polypeptide*. Lancet, 1987. **2**(8559): p. 623.
48. Hay, D.L., et al., *Amylin receptors: molecular composition and pharmacology*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 5): p. 865-7.
49. Cluck, M.W., C.Y. Chan, and T.E. Adrian, *The regulation of amylin and insulin gene expression and secretion*. Pancreas, 2005. **30**(1): p. 1-14.
50. Hoppener, J.W., B. Ahren, and C.J. Lips, *Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus*. N Engl J Med, 2000. **343**(6): p. 411-9.
51. Engel, M.F., *Membrane permeabilization by Islet Amyloid Polypeptide*. Chem Phys Lipids, 2009. **160**(1): p. 1-10.
52. Glabe, C.G., *Structural classification of toxic amyloid oligomers*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29639-43.

53. Clark, A., et al., *Islet amyloid formed from diabetes-associated peptide may be pathogenic in type-2 diabetes*. Lancet, 1987. **2**(8553): p. 231-4.
54. Madine, J., et al., *Structural insights into the polymorphism of amyloid-like fibrils formed by region 20-29 of amylin revealed by solid-state NMR and X-ray fiber diffraction*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(45): p. 14990-5001.
55. Goldsbury, C.S., et al., *Polymorphic fibrillar assembly of human amylin*. J Struct Biol, 1997. **119**(1): p. 17-27.
56. Radovan, D., V. Smirnovas, and R. Winter, *Effect of pressure on islet amyloid polypeptide aggregation: revealing the polymorphic nature of the fibrillation process*. Biochemistry, 2008. **47**(24): p. 6352-60.
57. Westermark, P., et al., *Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5036-40.
58. Janson, J., et al., *The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles*. Diabetes, 1999. **48**(3): p. 491-8.
59. Anguiano, M., R.J. Nowak, and P.T. Lansbury, Jr., *Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes*. Biochemistry, 2002. **41**(38): p. 11338-43.
60. Porat, Y., et al., *The human islet amyloid polypeptide forms transient membrane-active prefibrillar assemblies*. Biochemistry, 2003. **42**(37): p. 10971-7.
61. Green, J.D., et al., *Human amylin oligomer growth and fibril elongation define two distinct phases in amyloid formation*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 12206-12.
62. Green, J.D., et al., *Atomic force microscopy reveals defects within mica supported lipid bilayers induced by the amyloidogenic human amylin peptide*. J Mol Biol, 2004. **342**(3): p. 877-87.
63. Knight, J.D., J.A. Hebda, and A.D. Miranker, *Conserved and cooperative assembly of membrane-bound alpha-helical states of islet amyloid polypeptide*. Biochemistry, 2006. **45**(31): p. 9496-508.
64. Meier, J.J., et al., *Inhibition of human IAPP fibril formation does not prevent beta-cell death: evidence for distinct actions of oligomers and fibrils of human IAPP*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **291**(6): p. E1317-24.
65. Haataja, L., et al., *Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis*. Endocr Rev, 2008. **29**(3): p. 303-16.
66. Goldsbury, C., et al., *Amyloid fibril formation from full-length and fragments of amylin*. J Struct Biol, 2000. **130**(2-3): p. 352-62.
67. Higham, C.E., et al., *Preparation of synthetic human islet amyloid polypeptide (IAPP) in a stable conformation to enable study of conversion to amyloid-like fibrils*. FEBS Lett, 2000. **470**(1): p. 55-60.
68. Williamson, J.A. and A.D. Miranker, *Direct detection of transient alpha-helical states in islet amyloid polypeptide*. Protein Sci, 2007. **16**(1): p. 110-7.
69. Knight, J.D. and A.D. Miranker, *Phospholipid catalysis of diabetic amyloid assembly*. J Mol Biol, 2004. **341**(5): p. 1175-87.

70. Westermark, P., et al., *Effects of beta cell granule components on human islet amyloid polypeptide fibril formation*. FEBS Lett, 1996. **379**(3): p. 203-6.
71. Arispe, N., E. Rojas, and H.B. Pollard, *Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 567-71.
72. Mirzabekov, T.A., M.C. Lin, and B.L. Kagan, *Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin*. J Biol Chem, 1996. **271**(4): p. 1988-92.
73. Kawahara, M., et al., *Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14077-83.
74. Kourie, J.I., et al., *Heterogeneous amyloid-formed ion channels as a common cytotoxic mechanism: implications for therapeutic strategies against amyloidosis*. Cell Biochem Biophys, 2002. **36**(2-3): p. 191-207.
75. Kagan, B.L., R. Azimov, and R. Azimova, *Amyloid peptide channels*. J Membr Biol, 2004. **202**(1): p. 1-10.
76. Pellistri, F., et al., *Nonspecific interaction of prefibrillar amyloid aggregates with glutamatergic receptors results in Ca²⁺ increase in primary neuronal cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29950-60.
77. Kaye, R., et al., *Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer*. J Biol Chem, 2009. **284**(7): p. 4230-7.
78. Quist, A., et al., *Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(30): p. 10427-32.
79. Engel, M.F., et al., *Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(16): p. 6033-8.
80. Westermark, G., et al., *Differences in amyloid deposition in islets of transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide versus human islets implanted into nude mice*. Metabolism, 1999. **48**(4): p. 448-54.
81. Westermark, G.T., et al., *Islet amyloid development in a mouse strain lacking endogenous islet amyloid polypeptide (IAPP) but expressing human IAPP*. Mol Med, 2000. **6**(12): p. 998-1007.
82. Jayasinghe, S.A. and R. Langen, *Lipid membranes modulate the structure of islet amyloid polypeptide*. Biochemistry, 2005. **44**(36): p. 12113-9.
83. Ruschak, A.M. and A.D. Miranker, *Fiber-dependent amyloid formation as catalysis of an existing reaction pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(30): p. 12341-6.
84. Engel, M.F., A.J. Visser, and C.P. van Mierlo, *Conformation and orientation of a protein folding intermediate trapped by adsorption*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11316-21.
85. Aisenbrey, C., et al., *How is protein aggregation in amyloidogenic diseases modulated by biological membranes?* Eur Biophys J, 2008. **37**(3): p. 247-55.
86. Zhang, S., et al., *Fibrillogenic amylin evokes islet beta-cell apoptosis through linked activation of a caspase cascade and JNK1*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52810-9.

87. Apostolidou, M., S.A. Jayasinghe, and R. Langen, *Structure of alpha-helical membrane-bound human islet amyloid polypeptide and its implications for membrane-mediated misfolding*. J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 17205-10.
88. Riddle, M.C. and D.J. Drucker, *Emerging therapies mimicking the effects of amylin and glucagon-like peptide I*. Diabetes Care, 2006. **29**(2): p. 435-49.
89. Bulic, B., et al., *Rhodanine-based tau aggregation inhibitors in cell models of tauopathy*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(48): p. 9215-9.
90. Mishra, R., et al., *Small-molecule inhibitors of islet amyloid polypeptide fibril formation*. Angew Chem Int Ed Engl, 2008. **47**(25): p. 4679-82.
91. Taniguchi, S., et al., *Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 7614-23.
92. Yan, L.M., et al., *Design of a mimic of nonamyloidogenic and bioactive human islet amyloid polypeptide (IAPP) as nanomolar affinity inhibitor of IAPP cytotoxic fibrillogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2046-51.
93. Porat, Y., A. Abramowitz, and E. Gazit, *Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism*. Chem Biol Drug Des, 2006. **67**(1): p. 27-37.
94. Riviere, C., et al., *Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro*. Bioorg Med Chem, 2007. **15**(2): p. 1160-7.
95. Marambaud, P., H. Zhao, and P. Davies, *Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37377-82.
96. O'Nuallain, B., et al., *Seeding specificity in amyloid growth induced by heterologous fibrils*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17490-9.
97. Asfari, M., et al., *Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines*. Endocrinology, 1992. **130**(1): p. 167-78.
98. Merglen, A., et al., *Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells*. Endocrinology, 2004. **145**(2): p. 667-78.
99. Praz, G.A., et al., *Regulation of immunoreactive-insulin release from a rat cell line (RINm5F)*. Biochem J, 1983. **210**(2): p. 345-52.
100. Bos, J.L., *ras oncogenes in human cancer: a review*. Cancer Res, 1989. **49**(17): p. 4682-9.
101. Brunsveld, L., et al., *Lipidated ras and rab peptides and proteins--synthesis, structure, and function*. Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(40): p. 6622-46.
102. Biou, V. and J. Cherfils, *Structural principles for the multispecificity of small GTP-binding proteins*. Biochemistry, 2004. **43**(22): p. 6833-40.
103. Vetter, I.R. and A. Wittinghofer, *The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions*. Science, 2001. **294**(5545): p. 1299-304.
104. Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick, *The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism*. Nature, 1991. **349**(6305): p. 117-27.

105. Wittinghofer, A. and H. Waldmann, *Ras - ein molekularer Schalter bei der Tumorentstehung*. Angewandte Chemie, 2000. **112**(23): p. 4360-4383.
106. Schmidt, A. and A. Hall, *Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch*. Genes Dev, 2002. **16**(13): p. 1587-609.
107. Bernardis, A. and J. Settleman, *GAP control: regulating the regulators of small GTPases*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(7): p. 377-85.
108. Bishop, A.L. and A. Hall, *Rho GTPases and their effector proteins*. Biochem J, 2000. **348 Pt 2**: p. 241-55.
109. Repasky, G.A., E.J. Chenette, and C.J. Der, *Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis?* Trends Cell Biol, 2004. **14**(11): p. 639-47.
110. Wennerberg, K., K.L. Rossman, and C.J. Der, *The Ras superfamily at a glance*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 843-6.
111. Omerovic, J., et al., *Ras isoform abundance and signalling in human cancer cell lines*. Oncogene, 2008. **27**(19): p. 2754-62.
112. Omerovic, J., A.J. Laude, and I.A. Prior, *Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(19-20): p. 2575-89.
113. Laude, A.J. and I.A. Prior, *Palmitoylation and localisation of RAS isoforms are modulated by the hypervariable linker domain*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 4): p. 421-7.
114. Apolloni, A., et al., *H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(7): p. 2475-87.
115. Roy, S., et al., *Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(15): p. 6722-33.
116. Hancock, J.F. and R.G. Parton, *Ras plasma membrane signalling platforms*. Biochem J, 2005. **389**(Pt 1): p. 1-11.
117. Nicolau, D.V., Jr., et al., *Identifying optimal lipid raft characteristics required to promote nanoscale protein-protein interactions on the plasma membrane*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(1): p. 313-23.
118. Prior, I.A., R.G. Parton, and J.F. Hancock, *Observing cell surface signaling domains using electron microscopy*. Sci STKE, 2003. **2003**(177): p. PL9.
119. Plowman, S.J., et al., *Electrostatic interactions positively regulate K-Ras nanocluster formation and function*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(13): p. 4377-85.
120. Silvius, J.R., et al., *K-ras4B and prenylated proteins lacking "second signals" associate dynamically with cellular membranes*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(1): p. 192-202.
121. Bivona, T.G., et al., *PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis*. Mol Cell, 2006. **21**(4): p. 481-93.
122. Weise, K., et al., *Influence of the lipidation motif on the partitioning and association of N-Ras in model membrane subdomains*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(4): p. 1557-64.

123. Meder, D. and K. Simons, *Cell biology. Ras on the roundabout*. Science, 2005. **307**(5716): p. 1731-3.
124. Gelb, M.H., et al., *Therapeutic intervention based on protein prenylation and associated modifications*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(10): p. 518-28.
125. Reuther, G., et al., *Structural model of the membrane-bound C terminus of lipid-modified human N-ras protein*. Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(32): p. 5387-90.
126. Reuther, G., et al., *The lipidated membrane anchor of full length N-Ras protein shows an extensive dynamics as revealed by solid-state NMR spectroscopy*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(42): p. 13840-6.
127. Meister, A., et al., *Insertion of lipidated Ras proteins into lipid monolayers studied by infrared reflection absorption spectroscopy (IRRAS)*. Biophys J, 2006. **91**(4): p. 1388-401.
128. Madge, D.E., E.L. Elson, and W.W. Webb, *Thermodynamics fluctuations in a reacting system: Measurement by fluorescence correlation spectroscopy*. Phys. Rev. Lett., 1972. **29**: p. 705-708.
129. Rüttinger, S., *Confocal Microscopy and Quantitative Single Molecule Techniques for Metrology in Molecular Medicine*, in Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften. 2006, TU Berlin: Berlin.
130. Chen, Y., *Analysis and applications of fluorescence fluctuation spectroscopy.*, in *Biophysics and Computational Biology*. 1998, University of Illinois Urbana-Champaign.
131. Schwille, P. and E. Haustein, *FCS An introduction to its concepts and applications*. Biophysics Textbook online. 2004.
132. Dertinger, T. and B. Ewers, *Unpublished Results*. PicoQuant GmbH, 2008.
133. Meister, A., A. Kerth, and A. Blume, *Adsorption kinetics of n-nonyl-beta-D-glucopyranoside at the air-water interface studied by infrared reflection absorption spectroscopy*. J Phys Chem B, 2005. **109**(13): p. 6239-46.
134. Flach, C.R., et al., *External reflection FTIR of peptide monolayer films in situ at the air/water interface: experimental design, spectra-structure correlations, and effects of hydrogen-deuterium exchange*. Biophys J, 1994. **67**(1): p. 402-10.
135. Kerth, A., et al., *Infrared reflection absorption spectroscopy of amphipathic model peptides at the air/water interface*. Biophys J, 2004. **86**(6): p. 3750-8.
136. Meinders, M.B., G.G. van den Bosch, and H.H. de Jongh, *Adsorption properties of proteins at and near the air/water interface from IRRAS spectra of protein solutions*. Eur Biophys J, 2001. **30**(4): p. 256-67.
137. Maltseva, E., et al., *Adsorption of amyloid beta (1-40) peptide at phospholipid monolayers*. Chembiochem, 2005. **6**(10): p. 1817-24.
138. Lopes, D.H., et al., *Mechanism of islet amyloid polypeptide fibrillation at lipid interfaces studied by infrared reflection absorption spectroscopy*. Biophys J, 2007. **93**(9): p. 3132-41.
139. Kerth, A., *Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie an Lipid-, Peptid- und Flüssigkristall-Filmen an der Luft/Wasser-Grenzfläche*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät*. 2003, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Halle (Saale).

140. Nakamura, T., et al., *PX-RICS mediates ER-to-Golgi transport of the N-cadherin/beta-catenin complex*. Genes Dev, 2008. **22**(9): p. 1244-56.
141. Bhattacharjee, G., et al., *Factor Xa binding to annexin 2 mediates signal transduction via protease-activated receptor 1*. Circ Res, 2008. **102**(4): p. 457-64.
142. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
143. <http://www.aktuelle-wochenschau.de/w3/w3.html>.
144. <http://www.biocore.com>.
145. Mayer, L.D., M.J. Hope, and P.R. Cullis, *Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure*. Biochim Biophys Acta, 1986. **858**(1): p. 161-8.
146. Myszka, D.G., *Improving biosensor analysis*. J Mol Recognit, 1999. **12**(5): p. 279-84.
147. Cooper, M.A., et al., *A vesicle capture sensor chip for kinetic analysis of interactions with membrane-bound receptors*. Anal Biochem, 2000. **277**(2): p. 196-205.
148. Bitto, E., et al., *Mechanism of annexin I-mediated membrane aggregation*. Biochemistry, 2000. **39**(44): p. 13469-77.
149. Erb, E.M., et al., *Characterization of the surfaces generated by liposome binding to the modified dextran matrix of a surface plasmon resonance sensor chip*. Anal Biochem, 2000. **280**(1): p. 29-35.
150. BIACORE-AB, *Sensor chip L1; Instructions for use*. 1998.
151. Pingoud, A.M. and K. Urbanke, *Arbeitsmethoden der Biochemie*. 1977: Gruyter.
152. Munishkina, L.A. and A.L. Fink, *Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(8): p. 1862-85.
153. Khurana, R., et al., *Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils*. J Struct Biol, 2005. **151**(3): p. 229-38.
154. Demel, R.A., et al., *Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers*. Biochim Biophys Acta, 1975. **406**(1): p. 97-107.
155. Engel, M.F., et al., *Islet amyloid polypeptide inserts into phospholipid monolayers as monomer*. J Mol Biol, 2006. **356**(3): p. 783-9.
156. Jansen, R., W. Dzwolak, and R. Winter, *Amyloidogenic self-assembly of insulin aggregates probed by high resolution atomic force microscopy*. Biophys J, 2005. **88**(2): p. 1344-53.
157. Jaikaran, E.T., et al., *Identification of a novel human islet amyloid polypeptide beta-sheet domain and factors influencing fibrillogenesis*. J Mol Biol, 2001. **308**(3): p. 515-25.
158. Shao, H., et al., *Solution structures of micelle-bound amyloid beta-(1-40) and beta-(1-42) peptides of Alzheimer's disease*. J Mol Biol, 1999. **285**(2): p. 755-73.

159. Kirkitadze, M.D., M.M. Condron, and D.B. Teplow, *Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid beta-protein fibrillogenesis*. J Mol Biol, 2001. **312**(5): p. 1103-19.
160. Kessler, J.C., J.C. Rochet, and P.T. Lansbury, Jr., *The N-terminal repeat domain of alpha-synuclein inhibits beta-sheet and amyloid fibril formation*. Biochemistry, 2003. **42**(3): p. 672-8.
161. Chiti, F. and C.M. Dobson, *Protein misfolding, functional amyloid, and human disease*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 333-66.
162. Kajava, A.V., U. Aebi, and A.C. Steven, *The parallel superpleated beta-structure as a model for amyloid fibrils of human amylin*. J Mol Biol, 2005. **348**(2): p. 247-52.
163. Goldsbury, C., et al., *Watching amyloid fibrils grow by time-lapse atomic force microscopy*. J Mol Biol, 1999. **285**(1): p. 33-9.
164. Jaikaran, E.T. and A. Clark, *Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1537**(3): p. 179-203.
165. Ma, Z., et al., *Enhanced in vitro production of amyloid-like fibrils from mutant (S20G) islet amyloid polypeptide*. Amyloid, 2001. **8**(4): p. 242-9.
166. Weise, K., et al., *Interaction of hIAPP with Model Raft Membranes and Pancreatic beta-cells: Cytotoxicity of hIAPP Oligomers*. Chembiochem, accepted.
167. Mishra, R., et al., *Inhibiting islet amyloid polypeptide fibril formation by the red wine compound resveratrol*. Chembiochem, 2009. **10**(3): p. 445-9.
168. Levy, M., et al., *Phenolsulfonphthalein, but not phenolphthalein, inhibits amyloid fibril formation: implications for the modulation of amyloid self-assembly*. Biochemistry, 2008. **47**(22): p. 5896-904.
169. Ehrnhoefer, D.E., et al., *EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(6): p. 558-66.
170. Conte, A., S. Pellegrini, and D. Tagliacruzchi, *Synergistic protection of PC12 cells from beta-amyloid toxicity by resveratrol and catechin*. Brain Res Bull, 2003. **62**(1): p. 29-38.
171. Jang, J.H. and Y.J. Surh, *Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(8): p. 1100-10.
172. Evers, F., et al., *Elucidating the mechanism of lipid membrane-induced IAPP fibrillogenesis and its inhibition by the red wine compound resveratrol: a synchrotron X-ray reflectivity study*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(27): p. 9516-21.
173. Radovan, D., N. Opitz, and R. Winter, *Fluorescence microscopy studies on islet amyloid polypeptide fibrillation at heterogeneous and cellular membrane interfaces and its inhibition by resveratrol*. FEBS Lett, 2009. **583**(9): p. 1439-45.

174. Ghomashchi, F., et al., *Binding of prenylated and polybasic peptides to membranes: affinities and intervesicle exchange*. *Biochemistry*, 1995. **34**(37): p. 11910-8.
175. Leventis, R. and J.R. Silvius, *Lipid-binding characteristics of the polybasic carboxy-terminal sequence of K-ras4B*. *Biochemistry*, 1998. **37**(20): p. 7640-8.
176. Silvius, J.R. and F. l'Heureux, *Fluorimetric evaluation of the affinities of isoprenylated peptides for lipid bilayers*. *Biochemistry*, 1994. **33**(10): p. 3014-22.
177. Shahinian, S. and J.R. Silvius, *Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes*. *Biochemistry*, 1995. **34**(11): p. 3813-22.
178. Wittinghofer, F., et al., *Three-dimensional structure of p21 in the active conformation and analysis of an oncogenic mutant*. *Environ Health Perspect*, 1991. **93**: p. 11-5.
179. Grigoriev, D.O., et al., *Effect of fluorescence labelling on the properties of protein adsorption layers at the air/water interface*. *Food Hydrocolloids*, 2009. **23**: p. 221-224.
180. Gohlke, A., et al., *Influence of the Lipid Anchor Motif of N-Ras on the Interaction with Lipid Membranes – a Surface Plasmon Resonance Study*. *Biophys J*, accepted.
181. Jeworrek, C., M. Puhse, and R. Winter, *X-ray kinematography of phase transformations of three-component lipid mixtures: a time-resolved synchrotron X-ray scattering study using the pressure-jump relaxation technique*. *Langmuir*, 2008. **24**(20): p. 11851-9.
182. Attard, G.S., et al., *Modulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by membrane curvature elastic stress*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(16): p. 9032-6.
183. Ces, O. and X. Mulet, *Physical coupling between lipids and proteins: a paradigm for cellular control*. *Signal Transduction*, 2006. **6**(2): p. 112-132.
184. Sorre, B., et al., *Curvature-driven lipid sorting needs proximity to a demixing point and is aided by proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(14): p. 5622-6.
185. Wang, T.Y., R. Leventis, and J.R. Silvius, *Fluorescence-based evaluation of the partitioning of lipids and lipidated peptides into liquid-ordered lipid microdomains: a model for molecular partitioning into "lipid rafts"*. *Biophys J*, 2000. **79**(2): p. 919-33.
186. Brunsveld, L., H. Waldmann, and D. Huster, *Membrane binding of lipidated Ras peptides and proteins--the structural point of view*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1788**(1): p. 273-88.
187. Jensen, M.O. and O.G. Mouritsen, *Lipids do influence protein function--the hydrophobic matching hypothesis revisited*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1666**(1-2): p. 205-26.
188. Schmidt, U., G. Guigas, and M. Weiss, *Cluster formation of transmembrane proteins due to hydrophobic mismatching*. *Phys Rev Lett*, 2008. **101**(12): p. 128104.

189. Rothman, J.E. and J. Lenard, *Membrane asymmetry*. Science, 1977. **195**(4280): p. 743-53.
190. Devaux, P.F. and R. Morris, *Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes*. Traffic, 2004. **5**(4): p. 241-6.
191. Janosch, S., et al., *Partitioning of dual-lipidated peptides into membrane microdomains: lipid sorting vs peptide aggregation*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(24): p. 7496-503.
192. Vogel, A., et al., *The lipid modifications of Ras that sense membrane environments and induce local enrichment*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(46): p. 8784-7.
193. Abankwa, D., A.A. Gorfe, and J.F. Hancock, *Ras nanoclusters: molecular structure and assembly*. Semin Cell Dev Biol, 2007. **18**(5): p. 599-607.
194. Rocks, O., et al., *An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms*. Science, 2005. **307**(5716): p. 1746-52.
195. Peters, C., et al., *The cholesterol membrane anchor of the Hedgehog protein confers stable membrane association to lipid-modified proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(23): p. 8531-6.

6 Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid β
AFM	Rasterkraftmikroskopie
Arf	ADP-Ribosylierungsfaktor
ATR-FTIR	abgeschwächte Totalreflexionsspektroskopische- Transformationsinfrarotspektroskopie
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino- tris(hydroxymethyl)methan
Bodipy-FL	4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-bora-3a, 4a-Diaza-s- Indacen-3-Propionsäure
BRIN-BD11	β -Zelllinie
BSA	Albumin aus Kälberserum
BSM	Sphingomyelin aus dem Hirn
CD	zirkuläre Dichroismus-Spektroskopie
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1- propansulfonat
Chol	Cholesterin
CPP	Kritischer Packungsparameter
DMT2	Diabetes Mellitus Typ 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamin
DOPG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phospho-(1'- <i>rac</i> - Glycerol)
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DSC	Dynamische Differenz- <i>Scanning</i> -Kalorimetrie
eE	frühes (early) Endosom
EGCG	Epigallochatechingallat
EPR	Elektronenspinresonanz
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
Ets	Transkriptionsfaktor
Far	Farnesyl
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FT-IR	Fourier-Transformationsinfrarot
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GEF	Guanin-Austauschfaktor
GUV	Riesige unilamellare Vesikel
HD	Hexadezylrest
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HeLa	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure

hIAPP	Humanes Insel-Amyloides Polypeptid
HUVEC	humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene
H-Ras	Harvey-Ras sarcoma
HVR	Hypervariable Region
INS-1E	β -Zelllinie
IRRAS	Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie
ITO	Indiumzinnoxid
K-Ras	Kirsten-Ras sarcoma
IE	Spätes (late) Endosom
L_{α} bzw. l_d	flüssig-kristallinen/ungeordnete Phase
l_o	flüssig-geordneten Phase
LUV	Große unilamellare Vesikel
lyso-PC	Lysophosphatidylcholin
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MEK	MAP-ERK-Kinase
MLV	Multilamellare Vesikel
NA	Numerische Apertur
NMR	Kernspinresonanz
N-Ras	Neuroblastoma-Ras sarcoma
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PA	Phosphatsäure
Pal	Palmitoylrest
PC	Phosphatidylcholin
PDE- δ	Phosphodiesterase- δ
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PM	Plasmamembran
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3- Phosphocholin
POPG	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Ghospho-(1'- <i>rac</i> -Glycerol)
POPS	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phospho-L- Serin
PS	Phosphatidylserin
Rab	Ras-verwandtes Protein im Gehirn
Rad	Ras-verwandtes diabetesassoziiertes Protein
Raf	Ratten-Fibrosarkom-Protein
RAIRS	Reflexions-Absorptions-Infrarot-Spektroskopie
Ran	Ras-verwandtes nukleäres Protein
Ras	Ratten Adenosarkom-Protein
Rho	Ras-homologes Protein
rIAPP	Ratten Insel-Amyloides Polypeptid
RIN-m5F	β -Zelllinie
Rit	Ras-ähnliches Protein in Gewebe
RU	Resonanz Einheit
SDS	Natriumdodekylsulfat
SM	Sphingomyelin
s_o	Feste Phase

Sos	<i>Son Of Sevenless</i>
SPR	Oberflächenplasmonresonanz
SUV	Kleine unilamellare Vesikel
Texas Red-DHPE	Texas Red® 1,2-Dihexadecanoyl- <i>sn</i> -Glycero-3- Phosphoethanolamin
TFE	Trifluoethanol
ThT	Thioflavin T
T _m	Hauptphasenübergangstemperatur
T _{mix}	Mischphasenübergangstemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
vps-Protein	vakuoläres Proteinsortierung-Protein

7 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Professor Winter für die interessante Fragestellung, den anregenden Diskussionen und der Freiheit bei der Durchführung dieser Arbeit herzlich bedanken.

Herrn Professor Mootz danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Zudem danke ich Dr. Claus Czeslik und Dr. Werner Horstmann für die wertvolle Unterstützung und Beantwortung unzähliger Fragen bei der Etablierung der FCS und des Zelllabors im Institut.

Für die Hilfe und Beantwortung zahlreicher Fragen hinsichtlich des Aufbau der SPR danke ich Herrn Dr. Uwe Bierfreund, Herrn Grodd und Herrn von Känel von GE-Healthcare.

Dr. Oliver Holub, Dr. Christian Hellriegel, Dr. Michelle Digiman und Professor Enrico Gratton danke ich für die Einarbeitung und spätere Hilfe bei der Erlernung der FCS.

Für die gute Zusammenarbeit und Bereitstellung der Ras-Proteine danke ich Dr. Gemma Triola, Dr. Sebastian Koch Christine Nowak und Herrn Professor Waldmann.

Dr. Annette Meister, Dr. Andrea Kerth, und Herrn Prof. Blume danke ich für die Einführung in die Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie.

Der IMPRS des MPI Dortmund danke ich für die Möglichkeit an Ihrem Programm teilzunehmen und die finanzielle Unterstützung.

Herrn Maier von Bruker und Herrn Dr. Riegler von Riegler & Kirstein danke ich für die Hilfe beim Aufbau des IRRAS.

Dr. Dirk Pendzialek und Herrn Dr. Rauh danke ich für die Unterstützung beim Aufbau des Zelllabors.

Desweiteren danke ich Dr. Amyelt Itzen, Dr. Uyen Nguyen und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Geyer vom MPI, Dortmund für die allgemeine Hilfsbereitschaft und die lustigen Abende.

Bei Herrn Professor Maechler möchte ich mich für die Bereitstellung der Zelllinie INS-1E bedanken.

Bei den Mitarbeitern der Feinmechanik- und Elektronik-Werkstatt der TU Dortmund bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft und für die gute Zusammenarbeit.

Meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Winter möchte ich ganz herzlich danken für die gute Stimmung während der Arbeit und ihrer großen Hilfsbereitschaft. Hierbei gilt besonderer Dank an Alexander Werkmüller, Andrea Kreusel, Dr. Daniel Sellin, Christian Reichhart, Dr. Diana Radovan, Christoph Jeworrek, Kirsten Skodzik, Simone Möbitz, Shobna Kapoor, Dr. Roland Krivanek und Dr. Katrin Weise.

Ich möchte vor allem meinen Freunden und meiner Familie danken, die mich immer wieder aufgemuntert und tatkräftig unterstützt haben.

Schließlich danke ich Florian dafür, dass er mich so gern hat wie ich bin und für seine immerwährende liebevolle Unterstützung.

8 Lebenslauf und Publikationen

Persönliche Daten:

Familienname:	Gohlke
Vorname:	Andrea
Geburtsdatum:	04.05.1981
Geburtsort:	Uelzen
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Beruflicher Werdegang:

08.1988 – 06.1992	Besuch der Herrmann-Löns Grundschule in Uelzen
08.1992 – 07.1994	Besuch der Orientierungsstufe Hermann Löns Schule in Uelzen
09.1994 – 06.2001	Besuch des Herzog-Ernst Gymnasiums in Uelzen Abschluss: Abitur
10.2001 – 09.2004	Bachelor-Studium „Molekulare Biotechnologie“ an der Universität zu Lübeck (Abschluss: Bachelor of Science)
10.2004 – 10.2006	Master-Studium „Molecular Life Science“ an der Universität zu Lübeck (Abschluss: Master of Science)
11.2006 - heute	Doktorarbeit im Institut für physikalische Chemie an der TU Dortmund, Dortmund (Voraussichtlicher Abschluss: Dr. rer. nat.)

Publikationen:

D. H. J. Lopes, A. Meister, **A. Gohlke**, A. Hauser, A. Blume, R. Winter, *Mechanism of islet amyloid polypeptide fibrillation at lipid interfaces studied by infrared reflection absorption spectroscopy*. Biophys. J., 2007. **93**(9): p. 3132-41.

R. Mishra, D. Sellin, D. Radovan, **A. Gohlke**, R. Winter, *Inhibiting islet amyloid polypeptide fibril formation by the red wine compound resveratrol*. ChemBioChem, 2009. **10**(3): p. 445-9.

A. Gohlke, G. Triola, H. Waldmann, R. Winter, *Influence of the Lipid Anchor Motif of N-Ras on the Interaction with Lipid Membranes – a Surface Plasmon Resonance Study*. Biophys. J., accepted.

K. Weise, D. Radovan, **A. Gohlke**, N. Opitz, R. Winter, *Interaction of hIAPP with Model Raft Membranes and Pancreatic beta-cells: Cytotoxicity of hIAPP Oligomers*. ChemBioChem, accepted.

Mitgliedschaften:

Internationale Max Planck Research School (IMPRS) in Chemischer Biologie am Max Planck Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund

Bunsen-Gesellschaft

Preise:

Posterpreis: Tag der Chemie 2010, am 05.02.2010 an der TU Dortmund, Dortmund

9 Anhang

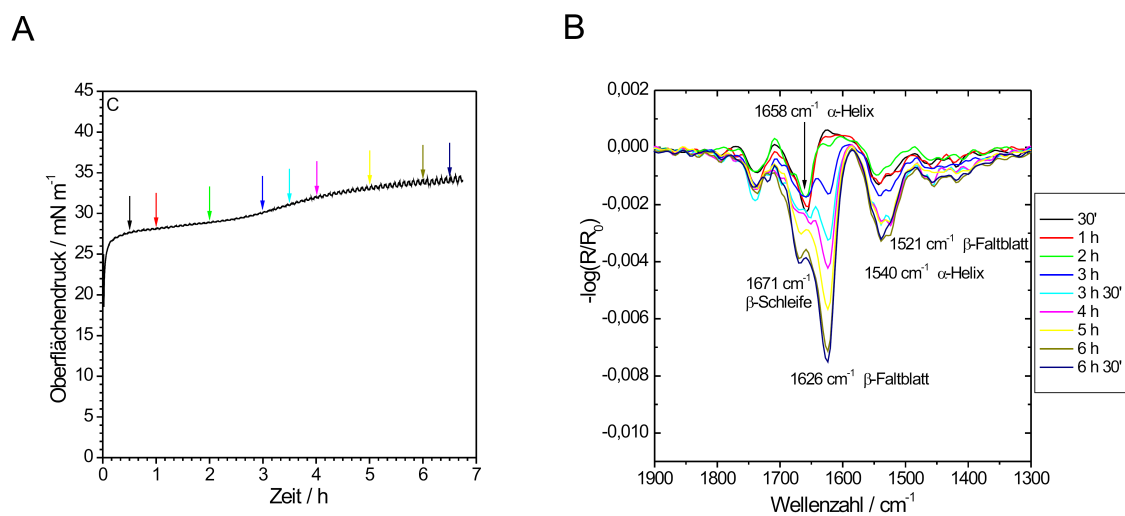


Abb. 9.57: Zeitliche Änderung des Oberflächendrucks (A) und IRRA-Spektren (40°, p-polarisiert) (B) bei Adsorption von 1 μM hIAPP an der POPG-Monoschicht (πAnfang: 20 mN/m). Die farbigen Pfeile in (A) geben die jeweiligen Zeitpunkte der IRRA-Spektren in (B) an.

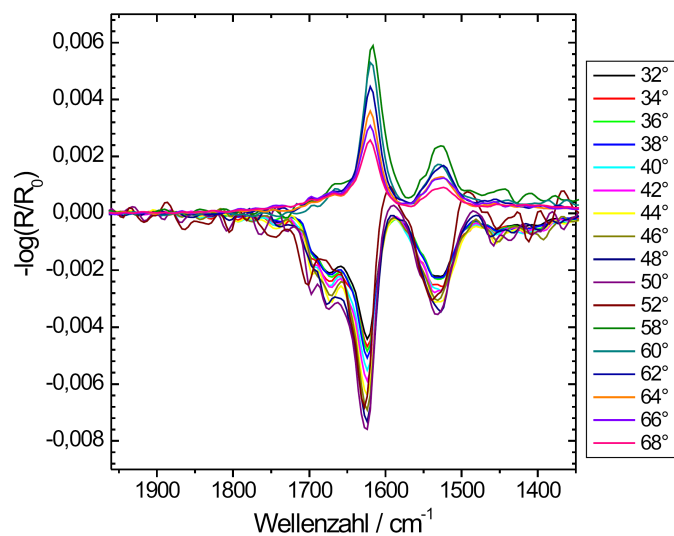


Abb. 9.58: p-polarisierte IRRA-Spektren von 1 μM hIAPP adsorbiert an einer Luft/D₂O-Grenzfläche (verschiedene Einfallswinkel).

Tabelle 9.2: Zusammenfassung aller kinetischen Konstanten bezogen auf die Wechselwirkung verschiedener N-Ras Lipoproteine mit verschiedenen Modellmembranen erhalten aus SPR-Messungen.

	$k_{\text{on},1} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$k_{\text{on},2} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{off},1} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{off},2} / \text{s}^{-1}$
DOPC				
Far GDP	$2.57 \cdot 10^5 \pm 1.09 \cdot 10^5$	$4.57 \cdot 10^{-3} \pm 1.89 \cdot 10^{-3}$	$4.01 \cdot 10^{-2} \pm 8.00 \cdot 10^{-3}$	$1.11 \cdot 10^{-3} \pm 2.30 \cdot 10^{-4}$
HD/Far GDP	$3.41 \cdot 10^3 \pm 7.60 \cdot 10^2$	$5.09 \cdot 10^{-3} \pm 3.14 \cdot 10^{-3}$	$1.20 \cdot 10^{-3} \pm 6.04 \cdot 10^{-4}$	$4.52 \cdot 10^{-4} \pm 2.20 \cdot 10^{-4}$
HD/Far GTP	$6.00 \cdot 10^4 \pm 2.31 \cdot 10^4$	$3.81 \cdot 10^{-5} \pm 2.11 \cdot 10^{-5}$	$1.99 \cdot 10^{-3} \pm 6.87 \cdot 10^{-4}$	$6.51 \cdot 10^{-6} \pm 4.56 \cdot 10^{-6}$
HD/HD GDP	$7.02 \cdot 10^4 \pm 2.22 \cdot 10^4$	$3.07 \cdot 10^{-7} \pm 1.00 \cdot 10^{-7}$	$3.62 \cdot 10^{-3} \pm 2.78 \cdot 10^{-4}$	$1.18 \cdot 10^{-4} \pm 1.17 \cdot 10^{-5}$
Far/Far GDP	$5.88 \cdot 10^4 \pm 2.08 \cdot 10^4$	$2.69 \cdot 10^{-3} \pm 3.54 \cdot 10^{-4}$	$1.1 \cdot 10^{-3} \pm 2.31 \cdot 10^{-4}$	$6.04 \cdot 10^{-4} \pm 1.40 \cdot 10^{-4}$
DPPC/Chol (7:3)				
Far GDP	$8.17 \cdot 10^4 \pm 1.52 \cdot 10^4$	$3.53 \cdot 10^{-3} \pm 4.44 \cdot 10^{-4}$	$2.71 \cdot 10^{-3} \pm 1.59 \cdot 10^{-3}$	$5.54 \cdot 10^{-4} \pm 1.88 \cdot 10^{-4}$
HD/Far GDP	$1.48 \cdot 10^5 \pm 1.11 \cdot 10^4$	$1.70 \cdot 10^{-3} \pm 8.67 \cdot 10^{-4}$	$6.81 \cdot 10^{-3} \pm 1.82 \cdot 10^{-3}$	$6.65 \cdot 10^{-4} \pm 2.25 \cdot 10^{-4}$
HD/Far GTP	$4.30 \cdot 10^4 \pm 7.59 \cdot 10^3$	$2.63 \cdot 10^{-3} \pm 1.18 \cdot 10^{-3}$	$1.83 \cdot 10^{-2} \pm 3.55 \cdot 10^{-3}$	$1.41 \cdot 10^{-4} \pm 1.35 \cdot 10^{-4}$
HD/HD GDP	$4.11 \cdot 10^4 \pm 1.16 \cdot 10^4$	$9.54 \cdot 10^{-4} \pm 2.64 \cdot 10^{-4}$	$2.34 \cdot 10^{-2} \pm 5.63 \cdot 10^{-3}$	$7.56 \cdot 10^{-7} \pm 5.70 \cdot 10^{-7}$
Far/Far GDP	$4.11 \cdot 10^5 \pm 8.67 \cdot 10^4$	$1.75 \cdot 10^{-3} \pm 1.65 \cdot 10^{-4}$	$1.86 \cdot 10^{-2} \pm 4.83 \cdot 10^{-3}$	$3.25 \cdot 10^{-4} \pm 1.60 \cdot 10^{-4}$
DOPC/DPPC/Chol (1:2:1)				
Far GDP	$1.06 \cdot 10^5 \pm 6.15 \cdot 10^4$	$1.40 \cdot 10^{-6} \pm 1.21 \cdot 10^{-6}$	$9.20 \cdot 10^{-4} \pm 1.39 \cdot 10^{-4}$	$1.63 \cdot 10^{-5} \pm 5.11 \cdot 10^{-6}$
HD/Far GDP	$9.88 \cdot 10^4 \pm 3.37 \cdot 10^4$	$2.56 \cdot 10^{-3} \pm 1.34 \cdot 10^{-3}$	$9.36 \cdot 10^{-4} \pm 6.43 \cdot 10^{-4}$	$4.38 \cdot 10^{-4} \pm 2.14 \cdot 10^{-4}$
HD/Far GTP	$3.69 \cdot 10^4 \pm 9.83 \cdot 10^3$	$7.37 \cdot 10^{-4} \pm 5.09 \cdot 10^{-4}$	$3.50 \cdot 10^{-3} \pm 4.91 \cdot 10^{-4}$	$3.10 \cdot 10^{-7} \pm 1.28 \cdot 10^{-7}$
HD/HD GDP	$5.21 \cdot 10^4 \pm 1.11 \cdot 10^4$	$4.37 \cdot 10^{-4} \pm 2.71 \cdot 10^{-4}$	$7.41 \cdot 10^{-3} \pm 3.82 \cdot 10^{-3}$	$3.02 \cdot 10^{-7} \pm 9.95 \cdot 10^{-8}$
Far/Far GDP	$1.63 \cdot 10^5 \pm 7.97 \cdot 10^4$	$1.78 \cdot 10^{-3} \pm 4.18 \cdot 10^{-4}$	$1.11 \cdot 10^{-3} \pm 3.17 \cdot 10^{-4}$	$6.36 \cdot 10^{-4} \pm 1.84 \cdot 10^{-4}$
DOPC/DOPG (7:3)				
Far GDP	$1.72 \cdot 10^5 \pm 7.36 \cdot 10^4$	$1.84 \cdot 10^{-4} \pm 1.21 \cdot 10^{-4}$	$3.54 \cdot 10^{-3} \pm 1.75 \cdot 10^{-4}$	$4.32 \cdot 10^{-6} \pm 3.61 \cdot 10^{-6}$
HD/Far GDP	$6.26 \cdot 10^3 \pm 3.67 \cdot 10^3$	$2.79 \cdot 10^{-3} \pm 1.43 \cdot 10^{-3}$	$8.21 \cdot 10^{-4} \pm 3.37 \cdot 10^{-4}$	$4.07 \cdot 10^{-4} \pm 2.00 \cdot 10^{-4}$
HD/Far GTP	$4.52 \cdot 10^4 \pm 2.16 \cdot 10^4$	$6.14 \cdot 10^{-4} \pm 1.63 \cdot 10^{-4}$	$5.00 \cdot 10^{-3} \pm 3.47 \cdot 10^{-4}$	$3.78 \cdot 10^{-7} \pm 1.56 \cdot 10^{-7}$
HD/HD GDP	$6.71 \cdot 10^4 \pm 1.51 \cdot 10^4$	$2.83 \cdot 10^{-4} \pm 9.91 \cdot 10^{-5}$	$1.07 \cdot 10^{-2} \pm 3.77 \cdot 10^{-3}$	$4.47 \cdot 10^{-6} \pm 2.63 \cdot 10^{-6}$
Far/Far GDP	$8.09 \cdot 10^4 \pm 1.42 \cdot 10^4$	$1.88 \cdot 10^{-3} \pm 1.98 \cdot 10^{-4}$	$1.49 \cdot 10^{-3} \pm 2.14 \cdot 10^{-4}$	$9.06 \cdot 10^{-4} \pm 5.80 \cdot 10^{-5}$
DOPC/DOPE (7:3)				
Far GDP	$2.80 \cdot 10^5 \pm 7.07 \cdot 10^4$	$1.61 \cdot 10^{-3} \pm 1.05 \cdot 10^{-3}$	$1.09 \cdot 10^{-2} \pm 4.18 \cdot 10^{-3}$	$5.54 \cdot 10^{-4} \pm 1.65 \cdot 10^{-4}$
HD/Far GDP	$5.00 \cdot 10^3 \pm 3.41 \cdot 10^3$	$1.21 \cdot 10^{-3} \pm 2.35 \cdot 10^{-4}$	$3.50 \cdot 10^{-4} \pm 1.26 \cdot 10^{-4}$	$9.53 \cdot 10^{-6} \pm 2.26 \cdot 10^{-6}$
HD/Far GTP	$8.19 \cdot 10^4 \pm 3.50 \cdot 10^4$	$9.35 \cdot 10^{-5} \pm 2.58 \cdot 10^{-5}$	$2.59 \cdot 10^{-3} \pm 2.91 \cdot 10^{-4}$	$6.87 \cdot 10^{-6} \pm 4.26 \cdot 10^{-6}$
HD/HD GDP	$4.88 \cdot 10^4 \pm 3.73 \cdot 10^3$	$5.02 \cdot 10^{-7} \pm 3.01 \cdot 10^{-7}$	$3.00 \cdot 10^{-3} \pm 3.97 \cdot 10^{-4}$	$2.27 \cdot 10^{-5} \pm 1.04 \cdot 10^{-5}$
Far/Far GDP	$1.15 \cdot 10^5 \pm 2.55 \cdot 10^4$	$2.84 \cdot 10^{-3} \pm 3.54 \cdot 10^{-4}$	$1.89 \cdot 10^{-3} \pm 4.22 \cdot 10^{-4}$	$7.19 \cdot 10^{-4} \pm 1.26 \cdot 10^{-4}$