

BIOPHYSIKALISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR  
RAS-MEMBRAN-WECHSELWIRKUNG

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt von

**BENJAMIN SPERLICH**

Geboren am 22. Oktober 1986 in Bochum

Eingereicht bei der  
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie  
der Technischen Universität Dortmund

Dortmund  
12. Juni 2016



Für meine Eltern.



„Es kommt nicht darauf an, mit dem Kopf durch die Wand zu rennen, sondern mit den Augen die Tür zu finden.“

Werner von Siemens (1816 - 1892)



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2013 bis Juni 2016 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I (Biophysikalische Chemie) der Technischen Universität Dortmund unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. R. Winter angefertigt.

Prüfungskommission:

Prof. Dr. R. Winter (Erstgutachter)

Prof. Dr. H. Rehage (Zweitgutachter)



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre Hilfe und Unterstützung dazu beigetragen haben, dass ich diese Arbeit anfertigen konnte.

Als erstes möchte ich mich recht herzlich bei **Herrn Prof. Dr. Roland Winter** für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit und für die gesamte Unterstützung während der Promotion bedanken. Außerdem möchte ich mich für die verschiedenen Möglichkeiten bedanken, die es mir ermöglicht haben mit unterschiedlichen biophysikalischen Methoden meine Arbeit anfertigen zu können. Desweiteren möchte ich mich für die verschiedenen Tagungsaufenthalte bedanken. Insbesondere für die Teilnahme an der Tagung *Biophysical Society*, es war sehr interessant und schön einige Personen da wiederzusehen.

Ebenso danke ich **Herrn Prof. Dr. Heinz Rehage** für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Ein besonderer Dank gilt auch **Dr. Katrin Weise** für die Einarbeitung in die Rasterkraftmikroskopie und die kritischen sowie konstruktiven Diskussionen während der gesamten Promotion.

Mein weiterer großer Dank gilt **Simone Möbitz**. Ich bedanke mich für die Einarbeitung in die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie aber auch für die große Unterstützung im Laboralltag (insbesondere bei den biochemischen Methoden). Unsere „philosophischen Fußballfachgespräche“ über den BVB und auch die gemeinsamen Stadionbesuche haben mir immer sehr viel Spaß bereitet. Danke dafür.

Desweiteren möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Claus Czeslik** und **Herrn Dr. Mirko Erlkamp** für die nette Atmosphäre während unserem Aufenthalt in Baltimore, USA (*Biophysical Society Meeting*) bedanken. **Herrn Prof. Dr. Claus Czeslik** danke ich zusätzlich für das Lesen der Arbeit.

**Frau Andrea Kreusel** danke ich für die stetige Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Bürokollegen, **Herrn Dr. Saba Suladze** und **Frau Bertina Schuppan** bedanken, die den Arbeitsalltag erleichtert haben.

Für die immer gute und kollegitive Arbeitsatmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe möchte ich mich bei **allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls Physikalische Chemie I** bedanken.

Außerdem bin ich sehr dankbar, ein Mitglied des **SFB 642** sein zu dürfen, was mir die Möglichkeit gegeben hat, an sehr lehrreichen Tagungen und Diskussionen teilhaben zu dürfen. Auch für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich recht herzlich.

Zusätzlich möchte ich mich bei meinen Weggefährten und Freunden, **Dr. Christian Völlmecke** und **Dr. Dominik Beyer** für das Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Meiner Freundin **Sonja Benning** danke ich für ihr großes Verständnis und für aufmunternden Worte in jeder Situation. Einfach nur Danke.

Nun möchte ich mich bei **meiner Familie** bedanken. Vielen Dank für eure Unterstützung. Insbesondere **meinen Eltern** möchte ich meinen größten Dank aussprechen, für die unermüdliche Unterstützung auf meinem Weg. Ihr seid die besten Eltern, die man sich nur vorstellen kann. Danke.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Membransysteme	5
1.2	Ras - Die kleine GTPase	13
1.3	Calmodulin - Ein Calcium-bindendes Protein	19
1.4	Rheb - Eine weitere kleine GTPase	25
1.5	CLR01 - Ein molekularer <i>Tweezer</i>	33
1.6	PLA2 - Eine Phospholipase	35
<b>2</b>	<b>Experimentelle Methoden</b>	<b>41</b>
2.1	Materialien	41
2.2	Lipidvesikel Präparation	45
2.3	Proteinbiochemische Methoden	46
2.3.1	Proteinexpression von Rheb	46
2.3.2	Proteinaufreinigung von Rheb	46
2.3.3	<i>In vitro</i> Farnesylierung von Rheb	47
2.3.4	Triton X-114-Extraktion von <i>in vitro</i> farnesyliertem Rheb	47
2.3.5	Enzymatisches Abschneiden des GST- <i>Tags</i> von Rheb	49
2.3.6	SDS-PAGE	50
2.4	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie	51
2.4.1	Theoretischer Hintergrund	51
2.4.2	Praktische Durchführung	55
2.5	Rasterkraftmikroskopie	59
2.5.1	Theoretischer Hintergrund	59
2.5.2	Praktische Durchführung	67

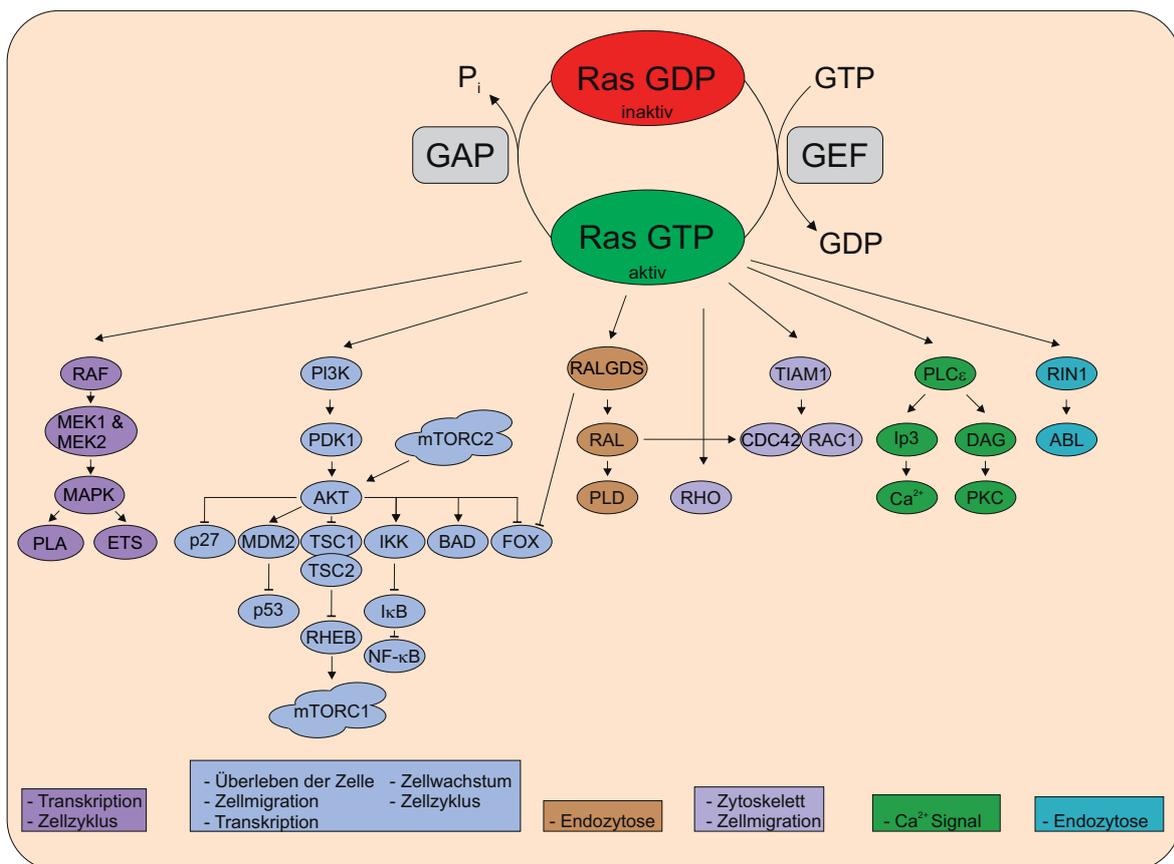
2.6	Fluoreszenzanisotropie . . . . .	69
2.6.1	Theoretischer Hintergrund . . . . .	69
2.6.2	Praktische Durchführung . . . . .	74
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion . . . . .</b>	<b>79</b>
3.1	Interaktion zwischen Calmodulin und K-Ras4B in einem Membransystem	79
3.2	Rasterkraftmikroskopische-Untersuchungen von K-Ras4B an Membransystemen mit verschiedenen Anteilen an Phosphatidylserin . . . . .	98
3.3	Wechselwirkung zwischen dem molekularen <i>Tweezer</i> CLR01 und einem Membransystem . . . . .	109
3.4	Rasterkraftmikroskopische-Untersuchungen von Phospholipase A2 mit einem Membransystem . . . . .	112
3.5	Proteinexpression und <i>in vitro</i> Farnesylierung von Rheb . . . . .	116
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung . . . . .</b>	<b>127</b>
<b>5</b>	<b>Summary . . . . .</b>	<b>129</b>
	<b>Literaturverzeichnis . . . . .</b>	<b>I</b>
	<b>Veröffentlichungen . . . . .</b>	<b>XXVII</b>
	Publikationen . . . . .	XXVII
	Konferenzbeiträge . . . . .	XXVIII

# 1 Einleitung

– „*Eliminate suffering and death from cancer by 2015.*“ Andrew von Eschenbach, 2003 (12. Direktor *National Cancer Institute*)[1] –

Die Basis jeder Naturwissenschaft bildet die Grundlagenforschung, welche für eine stetige Entwicklung von Wirtschaft und Gesellschaft sorgt. Dabei werden in der biophysikalischen Chemie eine Reihe von modernen Techniken für die Untersuchung von verschiedenen Molekülen genutzt und weiter entwickelt. Ziel dabei ist es immer wieder die zellbiologischen Prozesse innerhalb einer lebenden Zelle weiter zu verstehen. In den 60er-Jahren begann die Isolation und Identifikation der ersten *ras*-Gene aus leukämischen Retroviren (*ras = rat sarcoma*). Jahre später wurden das humane Onkogen und die verschiedenen Effektoren entdeckt. Der Zusammenhang zwischen der Krebsentwicklung und den Ras-Proteinen wurde erst am Ende des letzten bzw. am Anfang des neuen Jahrtausends definiert.[2] Ein großer Schritt im Kampf gegen Krebs wurde im Dezember 1971 durch die Unterzeichnung des "*National Cancer Act*" durch den US-Präsidenten Richard Nixon eingeleitet, der durch eine Investition von etwa 90 Milliarden US-Dollar zur Förderung der Forschung und Behandlung von Krebs diente.[2, 3] Seit den 1970er-Jahren ist die relative Überlebenswahrscheinlichkeit bei einer Krebserkrankung um etwa 70% angestiegen.[2] 1989 erhielten Harold Elliot Varmus und John Michael Bishop den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin „für ihre Entdeckung des zellulären Ursprungs retroviraler Onkogene“ (erstes humanes Onkogen *c-Src*).[4] Trotz aller Erfolge kann der „Kreuzzug gegen den Krebs“ ("*War on Cancer*") nicht als beendet erklärt werden.[3, 5] Weltweit gesehen ist laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) Lungenkrebs die fünfthäufigste Todesursache mit 1,6 Millionen Toten (bezogen auf das Jahr 2012).[6] In Deutschland zählt laut statistischem Bundesamt

(Destatis) Krebs sogar zu der zweithäufigsten Todesursache (Lungen- und Bronchialkrebs bei Männern; Brustdrüsenkrebs bei Frauen ist die vierthäufigste Todesursache bezogen auf das Jahr 2012).[7] Mitverantwortlich für das Krebswachstum ist das Protoonkogen *ras*, welches in etwa jedem dritten Tumor mutiert vorliegt und mit hohem Anteil in Bauchspeicheldrüsen- (90%), Darm- (50%), Lungen- (30%), Schilddrüsenkrebs (50%) und bei myeloischer Leukämie (30%) vorkommt.[8] Als Protoonkogene werden Gene bezeichnet, die durch eine Mutation zu Onkogenen werden, die wiederum für veränderte Proteine kodieren können. Die translatierten fehlregulierten Proteine beeinflussen im weiteren den Zellzyklus. Die Komplexität des Signaltransduktionswegs des Ras-Proteins und seiner Effektoren ist in Abbildung 1.1 dargestellt.[9] Dabei ist zu erkennen, dass Ras nicht nur mit seinen verschiedenen Effektoren interagiert, sondern diese auch unterschiedliche Zellzyklen, wie zum Beispiel Apoptose oder Zellwachstum, stimulieren können.



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung des Signaltransduktionswegs von Ras in Säugetierzellen. Erstellt nach [9, 10].

---

Trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung sind bis heute nicht alle Zellprozesse zu hundert Prozent verstanden, insbesondere die Entstehung und Behandlung von Krankheiten sind sehr komplex. Ras als wichtiger Bestandteil bei Krebserkrankungen und Rheb als ein Effektormolekül des mTOR-Signaltransduktionsweges (*mamalian target of rapamycin*) und des TSC1/TSC2-Komplexes (*Tuberous Sclerosis Complex*) bilden zusammen einen Bereich der kleinen GTPasen, die in verschiedenen Krankheiten eine Rolle spielen, und somit ergeben sich auch hier Ansätze für potentielle Medikamente, die ein exaktes Verständnis auf molekularer Ebene nötig machen. Rheb als *immediate early gene* werden pro-apoptotische als auch anti-apoptotische Effekte in verschiedenen Organismen zugesprochen, die detailliert verstanden werden wollen.

Hier beginnt eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit: Wie interagiert Ras innerhalb der Zelle und welche Rückschlüsse lassen sich daraus ziehen? Dabei wurden verschiedene Methoden, wie die Rasterkraftmikroskopie, Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie und Fluoreszenzspektroskopie verwendet, um die komplexen Interaktionen zwischen Ras und seinen Partnern zu untersuchen. Nach den Untersuchungen zwischen Ras und PDE $\delta$  [11] wurde in dieser Arbeit ein weiterer Interaktionspartner von Ras verwendet, das Calcium-bindende Protein Calmodulin.

Außerdem wurden die Auswirkungen von Phosphatidylserin auf die Ras-Membran-Wechselwirkungen untersucht. Insbesondere die Rasterkraftmikroskopie diente dazu, einen genauen Einblick auf Nanometerskala zu erhalten.

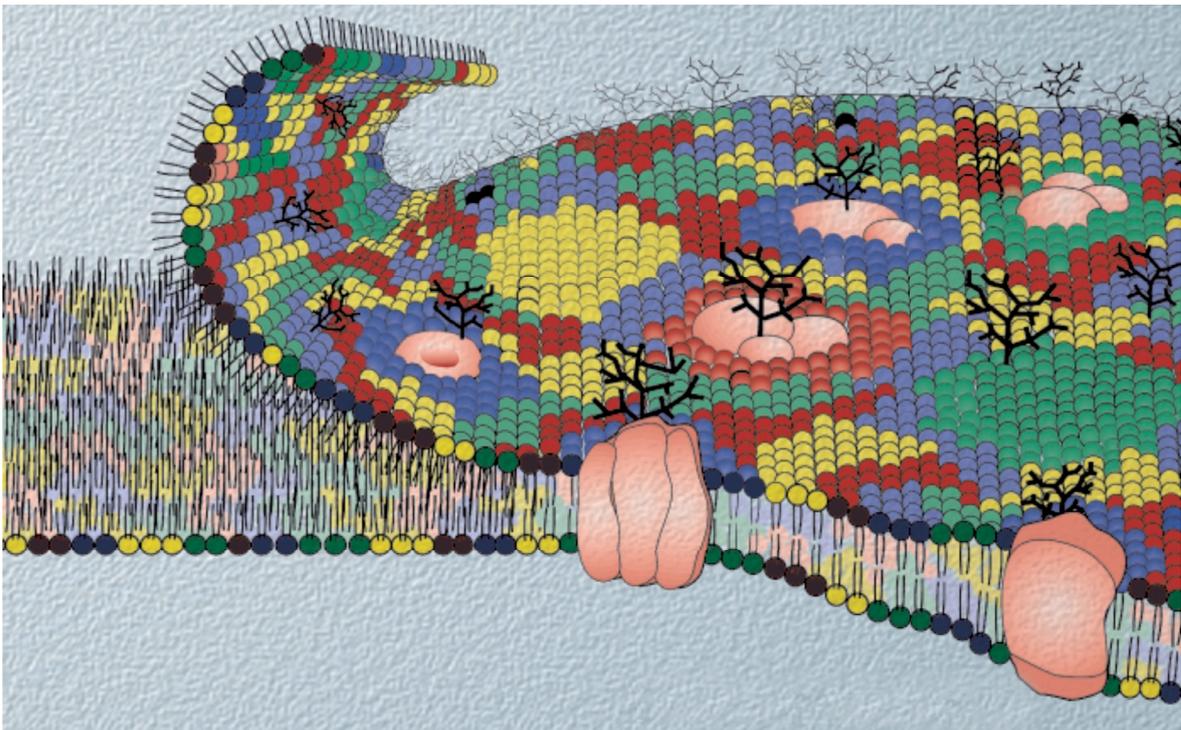
Der molekulare *Tweezer* CLR01 und die Phospholipase A2 waren ebenfalls interessante Forschungsobjekte. Die beiden Moleküle werden in den Zusammenhang gebracht, bei verschiedenen Krankheitsbildern (Phospholipase: Krebserkrankungen) eine entscheidende Rolle zu spielen bzw. als Ansatz für neue Medikamenten (CLR01: potentieller Inhibitor gegen die Aggregation und Toxizität von amyloidogenen Proteinen) zu dienen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die rekombinante Expression in *Escherichia coli* und die anschließende Farnesylierung von Rheb. Rheb benötigt für seine Funktion-

lität und die Membranbindung einen Farnesylanker. Da diese posttranslationale Modifikation nicht in prokaryotischen Expressionssystemen durchgeführt werden kann, wurde eine *in vitro* Farnesylierung durchgeführt. Eine Kombination aus prokaryotischen Expressionssystemen und anschließender Modifikationen der Proteine ist eine etablierte Methode. Vorteile sind die einfache Handhabung und die guten Ausbeuten. Eukaryotische Expressionssysteme liefern normalerweise geringere Ausbeuten und sind komplexer in ihrem Aufbau.

## 1.1 Membransysteme

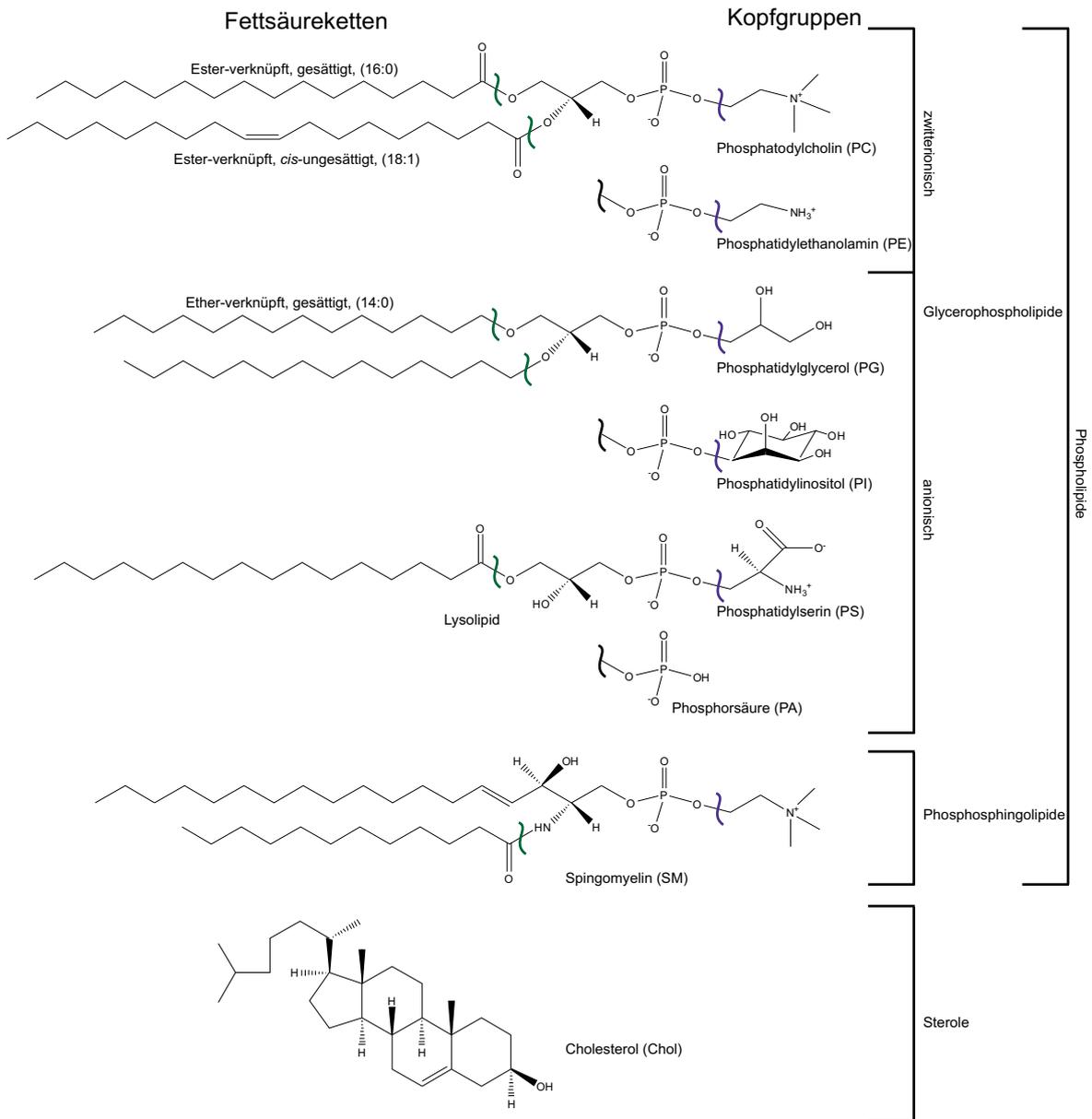
Biologische Membranen spielen eine essentielle Rolle im Zellzyklus, sie grenzen den intrazellulären von dem extrazellulären Raum ab und bilden so eine Permeabilitätsgrenze gegen äußere Einflüsse. Neben dem stabilisierenden Effekt, sorgen verschiedene Rezeptoren und Transportfaktoren für einen regulierten und kontrollierten Stoffaustausch.[12–15] Aufgrund der großen Bedeutung von Plasmamembranen wird in dem nächsten Abschnitt etwas genauer auf den Aufbau und die Eigenschaften der Zellmembran eingegangen. Bei der Abbildung 1.2 handelt es sich um eine durch P. Kinnunen [16] (bereitgestellt durch Kibron Inc., Helsinki, Finland) abgewandelte Darstellung des bekannten Flüssig-Mosaik-Membranmodells von Singer und Nicholson [17], welche die Komplexität der Membran verdeutlicht.



**Abbildung 1.2:** Das Flüssig-Mosaik-Membranmodell von Singer und Nicholson.[17] Die verschiedenen Lipide, peripheren und integralen Membranproteine sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Modifiziert von P. Kinnunen (Universität von Helsinki, Finnland).[16]

Die typischen bakteriellen Phospholipide sind Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin (CL), welches auch in Eukaryonten gefunden wurde. Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylinositol (PI)

sind die anderen Hauptlipide in Eukaryonten. Der strukturelle Aufbau der verschiedenen Lipide ist in Abbildung 1.3 dargestellt. Die Plasmamembran von Leberzellen war die erste isolierte Membran und ist auch die am meisten untersuchte Zellmembran.[18] Die Kopfgruppenzusammensetzung der Phospholipide ist in *E. coli* unter Wachstumsbedingungen relativ gleichbleibend. Für Phosphatidylethanolamin liegt der Anteil bei 70 bis 80 %, für Phosphatidylglycerol bei 20 bis 25 % und für Cardiolipin bei 5 % oder weniger. Nur der Anteil an Cardiolipin ändert sich auf Kosten von Phosphatidylglycerol wenn die Zellen die Stationäre Phase erreichen. In den meisten Membransystemen sind die geladenen Phospholipide zwitterionisch (oder ungeladene Diacylglycerol Zucker), weniger als 30 % der Membranphospholipide sind anionisch. Die zwitterionischen Phospholipide wie Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin sind der Hauptbestandteil der Membranlipide von Eukaryoten, gram-negativen Bakterien und von vielen gram-positiven Bakterien.[14]



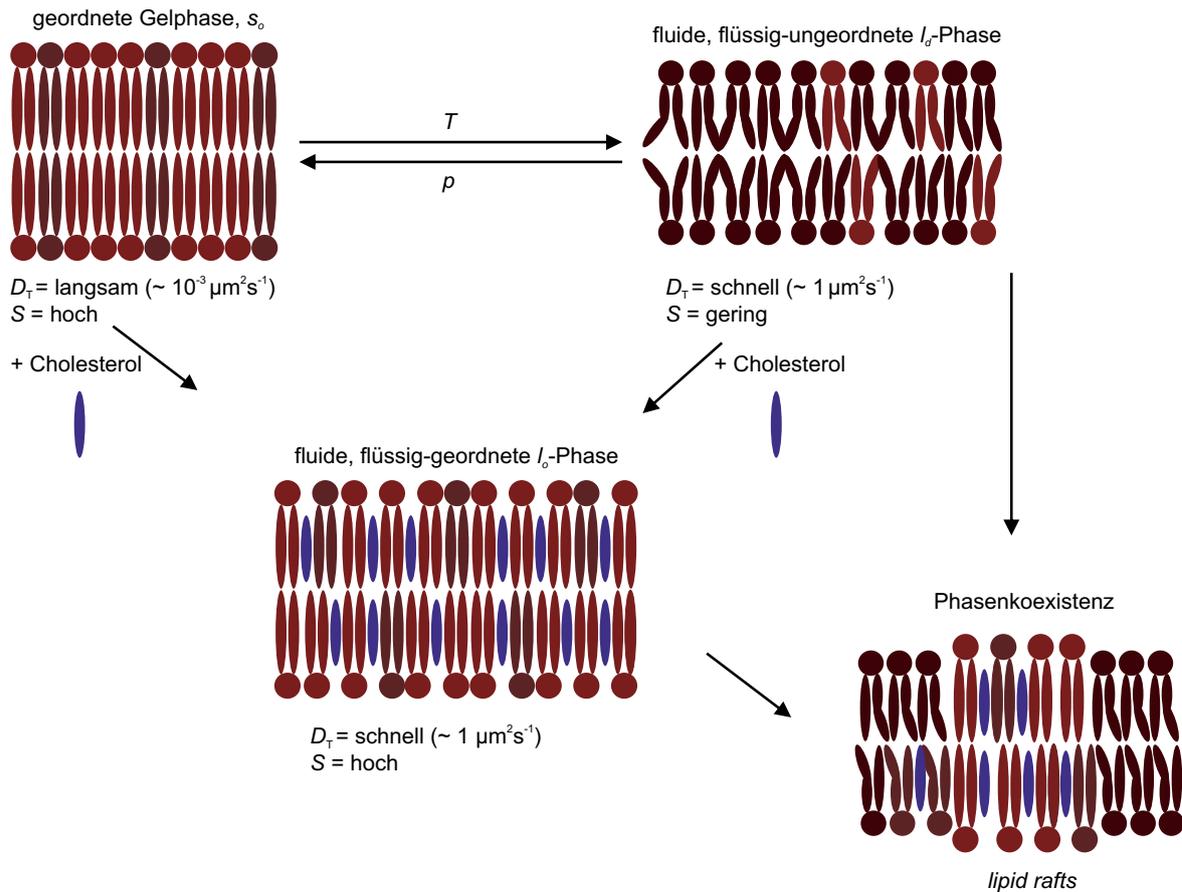
**Abbildung 1.3:** Strukturformeln der Phospholipide. Die Unterteilung erfolgt in Glycerophospholipide, Phosphosphingolipide und Sterole. In grün sind die Fettsäureketten und in blau die Kopfgruppen der Phospholipide dargestellt. Phosphatidylcholin ist die Hauptklasse der Lipide. Alle Phosphatidylcholone teilen sich die gleiche Phosphorylcholin-Kopfgruppe an Position *sn-3* des Glycerol-Rückgrats. Die Individualität kommt durch die unterschiedliche Anzahl an Kohlenstoffatomen und Doppelbindungen zustande. Dabei sind die Gruppen mit dem Glycerol-Rückgrat über eine Ester- oder an Position *sn-1* über eine Ether- oder Enyl-Bindung verknüpft. Erstellt nach [15, 19] mit ChemBioDraw Ultra 12.0.

Die zwei Fettsäureketten und die große polare Kopfgruppe von Phosphatidylcholin sorgen für eine zylindrische Form. Eine dichte Packung der Lipidketten wird durch Freisetzen von Hydratwasser entropisch favorisiert (hydrophober Effekt). Phosphatidylcholin

hat normalerweise eine gesättigte und eine ungesättigte Kohlenwasserstoffkette und bildet fluide flüssig-kristalline Membranen aus (Abbildung 1.4). Die meisten Phosphatidylethanolamine, die in biologischen Membranen gefunden wurden, haben eine kegelförmige Struktur und bilden selbst keine Lipiddoppelschichten. Diese Eigenschaft von Phosphatidylethanolamin ist essentiell für die funktionelle Einbindung von Membranproteinen und für Prozesse wie Membranfusionen.[13] Der Einbau von Phosphatidylethanolamin in Phosphatidylcholin Doppelschichten erhöht den Krümmungsstress der Membran, welcher für die Vesikelbildung genutzt wird.[15, 20] Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin besitzen entlang ihrer Kopfgruppen ein Dipolmoment, das durch das elektrochemische Membranpotential orientiert ist.[14]

Die Neigung der hydrophoben Bereiche zur Assoziation (entropischer Effekt durch Wasser) und die Tendenz der hydrophilen Bereiche zur Interaktion mit der wässrigen Umgebung sind das physikalische Grundprinzip der spontanen Bildung von Membranen. Der hydrophobe Bereich der Phospholipide ist ein Diacylglycerol welches eine gesättigte oder *cis*-ungesättigte Fettsäurekette variabler Länge besitzt. Phosphatidylcholin macht mehr als 50 % der Phospholipide in den meisten eukaryotischen Membranen aus. Bei der spontanen Selbstausbildung von planaren Doppelschicht-Strukturen hat jedes Phosphatidylcholin eine nahezu zylindrische Geometrie. Die Lipidketten sind jeweils zueinander gerichtet und die polare Kopfgruppe interagiert mit der wässrigen Phase. Die meisten Phosphatidylcholone haben eine *cis*-ungesättigte Fettsäurekette, die dafür sorgt, dass Phosphatidylcholin bei Raumtemperatur eine fluide Phase ausbildet.[15] Die natürlichen Lipide in Zellmembranen neigen dazu, stabile lamellare Doppelschichten zu bilden. Dabei können sich die Doppelschichten zu periodisch 2- und 3-dimensionalen Strukturen zusammenlagern.[12]

Die Doppelschicht der Plasmamembran ist asymmetrisch aufgebaut. Die äußere Schicht enthält meistens Phosphatidylcholin und Sphingolipide, wohingegen die cytosolische Monoschicht aus Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphoinositiden besteht. Cholesterol kommt in beiden Lipidschichten vor. [12]



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung der verschiedenen lamellaren Lipidphasen. Oben links ist die geordnete Gelphase ( $s_o$ ) mit den Phospholipiden und den langen gesättigten Lipidketten dargestellt. Diese bilden sich bei tiefen Temperaturen oder hohen Drücken. Die flüssig-ungeordnete Phase ( $l_d$ ) bildet sich bei hohen Temperaturen und niedrigen Drücken besonders in Anwesenheit ungesättigter Lipidketten der Phospholipide. Die Einbindung von Sterolen in die Membransysteme hat die Bildung von flüssig-geordneten Phasen ( $l_o$ ) oder eine Phasenseparation (Phasenkoexistenz mit *lipid rafts*) zur Folge.  $D_T$  ist der Translationsdiffusionskoeffizient und  $S$  der Ordnungsparameter. Erstellt nach [14, 15, 19].

Phosphatidylethanolamin besitzt eine kleinere Kopfgruppe und hat eine besondere Eigenschaft, die es mit divalenten kationischen Cardiolipin-Komplexen teilt: es kann einen Übergang von der Doppelschicht zu einer Nicht-Doppelschicht vollführen, abhängig von der Länge und dem Grad der Sättigung der Acylketten und der Temperatur.[13, 14, 21] Bei neutraler Ladung können mitochondriale Cardiolipine auch eine Nicht-Lipiddoppelschicht-Struktur ausbilden.[13, 21]

Eine weitere Klasse der Lipide sind die Sphingolipide, bei denen der hydrophobe Teil aus Ceramid besteht. In Säugetierzellen kommen hauptsächlich Sphingomyelin und

Glykosphingolipid vor, die ein Mono-, Di- oder Oligosaccharid mit einem Glukosylceramid oder Galaktosylceramid besitzen. Ganglioside sind Glykosphingolipide mit einem terminalen Sialinsäurerest. Sphingolipide haben eine gesättigte (16 bis 32 Kohlenstoffatome) oder *trans*-ungesättigte Kohlenwasserstoffkette, die größere und schmalere zylindrische Strukturen ausbilden, als die Phosphatidylcholin-Lipide selber Kettenlänge. Variationen durch C2-Hydroxylierung oder eine C15-Doppelbindung sind nicht ungewöhnlich. Durch die dichtere Packung bilden sie eine feste oder geordnete Gelphase aus, die durch Sterole fluider gemacht wird. Beide Strukturen kommen in der Plasmamembran und in Endosomen vor. Die Plasmamembranen sind reich an Sphingolipiden und Sterolen, die eine dichtere Packung erlauben als Glycerolipide und widerstehen so eher mechanischem Stress.[15] Die Sphingolipide werden an der lumenalen Oberfläche der Golgi-Membran synthetisiert und sind auf der äußeren Seite der Plasmamembran lokalisiert. Wohingegen Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin in der cytosolischen Seite konzentriert sind. Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol kommen häufig im Endoplasmatischen Retikulum (ER) vor.[13, 15]

Sterole sind der wesentliche Bestandteil von Nicht-Doppelschicht-Lipiden in der Zellmembran. Cholesterol kommt in Säugetierzellen vor, wohingegen Ergosterol in Hefen dominiert. Sterole können alleine aber keine Doppelschicht-Phasen ausbilden, erst mit Doppelschicht-bildenden Lipiden bildet sich eine flüssig-geordnete Phase aus (Abbildung 1.4).[13, 15]

Einige natürliche Phospholipide bilden Nicht-Doppelschichten aus, die als reverse hexagonale  $H_{II}$ -Phasen bezeichnet werden. Die kleine polare Kopfgruppe ist mit einem großen hydrophoben Bereich gekoppelt, der für eine kegelförmige Struktur des Lipids sorgt. Die  $H_{II}$ -Phase bildet sich bei höheren Temperaturen aus und besitzt *cis*-ungesättigten Fettsäureketten. Der Einbau von Cholesterol sorgt für die charakteristische kegelförmige Struktur. Die Lipide der Doppelschichten haben einen unterschiedlichen intrinsischen Krümmungsradius, so dass eine Änderung der beiden Lipidtypen eine Änderung der physikalischen Eigenschaften der Membran zur Folge hat. Das  $H_{II}$ -Phasen-Potential für einen Phospholipidmix kann über die mittlere Temperatur  $T_{LH}$  für den Übergang von der lamellaren zur Nicht-Doppelschicht-Phase bestimmt werden. Je höher die  $T_{LH}$  ist, desto geringer ist das Potential, eine  $H_{II}$ -Phase auszubilden.[14]

Phosphatidylcholin ist in der Regel ein Doppelschicht-bildendes Lipid, dass nur Nicht-Doppelschicht-Strukturen unter extremen Bedingungen oder in Anwesenheit von Nicht-Doppelschicht ausbildenden Lipiden ausbildet. Cardiolipin und Phosphatidsäure bilden in Anwesenheit von divalenten Kationen unter physiologischen Bedingungen eine Nicht-Doppelschicht-Struktur aus.[14]

Lysophospholipide und Fettsäuren können mit anderen Bestandteilen der Lipiddoppelschicht gemischt werden, was aber zur Bildung von hexagonalen und kubischen Phasen führen kann. Die Phasenseparation ist abhängig von der Lipidzusammensetzung, von der Bindung von Ionen und Molekülen in der Membran und von dem Aggregationszustand der Membrankomponenten. Kleine Änderungen dieser Parameter beeinflussen das Phasenverhalten der Membran.[15]

Die Variation der Kopfgruppen und der aliphatischen Ketten erlaubt eine Existenz von mehr als 1000 verschiedenen Lipiden in eukaryotischen Zellen.[15, 22] Phosphatidylcholin und Cholesterol bilden eine Phasenkoexistenz mit der flüssig-geordneten und flüssig-ungeordneten Phase.[15, 23] Ein Modellbeispiel für die äußere Plasmamembranschicht ist ein Mix aus gesättigtem Phosphatidylcholin, zweifach-ungesättigtem Phosphatidylcholin und Cholesterol. Die innere Plasmamembranschicht wird oft mit einem Drei-Komponentenmix aus Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylserin mit einer gesättigten und ungesättigten Kohlenwasserstoffkette und mit Cholesterol nachgebildet.[15, 24–26]

In Modelldoppelschichtmembranen ist die spontane Rate der Lipidbewegung zwischen den Membranschichten (*flip-flop*, transversale Diffusion) für Phosphatidylcholinlipide sehr gering (Stunden bis Tage) und wird durch ihre Größe, Ladung und Polarität der Kopfgruppen reguliert.[15, 27, 28] Die Halbwertszeit für die Translokation von Glykosphingolipiden, beträgt Tage, jedoch für Ceramide, Diacylglycerol und Sterole nur Sekunden.[15, 29–32] Negativ geladene Lipide wie Fettsäuren, Phosphatidylglycerole und Phosphatidsäuren können schnell die Membranseite tauschen, wenn ihre Ladung durch einen geringen pH-Wert neutralisiert wird. Bei einem pH-Gradienten kommt es zu einer Anreicherung der Lipide auf einer Seite der Membran.[15, 33] In reinen Lipidmembranen wandert die polare Kopfgruppe der Phospholipide nicht durch das hydrophobe Membraninnere. Die Translokation von Phosphatidylcholin beträgt meh-

rere Stunden. P4-ATPasen, auch Flippasen genannt, ermöglichen die Translokation von Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin von der extrazellulären zur cytosolischen Schicht. Scramblasen können die Lipide in beiden Richtungen transportieren. Die Asymmetrie wird durch die Flippase aufrechterhalten, allerdings führt die Translokation der Lipide zu einer Membrankrümmung. ABC-Transporter oder auch Floppasen können die Phospholipide von der cytosolischen Seite zurück zur extrazellulären Seite führen. Die laterale Lipiddiffusion beträgt ca.  $1 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  und die Oberfläche von fusionierten Membranvesikeln ist ca.  $0,02 \mu\text{m}^2$  groß.[13]

Die Variabilität der biologischen Membranen ist nicht nur auf die unterschiedlichen Lipide zurückzuführen, sondern beruht auch auf der oben erwähnten Asymmetrie der beiden Lipidschichten und auf dem Ausbilden von so genannten *lipid rafts* (Abbildung 1.4). *Lipid rafts* sind dynamische Nanometer kleine Sterol- und Sphingolipid-reiche Domänen in der Membran.[12] Die Existenz dieser Phasenseparation konnte für Modellmembranen mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung gezeigt werden.[34–36] Die genaue physiologische Relevanz der *lipid rafts* in biologischen Membransystemen ist bisher nicht eindeutig geklärt. In der Literatur wird die Funktion dieser Domänen kontrovers diskutiert. Es gibt aber mehrere Untersuchungen, die zeigen, dass *lipid rafts* auch in der biologischen Zellmembran vorkommen und vermutlich eine essentielle Rolle bei der durch Protein induzierten Signalweiterleitung spielen könnten.[37–43]

Neben den einzelnen Membranlipiden sind in der Membrandoppelschicht auch integrale und periphere Membranproteine lokalisiert. Diese Membranproteine sind oftmals mit einem Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) oder durch Sterol-, Myristoyl-, Palmitoyl- oder Prenylgruppen modifiziert.[12] Proteine oder Peptide, die über eine  $\alpha$ -Helix mit der Membran interagieren, sind oftmals in der fluiden Phase lokalisiert. Bei der Phasenkoexistenz von flüssig-geordneter und flüssig-ungeordneter Phase findet die Protein-/Peptidlokalisation in der ungeordneten Lipidphase statt (Abbildung 1.4).[15, 44, 45] Ausnahmen sind Peptide der Caveolin-1-*scaffolding*-Domäne und ein paar Glykosylphosphatidylinositol-Anker-Proteine.[15, 46]

## 1.2 Ras - Die kleine GTPase

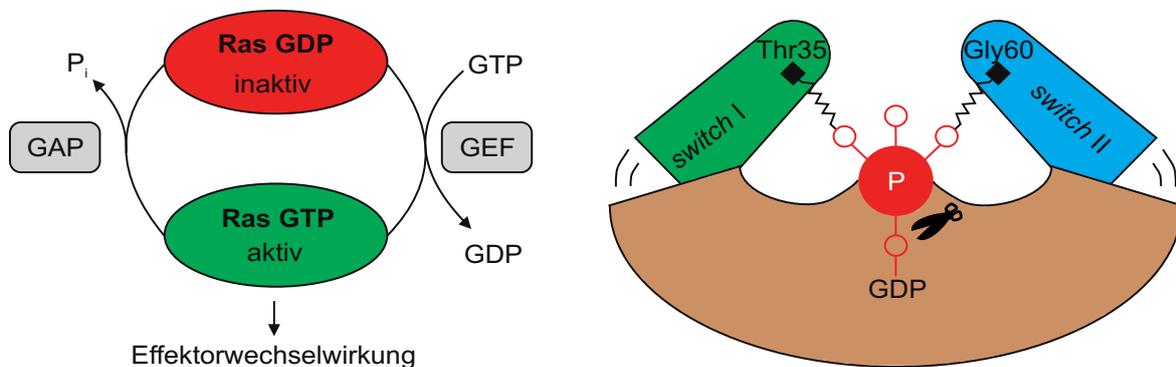
Krebs induzierende Gene, wie zum Beispiel *ras*, werden in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe umfasst die Tumorsuppressorgene. Die Inaktivierung dieser Gene durch Mutation oder Deletion fördert die Tumorentstehung. Die translatierten Proteine haben eine negativ regulierende Wirkung auf Zellprozesse (Zellteilung, DNA-Reparatur, Zelladhäsion, Apoptose). *Ras* zählt zu der zweiten Gruppe der Protoonkogene. Mutationen oder Gen-Amplifikationen sorgen für eine Aktivierung dieser Gene, welche die Entstehung von malignen Tumoren begünstigen.[47] Die *ras*-Gene wurden erstmals in Rattentumoren des Sarkom-Typs (*ras = rat sarcoma*) gefunden, die durch Retroviren begünstigt wurden.[48, 49] In Säugetierzellen sind drei *ras*-Gene bekannt, das H-Ras (Harvey), K-Ras4A und K-Ras4B (Kirsten) und das N-Ras (Neuroblastoma).[50] Untersuchungen haben gezeigt, dass schon eine einzige Mutation an der Position 12, 13 oder 61 zu der onkogenen Form führen kann.[8] Das Ras-Protein gehört zu der Unterfamilie der Ras-Superfamilie, die sich in insgesamt fünf Untergruppen (Tabelle 1.2) unterteilt. Vergleicht man die Primärstruktur der einzelnen Unterfamilien, fällt auf, dass eine relativ hohe Sequenzidentität (30 bis 50%) vorliegt.[51] Die Mitglieder der Superfamilie sind alle kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von 20 bis 25 kDa.[52] Die Proteingruppe der Guaninnukleotid-bindenden Proteine (GNBPs) lässt sich in zwei Untergruppen einteilen.[53] Die erste Untergruppe, zu der auch Ras gehört, ist die Klasse der *Translation Factors* (TRAFAC). Weitere Mitglieder dieser Gruppe sind Translationsfaktoren der Proteinbiosynthese, heterotrimere G-Proteine und ATPasen (Myosin und Kinesin). Als strukturelles Motiv besitzen alle Mitglieder ein sechssträngiges  $\beta$ -Faltblatt, bei dem der zweite Strang antiparallel angeordnet ist. Außerdem besitzen die Mitglieder der TRAFAC-Gruppe hochkonservierte Aminosäuren (Serin oder Threonin) im *Loop* zwischen Strang 2 und 3. Die zweite Gruppe werden als Signalerkennungspartikel (*signal recognition particle (SRP)*, *MinD*, *BloD (SIMIBI)*) bezeichnet. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen liegt ihrer Struktur. Die Mitglieder der SIMIBI-Gruppe haben nur ein paralleles siebensträngiges  $\beta$ -Faltblatt. Bekannte Vertreter sind GTPasen, MinD-like ATPasen (Proteinlokalisierung, Chromosomenteilung und Membrantransport), Kinasen und Phosphotransferasen.[53, 54] In der Tabelle 1.2 sind die

Mitglieder der Ras-Superfamilie mit den fünf dazugehörigen Untergruppen aufgelistet.

**Tabelle 1.1:** Unterfamilien der Ras-Superfamilie mit Beispielen.[51]

Unterfamilie	Mitglieder
Ras-Familie	z.B. H-, K-, N-Ras, Ral, Rheb, Rap1B
Rho-Familie	z.B. RhoA, RhoB, Rac1, Rho, CDC42
Rab-Familie	z.B. Rab1A, Rab1B
Sar1/Arf-Familie	z.B. Arf1, Sar1a, Arl1
Ran-Familie	z.B. Ran, Gsp1 (Hefe)

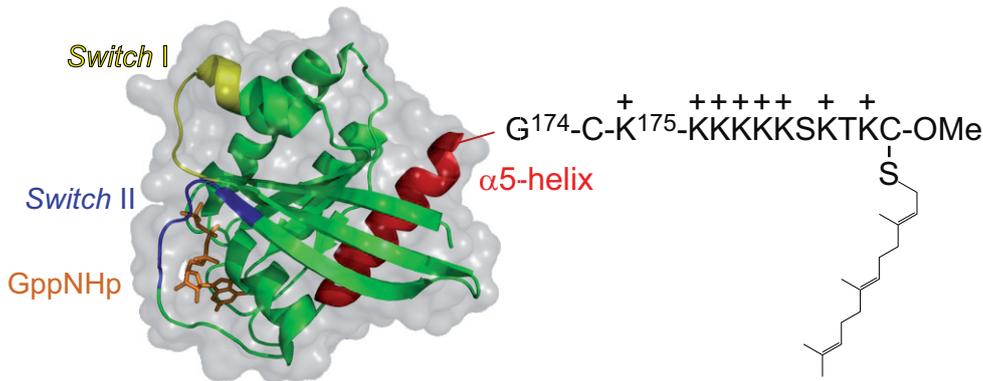
Ras besitzt wie alle Mitglieder der Guaninnukleotid-bindenden Proteine, ein Strukturmerkmal, das als G-Domäne (Abbildung 1.6) bezeichnet wird. Die G-Domäne unterteilt sich in weitere fünf G-Motive, die als G1 bis G5 bezeichnet werden.[52] Dabei ist die G-Domäne an der Magnesium-abhängigen Bindung von Guaninnukleotiden und an der Hydrolyse von GTP zu GDP und Phosphat (Abbildung 1.5) beteiligt. Die langsame GDP-Dissoziation wird durch *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) wesentlich beschleunigt, wohingegen *GTPase activating proteins* (GAPs) die GTP Hydrolyse erhöhen (Abbildung 1.5).[51, 52]



**Abbildung 1.5:** Links: Schematische Darstellung der Schalterfunktion von Ras. Innerhalb des Zyklus kann Ras von dem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand in den aktiven, GTP-gebundenen Zustand wechseln. Dabei wird die Dissoziation des GDPs (langsam) durch *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) beschleunigt. Auf der anderen Seite wird die Hydrolyse des GTP durch *GTPase activating proteins* (GAPs) erhöht. Modifiziert nach [51]. Rechts: Schematische Darstellung des *loaded-spring* Mechanismus. Die beiden Hauptaminosäuren, die an der Hydrolyse beteiligt sind, sind in *Switch I* Threonin35 und in *Switch II* Glycin60. Der Hydrolysemechanismus ist ähnlich wie eine Feder aufgebaut. Nach der Freigabe des  $\gamma$ -Phosphats gehen die zwei *Switch*-Regionen in eine entspannte GDP-spezifische Konformation über. Erstellt nach [52].

---

Das G1-Motiv, welches auch als *P-Loop* oder Walker-A-Motiv bezeichnet wird, ist an der Bindung des  $\beta$ -Phosphats von GDP und GTP beteiligt. Die Stabilisierung der beiden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphate erfolgt dabei über Hauptkettenkontakte, wohingegen das  $\gamma$ -Phosphat durch ein Lysin stabilisiert wird. Das G2-Motiv ist der *Switch I*, der nach der GTP Bindung eine große Konformationsänderung durchführt, ausgelöst durch die Änderung der Orientierung eines Threoninrests. Das Serin aus der G1-Domäne und das Threonin aus G2 sind an der Koordinierung des Magnesiums beteiligt, das für die GTP-Hydrolyse essentiell ist. Das Magnesiumion koordiniert wiederum das  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat des GTPs. Der *Switch II* wird auch als G3-Motiv oder DXXG-Motiv bezeichnet. Das Aspartat kann über ein Wassermolekül an das Magnesiumion binden und das oben erwähnte  $\gamma$ -Phosphat wird zusätzlich durch ein Glycin über eine Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert. Durch das vor der G4-Domäne liegende Aspartat wird die Guaninbase über zwei Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Durch zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Asparagin und Lysin (G4-Domäne) zu anderen Aminosäuren aus dem *P-Loop* wird eine zusätzliche Stabilisierung erreicht. Die Spezifität der Nukleotidbindung wird durch die Bindung der G4- und G5-Motive zum Nukleotid beeinflusst.[52] Wie die beschriebenen Interaktionen vermuten lassen, ändert sich abhängig von der Nukleotidbeladung auch sehr stark die Proteinkonformation. In der aktiven Form von Ras liegt ein Proteinkomplex mit GTP und einem Magnesiumion vor. Ein Sauerstoff des  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphats sind an der Magnesiumkoordination beteiligt. In einer Magnesium-abhängigen Umgebung liegen die Dissoziationsraten von GTP und GDP im Bereich von  $10^{-4}$  bis  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . [55] In der GTP-gebundenen Proteinform sind zwei Wasserstoffbrücken zwischen dem Sauerstoffatom des  $\gamma$ -Phosphats und der Aminogruppe des Threonins lokalisiert. Über die Proteinseitenkette wird das Magnesiumion gebunden und die zweite Wasserstoffbrücke ist zwischen dem Glycin (DXXG-Motiv) und den beiden *Switch*-Regionen ausgebildet. Der Mechanismus des Nukleotidaustauschs wird auch als *loaded-spring* Mechanismus bezeichnet.[52]



**Abbildung 1.6:** Schematische Darstellung von semisynthetischem K-Ras4B mit angefügtem Farnesylrest (PDB Code: 3GFT). Der *Switch I* ist in gelb, der *Switch II* in blau, das GppNHp in hellbraun und die  $\alpha$ -Helix in rot dargestellt. Erstellt mit PyMOL.

Aufgrund des sechssträngigen  $\beta$ -Faltblatts, das von fünf  $\alpha$ -Helices umgeben ist, werden die G-Proteine auch als  $\alpha,\beta$ -Proteine bezeichnet.[52]

Zu der Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen gehören nicht nur die vier Ras-Proteine (H-Ras, K-Ras (Splice-Varianten K-Ras4A und K-Ras4B) und N-Ras), sondern auch die R-Ras-Proteine (R-Ras, R-Ras2/TC21, R-Ras3/M-Ras), die Ral (A und B) Proteine, Raps (1A, 1B, 2A und 2B) und Rheb. Zwei weitere entdeckte GTPasen wurden ebenfalls zu der Superfamilie hinzugefügt, Rin und Rit. Gemeinsam haben sie alle, dass sie ähnliche Funktionen innerhalb der Zelle ausüben.[56] Die vier Ras-Proteine besitzen alle eine fast identische G-Domäne und unterscheiden sich nur im C-terminalen Bereich. Mit einer Sequenzidentität von 85% und der Möglichkeit, den ERK-Signaltransduktionsweg zu aktivieren, deutet dies auf eine Funktionalitätsähnlichkeit aller Ras-Proteine hin.[56] Johnson *et al.* und Umanoff *et al.* haben mit Mausversuchen gezeigt, dass K-Ras (nicht für H-Ras und N-Ras) eine essentielle Rolle bei der Zellentwicklung spielt.[56–58] Als Anti-Ras Mittel wurden Farnesyltransferaseinhibitoren (FTI = *farnesyltransferase inhibitors*) entwickelt.[56] Diese zeigen aber nur eine effektive Wirkung bei H-Ras und nicht bei K- oder N-Ras.[59, 60] Der C-terminale Bereich der Ras-Proteine besitzt zwei Signalsequenzen, die für die Membraninteraktion nötig sind. Das CAAX-Motiv (A: aliphatische Aminosäure, X: Methionin oder Serin) trägt drei posttranslationale Modifikationen (Farnesylierung, AAX-Proteolyse und Carboxymethylierung).[61–63] Das zweite Motiv ist entweder eine zusätzliche C-

terminale Fettsäure (Palmitinsäure für H-Ras, N-Ras und K-Ras4A) oder eine Lysinreiche polybasische Sequenz (K-Ras4B).[64] Viele Membranproteine, wie auch Ras und das im weiteren Kapitel beschriebene Rheb-Protein benötigen, für die korrekte Membranbindung und für die Ausübung ihrer Funktion eine posttranslationale Modifikation.[65] Bei Ras und Rheb findet die Modifikation an der CAAX-Region statt. Ist das Cystein dieser Region mutiert, kann keine korrekte Modifikation und dementsprechend auch keine Membranbindung zustande kommen.[66] Bei einer Isoprenylierung wird ein Farnesylrest (15 Kohlenstoffatome) oder ein Geranylgeranylrest (20 Kohlenstoffatome) über eine kovalente Thioetherbindung an das Cystein angefügt.[67, 68] Diese Reaktion wird von Protein-Prenyltransferasen (PPTasen) an den Cysteinen des C-Terminus katalysiert. Abhängig von der letzten Aminosäure wird entschieden, welche posttranslationale Modifikation durchgeführt wird. Ist Leucin die letzte Aminosäure, wird eine Geranylgeranyltransferase verwendet, wohingegen die Farnesyltransferase die Aminosäuren Methionin, Serin, Cystein und Glutamin erkennt. Nach der erfolgreichen Lipidierung werden die nachfolgenden Aminosäuren nach der CAAX-Region abgespalten und eine Carboxymethylierung findet statt.[67] Eine einfache Farnesylierung reicht für eine feste Membranbindung der Ras-Proteine nicht aus. N- und H-Ras werden nach der Proteinbiosynthese am Endoplasmatischen Retikulum noch zusätzlich am Golgi-Apparat palmitoyliert.[56, 69, 70] Danach folgt die Relokalisation zur Plasmamembran.[69] Die Palmitoylierung ist im Gegensatz zu anderen Lipidmodifikationen reversibel. Für N-Ras beträgt die Halbwertszeit ca. 20 min und für H-Ras (zweifach palmitoyliert) ca. 60 min.[71, 72] K-Ras besitzt keine zusätzliche Palmitoylierung, sondern eine Abfolge von positiven Lysinresten, die eine elektrostatische Interaktion mit den negativ geladenen Kopfgruppen der Plasmamembran erlaubt.[73]

Die verschiedenen carboxyterminalen Modifikationen sorgen für eine unterschiedliche Ras-Isoform-Interaktion mit spezifischen Bereichen der Membran.[56] Roy *et al.* haben für H-Ras, aber nicht für K-Ras, zeigen können, dass die Aktivierung von Raf durch H-Ras durch Caveolin inhibiert wurde. Caveolin ist ein Cholesterol-bindendes Protein, welches die Membranmikrodomänen zerstört und so die Fähigkeit von H-Ras für die Aktivierung von Raf ändert. Das Entfernen von Cholesterol aus den Membranstrukturen hat den selben Effekt. Somit wird angenommen, dass Cholesterol- und

Caveolin-reiche Membrandomänen für die Lokalisation von H-Ras nötig sind.[56, 74] Die Untersuchungen von Scheel *et al.* an *Caenorhabditis elegans* haben ebenfalls die Wichtigkeit von Caveolin für die richtige Funktionalität von Ras gezeigt.[75] Ähnliche Beobachtungen zur Membranlokalisierung von Ras wurden durch Weise *et al.* gemacht. Das palmitoylierte und farnesylierte N-Ras ist in der flüssig-kristallinen ( $l_d$ ) Phase lokalisiert und reichert sich dann in der Grenzschicht zwischen der ungeordneten ( $l_d$ ) und geordneten ( $l_o$ ) Membranphase an. Das farnesylierte K-Ras hingegen bildet in der ungeordneten Phase Proteincluster aus.[11, 76] Die unterschiedliche Lokalisation der verschiedenen Ras-Isoformen sorgt auch für eine spezifische Interaktion mit Ras-Effektorproteinen. Yan *et al.* konnten für K-Ras zeigen, dass es Raf effizienter aktivieren kann als H-Ras, wohingegen H-Ras ein besserer Aktivator für die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) als K-Ras ist.[77] Die verschiedenen Studien haben alle gezeigt, dass die unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen von Ras und die daraus resultierende Membranlokalisation für eine spezifische biologische Aktivität sorgen.

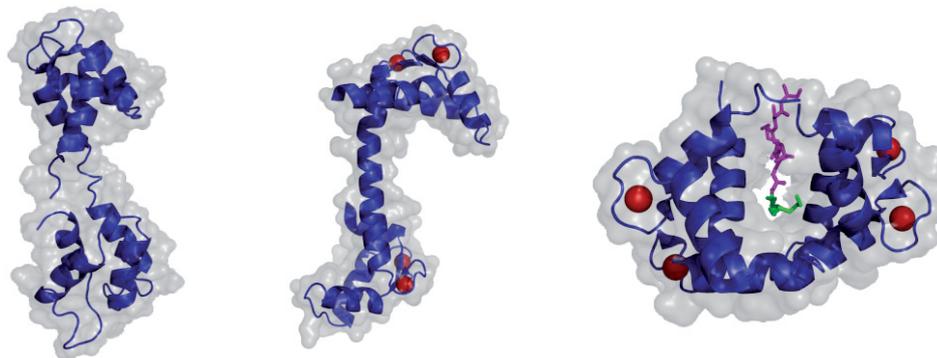
Die Hydrolyse von GTP nach GDP sorgt dafür, dass Ras in den inaktiven Zustand übergeht. Im Weiteren kann die GTP-Beladung durch GTP-Austauschfaktoren (GEF = *Guanosine triphosphate exchange factor*) in den aktiven Ras-Zustand beschleunigt werden.[78] Für die Katalyse interagiert das GEF-Protein mit dem *Switch I* und *II*, dem *P-Loop* und der Magnesium-Bindestelle, was dazu führt, dass das Phosphat nicht mehr weiter gebunden wird.[52] Allerdings haben Untersuchungen gezeigt, dass das Magnesiumion nur eine untergeordnete Rolle bei dem Nukleotidaustausch spielt. Dies lässt den Schluss zu, dass die primäre Interaktion zwischen dem *P-Loop* und dem  $\beta$ -Phosphat abläuft.[79–81] Bekannte GEF-Proteine besitzen eine CDC25- (*cell division cycle 25 homology*) oder auch eine REM-Untereinheit (*Ras exchange motif*).[82]

Die Gegenspieler der oben erwähnten GEF-Proteine sind die GAP-Proteine (GAP = *GTPase activating proteins*), die eine schnelle Hydrolyse ( $10^5$ -fache Beschleunigung) katalysieren, was dann zu einer Inaktivierung des Ras-Proteins führt.[83, 84] Das Arginin des GAP-Proteins relokalisiert positive Aminosäurenreste in der Nähe der Phosphatgruppe. Zusammen mit dem Arginin-Finger und der Positionierung des Glutamins wird ein nukleophiler Angriff des Wassers auf das  $\gamma$ -Phosphat induziert.[83] Liegt im Glutamin61 (bei Ras) eine Mutation vor, ist die Hydrolyse gestört. Durch Än-

derungen in der Aminosäure 12 und 13 kommt es zu einer falschen Lokalisation des Arginin-Fingers und des Glutamins, was dazu führt, dass der Übergangszustand nicht mehr eingenommen werden kann. Die Folge ist, dass die Inaktivierung durch ein GAP nicht mehr stattfinden kann und das Ras-Protein dauerhaft aktiviert ist, was häufig die Ursache einer Krebserkrankung ist.[85] Bei der Zellentwicklung sorgt aktiviertes Ras durch die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) für ein Überleben der Zelle und durch die Aktivierung des Raf/ERK-Signaltransduktionswegs für eine Zelldifferenzierung.[78] Eine Vielzahl an GAP-Proteinen wird durch posttranslationale Modifikationen, *second messenger* und Wechselwirkungen zwischen Protein/Protein oder Protein/Ligand reguliert.[86]

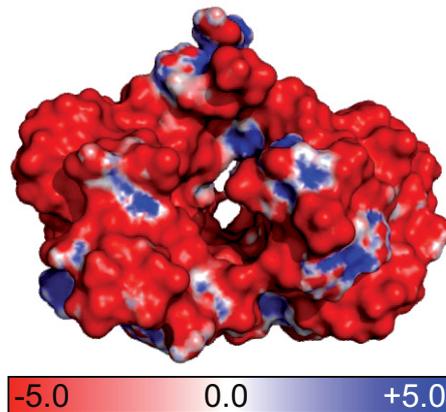
### 1.3 Calmodulin - Ein Calcium-bindendes Protein

Calmodulin (CaM) ist ein eukaryotisches Calcium-bindendes regulatorisches Protein, das an vielen zellulären Calcium-abhängigen Signalkaskaden beteiligt ist und eine hohe Sequenzähnlichkeit von ca. 90 % zwischen Mensch und Pflanze aufweist.[87–89] Neben den zellulären Signalprozessen ist Calmodulin auch an der Regulation von Enzym-, Ionenkanalaktivitäten, synaptischer Übertragung und Plastizität und bei der Regulation der Genexpression beteiligt.[88]



**Abbildung 1.7:** Schematische Darstellung der drei verschiedenen Konformationen von Calmodulin. Links: Calcium-freies Calmodulin (PDB Code: 1CFD). Mitte: Calcium-gebundenes Calmodulin (PDB Code: 3CLN) (inaktive Form). Rechts: Calcium- und Zielprotein-gebundenes Calmodulin (PDB Code: 1L7Z) (aktive Form). Die Proteinoberfläche ist in hell-grau dargestellt. Die vier Calciumionen sind rot eingefärbt. In der aktiven Form hat Calmodulin zusätzlich ein myristoyliertes Peptid gebunden. Erstellt mit PyMOL.

Dabei interagiert Calmodulin mit verschiedenen Enzymen, Peptiden und Arzneistoffen, wie zum Beispiel mit Phenothiazinen.[87] Mit einer Größe von 148 Aminosäuren ist Calmodulin ein relativ kleines Protein, welches in der Lage ist, vier Calciumionen zu binden. Die Proteinelänge beträgt etwa  $65 \text{ \AA}$  und jede Calcium-bindende Domäne ist etwa  $25 \times 25 \times 20 \text{ \AA}$  groß. Calmodulin besteht aus den sieben Helices I bis VII (I: 7-19, II: 29-39, III: 46-55, IV: 65-92, V: 102-112, VI: 119-128 und VII: 138-148) und hat einen Helixanteil von 63 %. Dies entspricht in etwa auch dem Helixanteil von Troponin-C, einem dem Calmodulin verwandten Protein.[87] Die charakteristische negative Oberflächenladung von Calmodulin ist in Abbildung 1.8 dargestellt.



**Abbildung 1.8:** Schematische Darstellung der APBS generierten elektrostatischen Oberfläche von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . Die positiven (blau) und negativen (rot) Isooberflächen des elektrostatischen Potentials wurden auf  $+5$  und  $-5 \text{ k}_B T \times e^{-1}$  gesetzt. Erstellt mit PyMOL und dem APBS *Plugin*.

Trotz seiner Stabilität ist es strukturell so flexibel, dass es durch Calcium-Bindung konformelle Strukturänderungen erfährt. Eine der wichtigsten Funktionen ist die regulatorische Fähigkeit, Einfluss auf die Aktivität von Proteinkinasen, NAD-Kinasen, Phosphodiesterasen, Calcium-Pumpen und Proteinen, die in der Zellbewegung eine Rolle spielen, zuzunehmen.[89–91] Die große Anzahl an verschiedenen Interaktionen von Calmodulin deutet auf eine nicht spezifische Interaktion hin, allerdings bindet es die Zielproteine mit einer sehr hohen Affinität. Die Dissoziationskonstanten liegen hierbei im Bereich von picomolar bis nanomolar. Untersuchungen haben aber in den letzten Jahren gezeigt, dass Calmodulin mit einer sehr hohen Affinität und Spezifität an positiv geladene amphiphile  $\alpha$ -helicale Peptide (Baa-Helix) bindet.[91] Für künstlich

erstellte amphiphile Helices mit nur Leucin, Lysin und Tryptophan als Residuen wurden Dissoziationskonstanten im Bereich von  $10^{-9}$  bis  $10^{-10}$  M gefunden.[91–93] Wie die Studien gezeigt haben, ist das Baa-Helix-Motiv allerdings nicht die einzige Bindungsdomäne. Bei der  $\gamma$ -Untereinheit der Phosphorylase-b-Kinase interagiert nur eine der beiden Bindungsmotive über die Baa-Helix mit Calmodulin. Das wichtigste Strukturmerkmal von Calmodulin, welches die Calciumionen bindet, ist die EF-Hand, die eine charakteristische Helix-Schleife-Helix-Struktur (Domäne I und II) besitzt.[87, 91] Diese Konformation ähnelt sehr stark den beiden Calciumbindungsdomänen von Parvalbumin. Parvalbumin ist wie auch Troponin-C ein Calcium-bindendes Protein und daher dem Calmodulin sehr ähnlich. Die Domänen III und IV sind ähnlich den Domänen des Calcium-bindenden Proteins im Darm. Zusätzlich weisen Domäne II und III die Helix-Schleifen-Helix-Struktur auf.[87] Die vier Calcium-bindenden Regionen von Calmodulin (Aminosäuren 20-31, 56-67, 93-104 und 129-140) sind ähnlich zu den beiden Regionen, die in Parvalbumin gefunden wurden und der Calcium-bindenden Region III und IV vom Calcium-bindenden Darmprotein. Gemeinsam haben sie alle, dass sie aus zwölf Residuen bestehen, wobei die ersten neun die Schleife bilden und die letzten drei am Anfang der Helix-Schleifen-Helix-Struktur lokalisiert sind. Calmodulin wird durch verschiedene Interaktionen zwischen den Helices stabilisiert. Zusätzlich sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den benachbarten Calciumbindungsschleifen vorhanden. Die Aminosäuren 25 bis 29 stehen antiparallel zu den Resten 61 bis 65 und die beiden Bereiche sind über Wasserstoffbrücken zwischen Gly25 und Asp64 und zwischen Ile27 und Thr62 verbunden. Im zweiten Teil von Calmodulin sind die Bereiche 99 bis 101 und 135 bis 137 ebenfalls antiparallel ausgerichtet und über Wasserstoffbrücken zwischen Ile100 und Val136 verbunden. Ähnliche Bereiche der Calciumbindungsschleifen findet man auch in den beiden verwandten Proteinen, Parvalbumin und im Calcium-bindenden Darmprotein wieder. Mit Hilfe von NMR-Untersuchungen (*Nuclear Magnetic Resonance*, Kernspinresonanzspektroskopie) haben N. J. Anthis und G. M. Clore für das humane Calmodulin fünf Aminosäuren (77 bis 81) identifiziert, die als flexibler Linker dienen.[94] Weitere NMR-Studien haben für Calmodulin aus *Drosophila melanogaster* ähnliche Ergebnisse gezeigt (Linker-Region: zehn Aminosäuren 74 bis 83, hoch flexibel sind Met76, Lys77, Thr79, Asp80 und Ser81).[95] Babu *et*

*al.* haben für die Linker-Region von Calmodulin sechs Aminosäuren identifiziert (Parvalbumin: acht Aminosäuren, Calcium-bindendes Darmprotein: zehn Aminosäuren).[87] In jeder der beiden Proteinhälften sind zwei Calciumionen im Abstand von ca. 11,3 Å lokalisiert, die wiederum mit Sauerstoffatomen des Proteinrückgrats und den sauren Aminosäuren der Seitenkette koordiniert sind.[87]

Die insgesamt vier EF-Hände (jeweils zwei am N- und C-Terminus) besitzen starke hydrophobe Regionen mit Bereichen, die ein hohes negatives elektrostatisches Potential besitzen. Diese rund 30-Aminosäuren-lange-Region ist wiederum eine Bindungsmöglichkeit für die oben erwähnten positiv geladenen amphiphilen Helices.[87, 91] Senkrecht dazu stehen zwei  $\alpha$ -Helices, die von einer 12-Aminosäuren-langen Calcium-bindenden Schleife umgeben sind. Der interhelicale Winkel in Calmodulin beträgt etwa 90°.[87] Eine lange  $\alpha$ -Helix (Helix IV, Linker) verbindet die beiden Domänen miteinander.[87, 91] Aufgrund der Verbindung zwischen der Helix IV und den beiden Domänen vermutet man, dass diese eine Rolle bei der kooperativen Bindung von Calcium spielt. Es gibt mehrere Hinweise, dass die Aminosäuren in Helix IV eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Calmodulin und den Zielproteinen spielen.[87] M. Walsh und F.C. Stevens haben gezeigt, dass die Carboxymethylierung der Methionine 71, 72 und 76 die Interaktion zwischen Calmodulin und der zyklischen Phosphodiesterase verhindert.[87, 96] Laut Newton und Klee (persönliche Unterhaltung) ist die primäre Bindungsstelle Lys75 in der Helix IV lokalisiert.[87]

Calmodulin bindet mit sehr hoher Affinität die vier Calciumionen ( $K_d$  mikromolar).[89] Dabei ist erstaunlich, dass die EF-Hand des C-Terminus eine höhere Affinität für Calciumionen aufweist als die EF-Hand am N-Terminus. Sobald Calmodulin mit einem Zielprotein interagiert, steigt auch die Affinität für die Aufnahme von weiteren Calciumionen. Allerdings haben Zhang *et al.* gezeigt, dass auch das genaue Gegenteil auftreten kann. Bei dem Komplex CaM-CaMBD2-b besitzt die C-terminale Seite des Proteins eine höhere Calciumaffinität als die N-terminale Seite.[88]

Verschiedene Studien mit Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS = *Small Angle X-ray Scattering*) und Kernspinresonanzspektroskopie haben gezeigt, dass die Domänen enger beieinander liegen als es die Kristallstruktur vermuten lässt. Zusätzlich ändern sich die Calciumbindungseigenschaften nach den Interaktionen mit den Zielproteinen.[91,

97, 98]. Nach der Calciumbindung kommt es zu einer Konformationsänderung von der geschlossenen zu der offenen Form von Calmodulin. Dabei wird die hydrophobe Oberfläche der N- und C-terminalen Schleifen frei, welche für die Calcium-abhängigen Interaktionen mit dem Zielprotein verantwortlich ist.[88]

Die Konformationsänderung lässt sich in zwei Hauptschritte unterteilen. Als erstes wird in der Linker-Region (Arginin74 bis Glutaminsäure83) die  $\alpha$ -Helix entwunden, was dann im zweiten Schritt für eine Freigabe der hydrophoben Fläche zwischen der N- und C-terminalen Schleife sorgt, sobald Calcium gebunden wurde. Die Linker-Region ist sehr flexibel und erlaubt Calmodulin, das jeweilige Zielprotein zu umschließen, indem die N- bzw. C-terminale Schleife umklappt. Dieser Calcium-abhängige Übergangsschritt vom geschlossenen in den offenen Zustand ist der entscheidende Schritt bei der Calcium-abhängigen Interaktion zwischen Calmodulin und seinen Zielproteinen. Trotz der Einigkeit darüber, dass die Freigabe der hydrophoben Fläche durch die Calciumbindung der beiden EF-Hände (N- und C-terminal) initialisiert wird, haben Zhang *et al.* gezeigt, dass die C-terminale Schleife von Calmodulin im Komplex CaM-CaMBD2 kein Calcium bindet. Die Freigabe der hydrophoben Fläche wird hierbei durch die halb-offene Konformation der C-Schleife erklärt. Zhang *et al.* haben weiter gezeigt, dass die Zielproteine einen großen Einfluss auf Calmodulin haben, weniger auf die Struktur, viel mehr auf seine Affinität, Calcium zu binden. Die Zielproteine sorgen so für eine Erniedrigung der Bindungsaffinität von Calmodulin zu Calcium. Die durch die Zielproteine induzierte Konformationsänderung von Calmodulin sorgt für zusätzliche Mechanismen, welche es Calmodulin erlauben, auf die unterschiedlich starken Calciumsignale zu antworten.[88]

Die Proteinbindung von Calmodulin kann sowohl reversibel als auch irreversibel sein. Eine einfache Erkennungssequenz ist das IQ-Motiv (I: Isoleucin, Q: Glutamin). Zielproteine, die dieses IQ-Motiv besitzen, können an Calmodulin binden und eine Konformationsänderung auslösen. Calmodulin ist in der Lage, sowohl als Inhibitor als auch als Aktivator Einfluss auf regulatorische Proteine zu nehmen, die gegensätzliche Funktionen aufweisen (z.B. Kinasen und Phosphatasen).[89] D. Chin und A. R. Means haben sechs verschiedene Regulationsmodi von Calmodulin vorgeschlagen.[99] Eine klar definierte Konsensussequenz für die Calmodulinbindung existiert nicht. Die meisten

Calmodulinbindungsseiten haben ein paar charakteristische Motive, wie einen hohen Helix-Anteil, eine positive Nettoladung und zwei hydrophobe Aminosäuren. Der unterschiedliche Abstand der Aminosäuren ermöglicht eine Einteilung in verschiedene Motive. Die *Calmodulin Target Database* (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>) gibt einen umfassenden Überblick über die möglichen Bindungspartner von Calmodulin. In dem nächsten Absatz wird auf die verschiedenen Bindungsmotive für die Calmodulinbindung eingegangen. Die größte Gruppe an Calmodulinbindungsproteinen bilden die Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen und -phosphatasen. Dabei findet die Erkennung und Regulation über Autoinhibition statt. Eine autoinhibitorische Domäne des Enzyms imitiert ein Pseudosubstrat, das die Substratbindung an die katalytische Domäne unterbindet. Bei einer hohen Calciumkonzentration bindet Calmodulin an die Erkennungssequenz des Enzyms, was zu einer hohen katalytischen Aktivität durch Autoinhibition führt. Ein Hauptmotiv für die Calmodulin-Erkennung ist das kanonische Motiv. Dieses wurde erstmals bei Calmodulin-abhängigen Serin- und Threoninkinasen charakterisiert und näher beschrieben. Die zentrale Helix in Calmodulin bildet dabei einen flexiblen Linker, der dem N- und C-Terminus eine Windung um die Zielsequenz erlaubt. Als Beispiel soll hier die MLC-Kinase genannt werden, bei der die helikale Zielsequenz in die hydrophobe Bindungstasche von Calmodulin bindet. Neben dem kanonischen Bindungsmotiv gibt es auch weitere Bindungsstrukturen. Eine bekannte Struktur ist der Ödemfaktor (EF = *edema factor*), eine Calmodulin-sensitive Adenylylcyclase von *Bacillus anthracis* (Milzbrandtoxin). Kristallstrukturanalysen haben gezeigt, dass die beiden Calmodulindomänen an unterschiedliche Regionen des Ödemfaktors binden, ohne in Kontakt miteinander zutreten. Dabei bindet Calmodulin auch nur zwei Calciumionen am C-Terminus, im Gegensatz zu der normalen Bindung von insgesamt vier Ionen. Ein weiterer Bindungsmodus ist die durch Calmodulin induzierte Dimerisierung von Membranproteinen. Die Kristallstruktur des Komplexes aus Calmodulin und des Kaliumkanals (SK2)-a zeigt eine Dimerbildung (zwei Helix-Schleifen-Helix-Motive) mit einem Calmodulinmolekül an jedem Ende. Beide Calmodulinmoleküle haben nur N-terminal Calciumionen gebunden und winden sich dabei um drei  $\alpha$ -Helices. Für die Splice-Variante SK2-b wurde eine *square*-Bindungsstruktur gefunden. Der Komplex aus SK2-b und Calmodulin hat vier Calciumionen gebunden

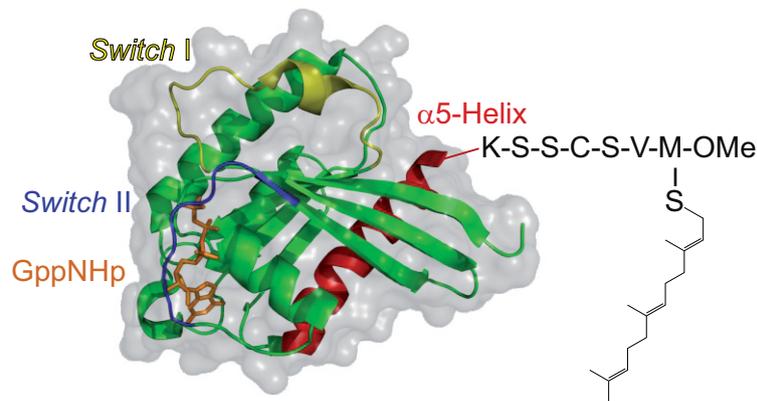
und geht eine S-förmige Konformation ein. Die genannten Beispiele zeigen alle die hohe Strukturflexibilität von im Komplex-gebundenem Calmodulin, die durch den variablen Platz der beiden Schleifen begünstigt wird. Der geringste Abstand ist durch die Größe einer Schleife von 20 Å festgelegt. Der maximale Abstand von ca. 70 Å wird durch den komplett gestreckten Linker erreicht.[89]

## 1.4 Rheb - Eine weitere kleine GTPase

Eine weitere kleine GTPase, die zu der Ras-Familie gehört, ist Rheb. Rheb ist ein 184 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 20,5 kDa. Es wurde erstmals 1994 in hippocampalen Granulazellen des Rattenhirns detektiert. Auch in der Lunge, Niere, Thymus und Darm wurde eine hohe Rheb-Konzentration gefunden. Wie der Name Rheb, *Ras homolog enriched in brain*, vermuten lässt, weist das Protein eine hohe Sequenzähnlichkeit von ca. 37,7 %, 43,3 % und 34 % zu humanen Rap2, RAS1 (Hefe) und humanen H-Ras auf. [100] Aufgrund der Sequenzähnlichkeit wird Rheb auch als H-Ras ähnlicher Phenotyp bezeichnet.[101] Wie auch Ras kann Rheb als molekularer Schalter GTP binden und hydrolysieren. Neben dem Ursprungs-Rheb aus Ratte und dem humanen Rheb (Chromosom 7: 7q36), ist ein zweites Rheb-Gen in Säugetierzellen identifiziert worden. Dieses Gen ist auf Chromosom 12 (12q13.12, *RhebL1*) lokalisiert. Homologe Gene wurden in einer Vielzahl von Organismen gefunden. In drei Pilzen, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Aspergillus fumigatus* befindet sich ein einzelnes Rheb-Gen (*rhb1* in *S. cerevisiae* und *S. pombe*, *rhbA* in *A. fumigatus*). Im Zebrafisch (*Danio rerio*), in der Fruchtfliege (*D. melanogaster*), im Schleimpilz (*Dicytostelium discoideum*) und in der Seescheide (*Ciona intestinalis*) wurde je ein einzelnes Gen gefunden. Das Rheb-Protein aus der Fruchtfliege besitzt 63% Sequenzidentität und 80% Sequenzähnlichkeit mit dem humanen Rheb-Protein. Zwischen dem Rheb-Protein aus *S. pombe* und *D. melanogaster* besteht eine 51%ige Sequenzidentität und eine 71%ige Sequenzähnlichkeit.[102] Jedes Rheb-Protein besteht aus fünf G-Boxen (G1 bis G5). Diese kurzen Sequenzen sind an der Erkennung und Hydrolyse von GTP beteiligt. Es gibt drei Hauptstrukturmerkmale.

- Das erste ist das konservierte Arginin an Position 12 (analog zu dem Glycin an Position 12 bei Ras) in allen Rheb homologen Proteinen.[56, 102]
- Die zweite Auffälligkeit sind die ähnlichen Sequenzen der Effektor-domänen, in denen 10 bis 17 Aminosäuren identisch und vier Aminosäuren ähnlich sind.[102]
- Das dritte Merkmal ist, wie bei Ras auch, die C-terminale CAAX-Box (C = Cystein, A = aliphatische Aminosäure, X = Methionin, Alanin, Serin, Glutamin oder Cystein), die für die Farnesylierung notwendig ist.[102]

Durch Röntgenkristallstrukturuntersuchungen [103, 104] und NMR-Strukturanalysen [101] konnte die typische G-Domänen-Faltung von Rheb nachgewiesen werden.



**Abbildung 1.9:** Schematische Darstellung von humanem GppNHp-gebundenem Rheb. Farblich markiert sind der *Switch* I (gelb) und II (blau), die  $\alpha$ 5-Helix sowie das GTP-Analogon GppNHp (orange) (PDB Codes: 1XTR). Erstellt mit PyMOL.

Dabei erstreckt sich die *Switch* I-Region (gelb) von Aminosäure 33 (Asparaginsäure) bis 41 (Asparagin) und die *Switch* II-Region (blau) von Aminosäure 63 (Asparaginsäure) bis 79 (Asparagin) (Abbildung 1.9). Rheb besitzt wie viele andere GTPasen eine C-terminale CAAX-Box, die eine Erkennungssequenz für die Farnesyltransferase darstellt.[105] Allerdings ist keine Palmitoylierungsstelle oder polybasische N-terminale Sequenz der CAAX-Box vorhanden.[106] Somit ist die C-terminale Farnesylierung an der CAAX-Box die bisher einzige bekannte posttranslationale Modifikation von Rheb. Auch eine Abfolge von mehreren Lysinen wie bei K-Ras4B ist nicht vorhanden. Durch den Farnesylanker kann Rheb an die Membran binden und seine regulatorische Funktionen ausüben.[101] Strukturell ist Rheb dem Ras und Rap ähnlicher als anderen klei-

nen G-Proteinen. In den kleinen GTPasen sind die *Switch*-Regionen an der Erkennung und Interaktion mit den GAP-, GEF- und Effektorproteinen beteiligt.[85, 101, 107] Ein weiteres charakteristisches Bindungsmotiv ist der *P-Loop* von Glycin 13 bis Serin 20, der die Phosphatbindung vermittelt.[101] Die gesamte Rheb-Struktur hat die typische kanonische Faltung der kleinen GTPasen.[85, 104, 108] Rheb hat eine  $\alpha\beta$ -Faltung mit einem  $\beta$ -Faltblatt, welches aus einem antiparallelen und fünf parallelen  $\beta$ -Strängen besteht. Die  $\beta$ -Stränge sind um den C-Terminus der  $\alpha$ -Helix gewunden, welche senkrecht zu der ersten  $\alpha$ -Helix steht. Die gewölbte Seite des  $\beta$ -Faltblatts ist durch drei zusätzliche Helices abgedeckt. Am C-terminalen Ende des  $\beta$ -Faltblatts ist die Nukleotidbindestelle lokalisiert, die ähnlich wie andere Nukleotidbindestellen eine offene  $\beta$ -Faltblattstruktur besitzt.[101, 108] Diese Nukleotidbindestelle ist durch die *Switch* I- und II-Region, den *P-Loop*, als auch durch den N-terminalen Rest der ersten Helix aufgebaut.[85, 101] Die Orientierung des GDP-gebundenen Nukleotids ist in Rheb konserviert.[101]

**Tabelle 1.2:** Strukturdomänen von Rheb.[101]

Art der Sekundärstruktur	Aminosäuresequenz
$\beta$ 1-Faltblatt	Lysin 5 bis Leucin 12
$\alpha$ 1-Helix	Lysin 19 bis Glutaminsäure 28
$\beta$ 2-Faltblatt	Asparagin 41 bis Valin 49
$\beta$ 3-Faltblatt	Glutamin 52 bis Asparaginsäure 60
$\beta$ 4-Faltblatt	Glycin 80 bis Serin 86
$\alpha$ 2-Helix	Isoleucin 90 bis Valin 107
$\beta$ 5-Faltblatt	Isoleucin 114 bis Asparagin 119
$\alpha$ 3-Helix	Tyrosin 131 bis Tryptophan 141
$\beta$ 6-Faltblatt	Alanin 144 bis Glutaminsäure 147
$\alpha$ 4-Helix	Asparagin 153 bis Isoleucin 170

Der Vergleich der beiden 3D-Strukturen von Ras und Rheb (Abbildung 1.6 und Abbildung 1.9) hat gezeigt, dass eine große Ähnlichkeit zwischen beiden Proteinen besteht. Trotzdem gibt es auch ein paar Unterschiede. Rheb besitzt in der  $\alpha$ -Helix einen Bereich mit zwei Windungen anstelle den drei Windungen im Ras-Protein. Außerdem zeigt die

Struktur eine dichtere Packung der GTP-Bindungsseite als bei Ras. Das hochkonservierte Glycin an Position 12 bei Ras ist bei Rheb ein Argininrest.[102] Strukturelle Unterschiede zwischen Ras und Rheb gibt es in der Aminosäurezusammensetzung des *Switch I* von inaktiven Rheb und der Konformation von *Switch I* in Ras und Rap.[104] Die Unterschiede sind hauptsächlich im N-terminalen Bereich des *Switch I* von Asparagin 41 bis Threonin 44 vorhanden.[101] Serin 34 in Rheb, Glutaminsäure 31 in Ras und Lysin 31 in Rap sind entscheidend für die Spezifität der jeweiligen Effektorproteine.[109] Die gesamte Sequenzähnlichkeit für den *Switch I* ist recht hoch, die ausgetauschte Ladung (Arginin in Ras gegen Threonin 44 in Rheb) und die kurze Seitenkette dieser Aminosäuren scheinen einen Einfluss auf die Funktion der kleinen GTPase Rheb zu haben.[101] Die Konformation des *Switch II* von Ras in Lösung unterscheidet sich ebenfalls von der Struktur vom *Switch II* von Rheb.[108] Der *Switch II* ist ein kurzer Helix-ähnlicher Bereich von Prolin 71 bis Serin 75. Die lange  $\alpha$ -Helix von Serin 89 bis Glycin 108 ist parallel zu dem zentralen  $\beta$ -Faltblatt von Rheb. Die Interaktion zwischen den einzelnen Bereichen basiert auf den hydrophoben Resten. Die *Switch II*-Konformation schützt die Aminosäure Glutamin 64 gegenüber der Interaktion mit dem gebundenen Nukleotid. Die NMR-Ergebnisse von Karassek *et al.* lassen vermuten, dass der *Switch I* unterschiedliche Konformationen im aktiven und inaktiven Rheb einnimmt.[101] Eine große Differenz bei den kleinen GTPasen besteht in der *Switch II*-Region. In der Kristallstruktur ist der *Switch II* im GTP- und GDP-gebundenen Rheb ungeladen und nur die Aminosäuren Prolin 71 bis Serin 75 bilden eine Helix-ähnliche Struktur aus, die aber kürzer ist als die in Ras gefundene Helix.[52, 104] Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass der *Switch I* und *II* zwei oder mehrere unterschiedliche stabile Konformationen eingehen kann. Für diese strukturelle Flexibilität wird vermutet, dass sie funktionell relevant für den GTP/GDP-Zyklus und für die Bindungsspezifität der GAP- und GEF-Proteine ist.[52, 108, 110, 111] Die Differenzen zwischen der *Switch II*-Konformation in Rheb und Ras sind vermutlich mit der unterschiedlichen Aminosäuresequenz erklärbar. Das Phenylalanin 70/Prolin 71/Glutamin 72-Motiv in Rheb und R15G und S16G im *P-Loop* ist in Ras nicht vorhanden. Der Konformationsplatz im *Switch II* von Rheb ist durch die Limitierung des Winkels von Prolin 71 eingeschränkt. Die unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung des

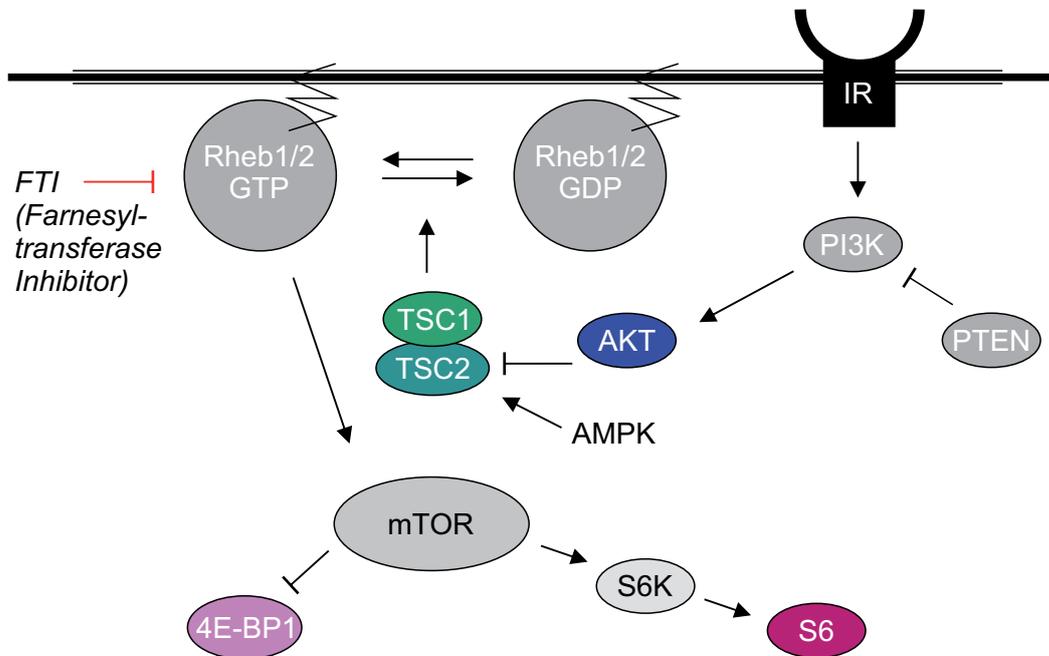
*P-Loops* könnte mit der strukturellen Konformation der *Switch* II-Region von Rheb verknüpft sein und auf einen anderen intrinsischen Hydrolysemechanismus deuten.[101] Rheb ist ähnlich wie Ras in vielen zellulären Prozessen, wie dem Wachstum, der Proteintranslation, der Zelldifferenzierung, der Proteinbiosynthese und der Autophagozytose beteiligt.[102, 112–115] Die aufgezählten Effekte werden über den mTOR-Signaltransduktionsweg übertragen.[101]

mTOR ist ein Multiproteinkomplex aus mTORC1 und mTORC2, die sich funktional und strukturell unterscheiden.[116, 117] Eine Vielzahl von essentiellen Zellprozessen, wie die Proteinbiosynthese, Autophagie oder auch die Nährstoffaufnahme, werden durch mTORC1 reguliert, wohingegen mTORC2 die Organisation, das Zellüberleben und die Synthese von Lipiden steuert. Die Nährstoffsensitivität kommt nur bei mTORC1 vor, wohingegen die Sensitivität für Rapamycin und Wachstumsfaktoren für beide Proteinkomplexe vorliegt.[117] mTORC1 gilt als ein positiver Regulator für das Zellwachstum, indem es die Autophagozytose (Abbau von Zellbestandteilen) verhindert und die Translation induziert.[117]

Beide Nukleotidformen von Rheb (Rheb GTP und Rheb GDP) als auch nukleotidfreies Rheb können mTOR binden. Allerdings besitzt die nukleotidfreie Form die stärkste Bindung. *In vitro* kann aber nur aktives Rheb (Rheb GTP) die Kinasenabfolge von mTOR aktivieren. GDP-gebundenes Rheb und nukleotidfreies Rheb zeigen dagegen keine Aktivierung des Signalwegs.[118, 119] Im Insulin/TOR/S6K-Signaltransduktionsweg (Abbildung 1.10) interagiert Rheb mit Akt (Proteinkinase-B) und aktiviert die Phosphorylierung von S6K (Protein-S6-Kinase). Rheb ist ebenso im *Tuberous Sclerosis Complex* (TSC) involviert.[102] Insulin und andere Wachstumsfaktoren regulieren die GTP-Beladung von Rheb durch die Inhibierung des *Tuberous Sclerosis Complex* (TSC1/TSC2-Komplex oder auch Hamartin/Tuberin-Komplex).[101] Tuberöse Sklerose ist eine genetische Erkrankung, die mit Krämpfen und mentaler Retardierung einhergeht und in gutartigen Tumoren, zum Beispiel im Gehirn, Niere, Lunge oder auch in der Haut, lokalisiert ist. Der Komplex aus TSC1/TSC2 ist ein GTPase aktivierendes Protein (GAP) für Rheb und gilt als Ursache für die Erkrankung.[102]

Ein potentielles GEF-Protein für Rheb wird in der Literatur umstritten diskutiert. In *Drosophila* wurde ein vermutliches GEF gefunden, welches als TCTP (*translationally*

*controlled tumor protein*) bezeichnet wird.[120] Verschiedene Studien lieferten aber unterschiedliche Ergebnisse. Auf der einen Seite wird eine schwache Bindung zwischen Rheb und TCTP beschrieben, wohingegen andere Studien keine bzw. eine gegenteilige Interaktion festgestellt haben.[121–123]



**Abbildung 1.10:** Schematische Darstellung des Insulin/mTOR/S6K-Signaltransduktionswegs, in dem Rheb eine wichtige Rolle spielt. Rheb reguliert mTOR *upstream*- und Akt *downstream*-seitig. Durch eine Insulin- oder IGF1-Aktivierung wird PI3K aktiviert, was eine weitere Aktivierung von Akt zur Folge hat. Akt phosphoryliert Tsc2 und inhibiert die negative Regulation von Rheb. Dies führt dann zu einer Anreicherung von aktivem GTP-gebundendem Rheb, welches wiederum mTOR aktiviert. Tsc2 wird auch durch AMPK reguliert. Farnesyltransferase Inhibitoren können die Aktivierung des Insulin/mTOR/S6K-Signaltransduktionswegs durch das Blockieren der Rheb-Farnesylierung verhindern. Erstellt nach [102].

Durch Überexpression oder durch die oben genannten Mutationen des TSC1/TSC2-Komplexes kann Rheb als aktivierender Botenstoff des mTOR-Signalwegs in Abwesenheit von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren die Autophagie inhibieren. Dieser Prozess kann schlussendlich zum Zelltod führen.[115] Neben dem Einfluss von Rheb im mTOR-Signalweg wird auch aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen Rheb und H-Ras bzw. Rap1 eine physiologische Rolle im Ras-Raf-MAPK-Signalweg diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass Rheb B-Raf binden kann und so die Kinasefunktion inhibiert wird und dadurch werden die B-Raf-abhängigen Signalwege, wie die MAPK-

Aktivierung und die ELK-abhängigen Transkriptionswege, reduziert.[118, 124, 125] Die korrekte physiologische Funktion des mTOR-Signalweges im Zusammenspiel mit Rheb ist essentiell für den ganzen Organismus. Mehrere Gruppen haben gezeigt, dass eine Veränderung des Zusammenspiels zwischen dem Protein und dem Signalweg unter anderem einen Zusammenhang mit Parkinsonerkrankungen oder auch bei Multipler Sklerose aufweist.[114, 118, 126–132]

Eine weitere Kinase, die bei der Apoptose eine Rolle spielt, ist die ASK-1 (*apoptosis signal-regulating kinase-1*).[118] Die Ergebnisse von Karassek *et al.* lassen vermuten, dass die durch Rheb verstärkte Apoptose durch die ASK-1 Affinität vermittelt wird.[101] Mausmodelle wiesen bei neurodegenerativen Krankheitsbildern (Poly-Glutaminkrankheiten, Parkinson, Alzheimer oder auch ALS (*amyotrophic lateral sclerosis*) auf die essentielle Rolle der ASK-1-Kinase hin.[133]

Für beide GTPasen, Ras und Rheb, wurde eine erhöhte Aktivität des Signaltransduktionswegs in verschiedenen humanen Tumoren der Blase, des Gehirns, der Niere, der Haut und in vielen anderen Geweben gefunden.[134, 135] Die Annahme, dass *ras* und *rheb* nur reine Onkogene sind, hat sich in den letzten Jahren nicht bestätigt. Aufgrund der enormen Komplexität des Signaltransduktionsweges sind die beiden Gene mehr als nur Förderer der Mitose, der Differenzierung und des Zellwachstums. Ras und Rheb spielen auch eine wichtige Rolle bei der zellulären Degeneration. Die Beobachtungen, dass die Signalwege das Zellüberleben regulieren und auch eng mit der Regulation des Zelltods verknüpft sind, führen zu einem schützenden Mechanismus gegen die Zelltransformation.[136]

Die vielen Effekte, die durch aktives Ras und Rheb vermittelt werden, spiegeln die große Auswahl an Effektorproteinen wieder, zeigen aber auch, welche Signalwege durch ihre Aktivierung stimuliert werden.[137, 138] Es hat den Anschein, dass die Entscheidung, ob der Ras-Signaltransduktionsweg pro Wachstum oder pro Apoptose ist, abhängig von der Balance zwischen den nachgeschalteten aktiven oder deaktivierten Signaltransduktionswegen ist. Bei dem Rheb/mTOR-Signalweg scheint die Entscheidung darüber hingegen von der gesamten zellulären Umgebung abhängig zu sein. Es wird interessant sein zu sehen, wie Ras und Rheb miteinander oder gegeneinander interagieren.[78] In HeLa-Zellen wurde schon beobachtet, dass Ras die durch Rheb verstärkte Apoptose

vermindern kann.[101] Um dies zu bestätigen, sind aber weitere ausführliche Untersuchungen notwendig.[78]

Im normalen Organismus, unter bestimmten toxischen Stressbedingungen, kann Rheb zu einem Apoptose-Effektorprotein wechseln. Karassek *et al.* haben fünf physiologische oder pathophysiologische Bedingungen aufgezählt, in denen Rheb ein Apoptose-Effektor ist [101]:

- Während der Unterversorgung des Gehirns mit Blut unter excitotoxischen Glutamat-Bedingungen kommt es zu einer enormen Calcium-Überladung und zum neuronalen Zelltod.[139]
- Während ER-Stress durch die toxische Ansammlung von Proteinen.[140]
- Während des Wachstums von humanen bösartigen Gliomazellen, bei denen Rapamycin den durch Hypoxie induzierten Zelltod schützt.[141]
- In einem Mausmodell bei einer Alzheimer Erkankung, bei der Rapamycin die kognitiven Defizite aufhebt und das Amyloid- $\beta$  Level reduziert.[142]
- Während der normalen Alterung, führt die Behandlung von Mäusen mit Rapamycin im späten Alter zu einer Verlängerung der Lebenserwartung.[143]

In diesen fünf physiologischen bzw. pathophysiologischen Situationen kann der mTOR-Signaltransduktionsweg zwischen dem Wachstums-kontrollierten Signalweg und dem Apoptose fördernden Signalweg wechseln.[101]

Wie auch bei Ras ist die korrekte Farnesylierung von Rheb an der CAAX-Region essentiell für die Funktionalität des Proteins. Diese sorgt für die Lokalisierung an der Membran und induziert so die Aktivierungsfähigkeit für die Signaltransduktionswege.[78, 100].

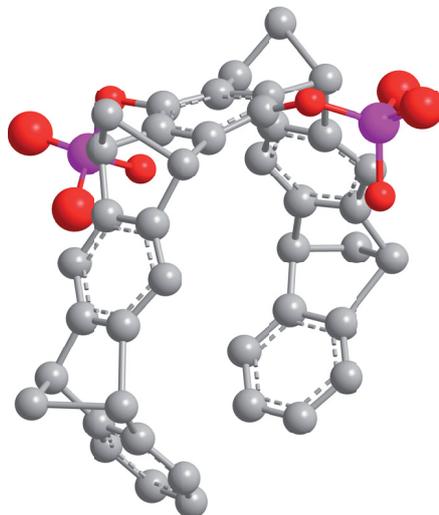
Die Wichtigkeit der Farnesylierung für die korrekte Funktionsfähigkeit wurde durch verschiedene Experimente gezeigt. Im Gegensatz zu Ras ist Rheb nicht an die Plasmamembran gebunden, sondern an der Endomembran des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats lokalisiert.[144, 145] Dies wird auch durch die Interaktion zwischen Rheb und mTOR bestätigt, weil mTOR in den Endomembranen lokalisiert

ist.[145] Die letzten drei Aminosäuren werden nach der Prenylierung des Rhebs proteolytisch abgespalten und es erfolgt eine Carboxymethylierung des Proteins. Allerdings scheint die Aminosäurenabspaltung keine wichtige Rolle bei der korrekten Membranlokalisation zu spielen. Die Bindung an die Endomembran ist durch das Fehlen des methylierten Enzyms Icmt (*Isoprenylcysteine carboxymethyltransferase*) gestört.[145] In *S. cerevisiae* ist Rheb an der Arginin-Aufnahme und an der Canavanin-Sensibilität beteiligt, die eine korrekte Farnesylierung voraussetzt. Eine Mutation in der CAAX-Region führt zum Verlust dieser Funktionen.[102, 146] Ähnliche Beobachtungen wurden auch in *S. pombe* gemacht.[102, 147] In Säugetierzellen ist Rheb an der Aktivierung der ribosomalen Protein-S6-Kinase beteiligt, die ebenfalls eine funktionsfähige CAAX-Region benötigt. CAAX-Mutanten von Rheb haben gezeigt, dass sie die Kinase nicht aktivieren können.[102, 148, 149] Durch die zentrale Rolle von Rheb beim mTOR-Signaltransduktionswegs und die dadurch resultierende Auswirkungen auf das Zellwachstum machen Rheb als möglichen Zielansatz für Krebstherapien interessant. Ein möglicher Therapieansatz für die Inhibierung von Rheb ist das Blockieren der Membranbindung durch fehlende Farnesylierung durch so genannte Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTIs = *farnesyltransferase inhibitors*).[102] Nach Behandlung von Zellen mit Farnesyltransferase-Inhibitoren wird die Aktivierung des Insulin/TOR/S6K-Signaltransduktionswegs blockiert.[149, 150]

## 1.5 CLR01 - Ein molekularer *Tweezer*

Lysin und Arginin spielen bei biologischen Prozessen, wie zum Beispiel bei der Genregulation, beim Vesikeltransport oder auch bei der bakteriellen Zellwandsynthese eine wichtige Rolle. Die Aminosäuren wurden aber auch in Signalpeptidsequenzen bei Alzheimererkrankungen gefunden. Die Entwicklung von künstlichen, spezifischen und selektiven Arginin- und Lysin-Rezeptoren ermöglichen eventuell eine neue Therapieform bei Amyloiderkrankungen.[151] Fokkens *et al.* haben einen künstlichen molekularen *Tweezer* mit einer hohen Affinität für Lysin- und Argininreste synthetisiert.[151] Die Dissoziationskonstante liegt bei etwa 20  $\mu\text{M}$  und die Affinität für die Bindung von Arginin liegt etwa um den Faktor 10 darunter.[151, 152] Die beiden strukturellen

Hauptmerkmale des *Tweezers* sind die elektronenreiche Ringfläche, die sich zu einem Hohlraum zusammenfügt, und die beiden peripheren anionischen Phosphatgruppen (Abbildung 1.11).[151] Die detaillierte Synthese ist in Referenz [151] dargestellt.

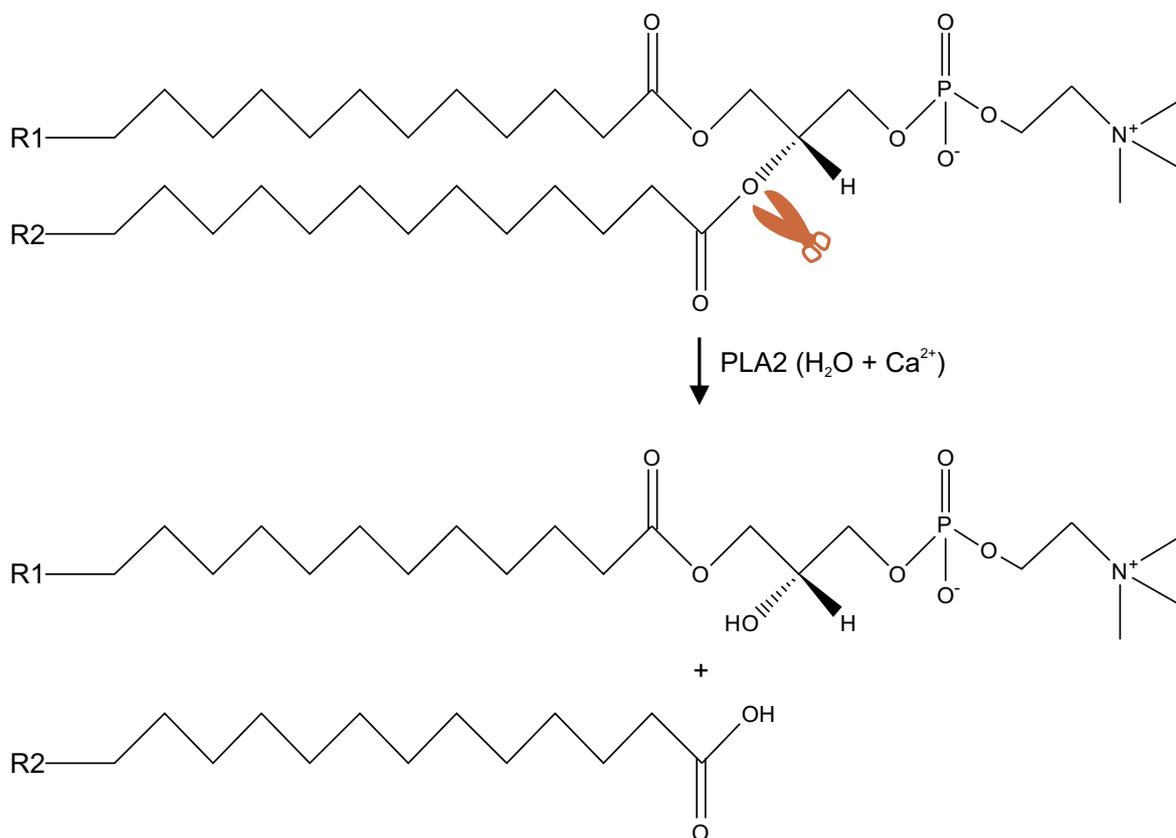


**Abbildung 1.11:** *Ball-and-Stick*-Darstellung des künstlichen molekularen *Tweezers* CLR01. Dargestellt sind die Kohlenstoff- (grau), Sauerstoff- (rot) und Phosphoratome (pink). Die Wasserstoffatome wurden der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt. Erstellt mit ChemBio3D Ultra 12.0.

Die Interaktion der aliphatischen Aminosäurekette mit der Bindungstasche des *Tweezers* ähnelt dem Bindungsmechanismus von Pseudorotaxanen. Dabei wird ein Molekül (Lysin) innerhalb eines Ringes (Bindungstasche des *Tweezers*) durch nicht-kovalente Bindungen gehalten.[151] Die selektive Bindung von Lysin wird durch eine Kombination von hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen erreicht. Lysin ist die einzige Aminosäureseitenkette, die beide Interaktion ausführen kann. Über hydrophobe Wechselwirkungen interagiert die Butylenkette mit dem Seitenarm des molekularen *Tweezers*, während die  $\epsilon$ - $\text{NH}_3^+$ -Gruppe des Lysins (bei Arginin: Guanidiniumgruppe) mit den Phosphatresten des *Tweezers* über elektrostatische Coulomb- bzw. Repulsionskräfte wechselwirkt.[152–154] Dieser ungewöhnliche Bindungsmechanismus sorgt für die hohe Affinität gegenüber Lysin- und Argininresten.[151] Der Interaktionstyp des *Tweezers* wird auch bei der Interaktion von frühen amyloidogenen Strukturen benutzt.[155] Aufgrund seiner Affinität und seiner Bindungseigenschaften wird der molekulare *Tweezer* in der Literatur als potentieller Inhibitor der Aggregation und Toxizität von amyloidogenen Proteinen diskutiert.[151, 152, 155, 156]

## 1.6 PLA2 - Eine Phospholipase

Eine weitere wichtige Klasse der Membranproteine sind Phospholipasen. Sie werden in zwei Gruppen aufgeteilt. Zu der ersten Gruppe gehören die sekretorischen Phospholipasen (sPLA2) mit einem Molekulargewicht von 14 bis 16 kDa. Die zweite Gruppe bilden die intrazellulären Phospholipasen mit einem Molekulargewicht von 80 bis 85 kDa.[157] Neben der katalytischen Funktion bei der Hydrolyse von *sn*-2-Fettsäuren von Membranphospholipiden (Abbildung 1.12) spielt die Phospholipase A2 (PLA2) eine weitere wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und bei dem transkriptionalen Signalweg.[157]



**Abbildung 1.12:** Schematische Darstellung einer durch PLA2 katalysierten Reaktion. Dargestellt ist die Hydrolyse des *sn*-2 Esters vom Phospholipid zur freien Fettsäurekette (R2) und dem Lysophospholipid (R1). Erstellt mit ChemBioDraw Ultra 12.0.

Das Hauptstrukturmerkmal sind drei  $\alpha$ -Helices, bei denen zwei mit einem antiparallelen  $\beta$ -Sheet verbunden sind. Diese Anordnung sorgt für eine Ausbildung eines hydrophoben Kanals von der Proteinoberfläche bis zum aktiven Zentrum und ermöglicht

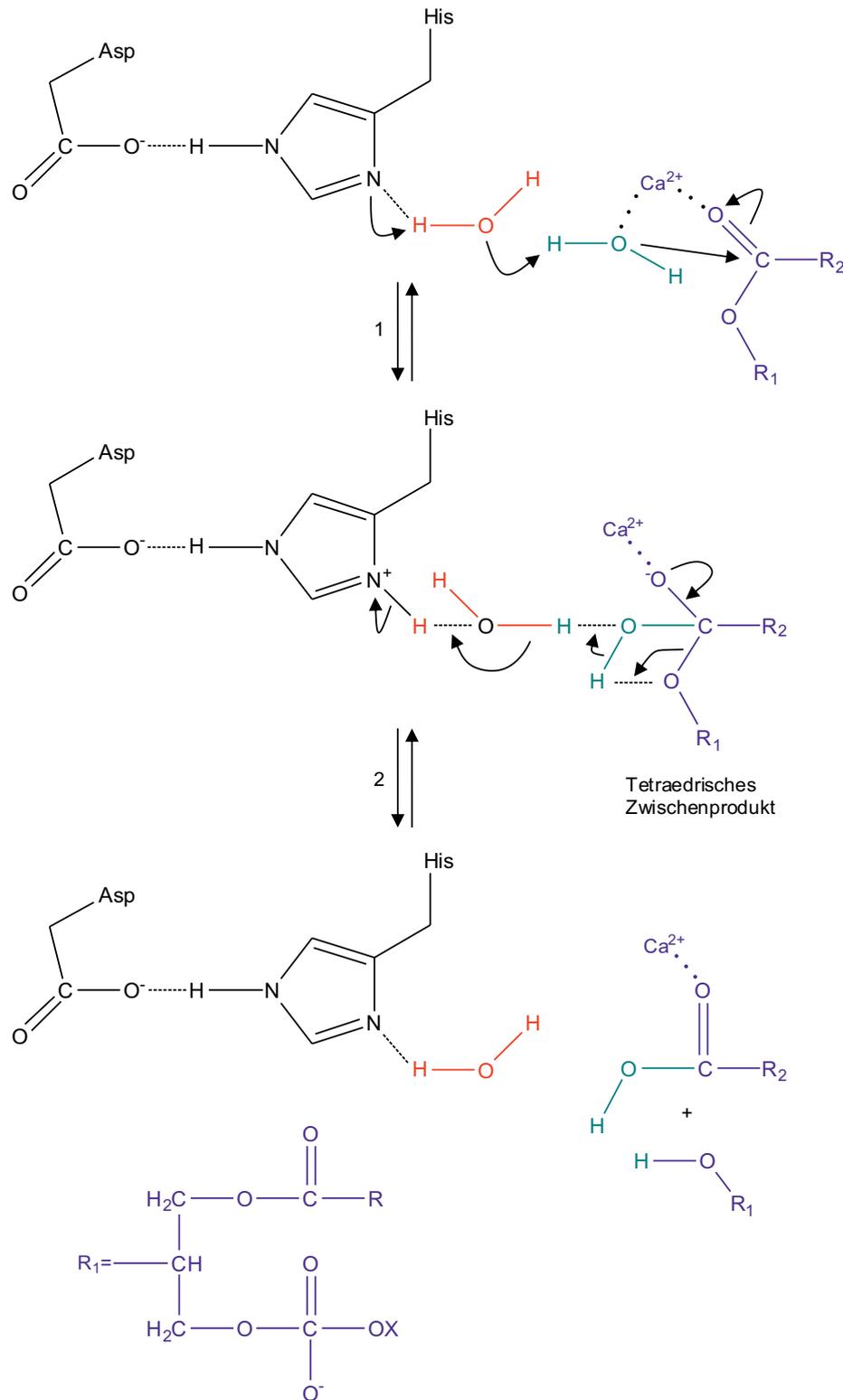
eine Bindung eines Lipidmoleküls innerhalb des aktiven Zentrums. Zu dem Hauptstrukturmerkmal gehören ebenso die katalytische Aminosäureabfolge Asparaginsäure und Histidin, die Calciumbindungsschleife sowie die Bindungsstelle, die für die Lokalisation des Proteins an der Membran verantwortlich ist (Grenzflächenerkennungsregion (IRS = *interfacial recognition surface*)).[158] Die IRS bildet einen direkten Kontakt mit der Zielmembranoberfläche und den Neuro-Typ-Rezeptoren.[158–160] Nur an die Membran-Wasser-Grenzschicht-gebundenes PLA2 besitzt die oben beschriebene Hydrolyseaktivität. Dabei ist die Hydrolysesaktivität von verschiedenen physikochemischen Eigenschaften wie Membrankrümmung, Kompressibilität, lateraler Diffusion, Oberflächenladung und der Hydratisierung abhängig. [161, 162]

Die Enzyme der Phospholipase A2-Superfamilie sind an regulatorischen Prozessen beteiligt. Dabei interagieren sie direkt mit der Membran und verändern die chemische Zusammensetzung und den physikalischen Zustand über die Hydrolyse der *sn-2* Esterbindung des Phospholipids. Die frei werdende Fettsäurekette und das Lysophospholipid sind an dem zellulären Signal des Immunsystems beteiligt, welches eine Antwort auf eine bakterielle Infektion und Entzündung liefert.[163–168] Die Reaktion von PLA2 kann die lokale Zusammensetzung der Membran ändern oder die Zellstruktur zerstören. Dementsprechend spielt das Enzym eine wichtige Rolle bei der Degradation von alten oder geschädigten Zellen.[169] Wie auch die anderen in dieser Arbeit beschriebenen Proteine spielen die sekretorischen Phospholipasen eine Rolle bei einer Krebserkrankung. In Dickdarm-, Prostata-, und Lungentumoren sind die sekretorischen Phospholipasen überexprimiert.[170–172] Obwohl Phospholipase A2 ein wichtiges potentiell pharmakologisches *Drug target* darstellt, ist die genaue mechanistische Interaktion und die physiologische Funktion noch nicht genau verstanden.[173, 174] Sekretorische Phospholipasen wurden in Giften und im Pankreassaft von verschiedenen Tieren gefunden und lassen sich in drei Gruppen (I bis III) einteilen.[164, 175] Weitere Untergruppen lassen sich nach ihren funktionellen Eigenschaften, der Lokalisation der Disulfidbrücken, und der primären Struktur unterteilen.[175] Die in dieser Arbeit verwendete Phospholipase (bvPLA2: Gruppe III) ist Bestandteil des Bienengifts. Der katalytische Mechanismus ist ähnlich dem Mechanismus von Phospholipasen aus Säugetierzellen.[176] Neben der katalytischen Funktion ist die Phospholipase neurotoxisch und bindet spezifisch Neuro-

Typ Rezeptoren, die für die Neurotoxizität des Proteins zuständig sind.[159, 160] Scott *et al.* haben die Röntgenstruktur der Phospholipase bvPLA2 (14 kDa, 134 Aminosäuren) gelöst. Im kristallinen Zustand hat die Phospholipase einen  $\alpha$ -helicalen Anteil von 29 % und einen  $\beta$ -Faltblatt Anteil von 23 %. Die beiden Helices sind mit Disulfidbrücken verknüpft und bilden ein starres Gerüst, das mit der Calciumbindungsschleife und der C-terminalen Region mit den antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern über Disulfidbrücken kovalent gebunden sind.[158] Die Phospholipidbindung wird durch die Ausbildung eines hydrophoben Tunnels vermittelt. Der hydrophobe Tunnel ist nach der Enzym-Membran-Bindung weiter geöffnet und das Phospholipid kann sich durch den Tunnel zu der aktiven Seite des Enzyms bewegen. Die aktive Seite befindet sich auf der Oberseite einer Aushöhlung in der Mitte des Enzyms.[169, 177] Dieser Prozess wird durch hydrophobe Aminosäuren entlang des Tunnels stabilisiert. Die ungefähre Distanz von der Membran zu der aktiven Seite des Enzyms beträgt etwa 1,5 nm. Dies entspricht einer halben Länge eines Substratlipidmoleküls.[178] Die Bindung eines Phospholipids wird auch als Grenzflächenaktivierung bezeichnet.[161] Für die Grenzflächenaktivierung haben sich zwei verschiedene Modelle etabliert. Bei dem Enzym-Modell wird das Enzym durch eine Strukturänderung nach der Bindung an die Lipid-Wasser Oberfläche aktiviert.[179] Bei dem Substrat-Modell wird angenommen, dass die physiko-chemischen Eigenschaften des Lipids die Schlüsselrolle für die Enzymaktivierung spielen.[162] Strukturanalysen haben gezeigt, dass die Phospholipasen A2 eine identische katalytische Region haben, aber unterschiedliche Grenzflächenerkennungsregionen besitzen. Die unterschiedlichen Grenzflächenerkennungsregionen regulieren die Bindungsaffinität zu einer Vielzahl an Phospholipiden.[180, 181] Es wurde gezeigt, dass 10 bis 20 Aminosäuren von der Phospholipase A2 mehrere Phospholipide der Membranoberfläche binden.[182] Abhängig von der Isoform können 20 bis 40 Phospholipide an der Bindung beteiligt sein. Über den genauen Interaktionstyp, einschließlich elektrostatischer Bindung, Wasserstoffbindungen und hydrophoben Interaktionen, wird noch diskutiert.[182, 183] Verschiedene Untersuchungen haben für bvPLA2 gezeigt, dass es über einen nicht-elektrostatischen Mechanismus bindet und die Membran nicht wesentlich durchdrungen wird, im Gegensatz zu anderen Phospholipasen.[182, 184, 185] Der enzymatische Prozess kann mit Hilfe der Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben

werden.[186] Der initiale Schritt ist die reversible Bindung des Enzyms (E) an die Membranoberfläche, so dass ein aktiviertes Enzym ( $E^*$ ) entsteht, welches ein Phospholipid (S) bindet. Der aktive Membran-gebundene Enzymkomplex kann ohne den Substrat-gebundenen Komplex ( $E^*$ ) bzw. ohne den Produktkomplex (Hydrolyseprodukte) ( $E^*P$ ) vorliegen. Diese multiplen katalytischen Zyklen ohne die Desorption des Enzyms in der wässrigen Phase werden auch als *scooting mode catalysis* bezeichnet.[187] Die Substratspezifität wird durch zwei Faktoren reguliert, der erste ist die Bindung des Enzyms an die Membranoberfläche ( $E^*$  zu E, Gleichgewichtskonstante  $K_d$ ). Der zweite Faktor ist die relative Hydrolyserate der verschiedenen Substratarten von  $E^*$ , die durch die relative Grenzflächen spezifische Konstante ( $k^*_{cat}/K^*_M$ ) kontrolliert wird.[188]

Scott *et al.* haben den katalytischen Mechanismus der chemischen Hydrolysereaktion von bvPLA2 beschrieben. PLA2 katalysiert die Hydrolyse durch die Abstraktion eines Protons von einem katalytischen Wassermolekül, gefolgt von einem nukleophilen Angriff der *sn-2* Bindung des Phospholipids.[189] Andere Studien haben einen alternativen Mechanismus vorgeschlagen, bei dem zwei Wassermoleküle an der Bildung und der späteren Aufspaltung eines tetraedrischen Zwischenprodukts beteiligt sind (Abbildung 1.13).[190, 191] Die Bildung und Spaltung des tetraedrischen Zwischenprodukts ist Calcium-abhängig und das an der Spaltung beteiligte Wassermolekül wird durch Wasserstoffbrückenbindung von einem Histidin aktiviert. Das Histidin ist ein Protonenakzeptor, welcher das Wasser für die Protonendonation während der Spaltung des tetraedrischen Zwischenprodukts stabilisiert. Dieser Schritt wird durch eine negativ geladene Asparaginsäure unterstützt. Zusätzlich zur Koordinierung des Wassers, sorgt das Calcium für eine Polarisierung und Orientierung der *sn-2* Carbonylsauerstoffgruppe des Phospholipids. Durch diese Reaktion wird das tetraedrische Intermediat stabilisiert. Nach der Spaltung des tetraedrischen Zwischenprodukts wird eine Fettsäure und ein Lysophospholipid freigesetzt. Die Spaltungsreaktion gilt als limitierender Schritt bei der gesamten Reaktion (Abbildung 1.13).[190] In Abbildung 1.13 ist der oben erwähnte Reaktionsmechanismus dargestellt.



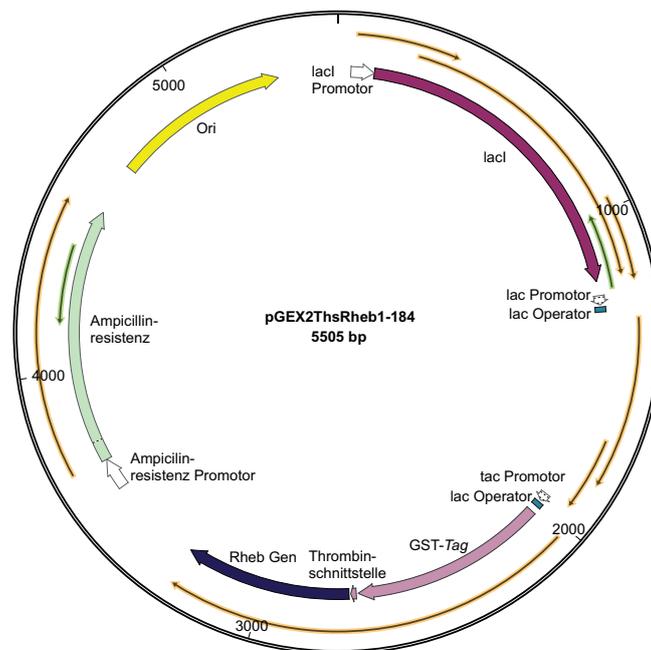
**Abbildung 1.13:** Schematische Darstellung die durch Wasser unterstützte katalytische Reaktion von PLA2. Ein durch Calcium koordiniertes Wassermolekül gilt als ein mögliches angreifendes Nukleophil. Ein zweites Wassermolekül ist an der Bildung und der Aufspaltung des tetraedrischen Zwischenprodukts beteiligt. Das katalytische Histidin ist ein Protonenakzeptor, der das Wasser während der Spaltung des tetraedrischen Zwischenprodukts stabilisiert. Der Reaktionsmechanismus ist oben im Text näher beschrieben. Erstellt mit ChemBioDra Ultra 12.0.



## 2 Experimentelle Methoden

### 2.1 Materialien

Der für die Rheb-Expression verwendete Vektor pGEX2ThsRheb1-184 ist in Abbildung 2.1 dargestellt.



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung des *full-length*-Vektors pGEX2ThsRheb1-184 mit dem humanen Rheb-Gen und dem N-terminalen GST-Tag. Als Antibiotikaresistenz wird Ampicillin verwendet. Erstellt mit SnapGene.

#### Proteinsequenz (*full-length*: 1-184) des humanen Rheb-Proteins:

MPQSKSRKIAILGYRSVGKSSLTIQFVEGQFVDSYDPTIENTFTKLITVNGQEYH  
 LQLVDTAGQDEYSIFPQTYSIDINGYILVYSVTSIKSFEVIKVIHGKLLDMVGKVQ  
 IPIMLVGNKKDLHMERVISYEEGKALAESWNAAFLESSAKENQTAVDVFRRIILE  
 AEKMDGAASQGKSSCSVM

**LB-Medium**

- 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Trypton, 10 g/L NaCl, pH 7,0

**TB-Medium**

- 12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 4 mL Glycerol auf 900 mL destilliertes Wasser + 2,31 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 12,54 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  in 100 mL destilliertes Wasser

**Antibiotikaresistenzen**

- Ampicillin: 1 g/10 mL destilliertes Wasser (1:1000 Verdünnung für die Kulturen)
- Chloramphenicol: 0,34 g/10 mL Ethanol (1:1000 Verdünnung für die Kulturen)

**Bindungspuffer (PBS-Puffer) für die GSTrap-Säule**

- 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,3

**Elutionspuffer für die GSTrap-Säule**

- 50 mM Tris, 20 mM red. Glutathion, pH 8,0

***In vitro* Farnesylierungspuffer**

- 30 mM Tris, 20 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 1 mM DTE, pH 7,8

**Lagerungspuffer für die Benzamidin-Säule**

- 20% Ethanol in 0,05 M Acetatpuffer, pH 4,0

**Puffer für die Triton X-114-Extraktion**

- 30 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,5

**Trenngelpuffer**

- 1,5 M Tris, 4 (w/v)% SDS, pH 8,8

**Sammelgelpuffer**

- 0,5 M Tris, 4 (w/v)% SDS, pH 6,8

**5x Laufpuffer für SDS-PAGE**

- 120 mM Tris, 782 mM Glycerin, 17 mM SDS

**15 %iges Trenngel**

- 2800  $\mu\text{L}$  40% Acrylamid (29:1), 1875  $\mu\text{L}$  Trenngelpuffer, 2825  $\mu\text{L}$  destilliertes Wasser, 100  $\mu\text{L}$  10% APS, 5  $\mu\text{L}$  TEMED

**15 %iges Sammelgel**

- 250  $\mu\text{L}$  40% Acrylamid, 625  $\mu\text{L}$  Sammelgelpuffer, 1625  $\mu\text{L}$  destilliertes Wasser, 50  $\mu\text{L}$  10% APS, 3,5  $\mu\text{L}$  TEMED

**Protein-Marker für SDS-PAGE**

- SigmaMarker *Low Range, Molecular Weight* 6,500 - 66,000 Da, M3913

**4x Laemmli Probenpuffer für SDS-PAGE**

- 12 % SDS, 6 %  $\beta$ -Mercaptoethanol, 30 % Glycerol, 0,05 % *Coomasie blue*, 150 mM Tris

**Färbelösung für SDS-Gele**

- 0,025 % *Coomasie blue*, 10 % Essigsäure

**Entfärbelösung für SDS-Gele**

- 10 % Essigsäure

**verwendeter Konzentrator**

- Amicon Ultra 15 *Centrifugal Filters Units* MWCO 3000 Da

**verwendete Proteinaufreinigungssäulen für das Äktaprime-System**

- GSTrap FF Säule 5 mL
- HiTrap Benzamidin FF Säule 5 mL

**Puffer für die Rasterkraftmikroskopie-Experimente**

- 20 mM Tris, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4
- 20 mM Tris, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4
- 20 mM Tris, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4
- 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,6
- 20 mM Tris, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$  oder 0,5 mM EGTA, pH 7.4

**Puffer für die Fluoreszenzanisotropie-Experimente**

- 20 mM Tris, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4
- 0,1 µM POPOP in Ethanol

**Puffer für die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie-Experimente**

- Hepes-Puffer: 10 mM Hepes, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4
- HBS-EP-Puffer: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% v/v Surfactant P20, pH 7.4
- Isopropanol/50 mM NaOH 2:3
- 40 mM β-D-Glucopyranosid
- 20 mM Chaps, 100 mM NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>
- *Desorb*-Puffer: 0,5 % SDS, 50 mM Glycin, pH 9,5
- *Sanitize*-Puffer: verdünnte Hypochloridlösung
- *Super Clean*-Puffer: 0,5 % SDS, 6 M Harnstoff, 1 % Essigsäure, 0,2 M Natriumcarbonatlösung

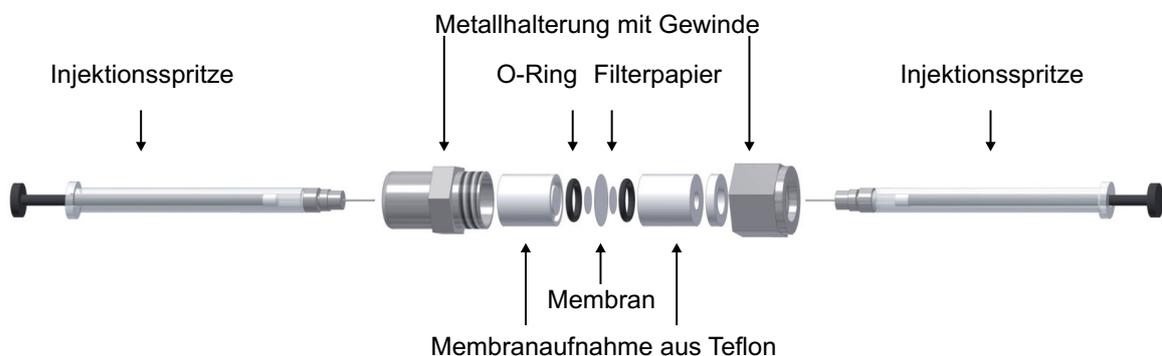
**Verwendete Lipide**

- DOPC (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin)
- DOPG (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) Natriumsalz)
- DOPS (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serin)
- DPPG (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) Natriumsalz)
- DPPC (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin)
- Chol (Cholesterol)
- SM (Sphingomyelin)

## 2.2 Lipidvesikel Präparation

In diesem Abschnitt wird die Lipidvesikelpräparation an dem Beispiel einer anionischen *Raft*-Lipidmischung beschrieben. Für die weiteren in dieser Arbeit verwendeten Lipidmischungen wurde der jeweilige Puffer verwendet. Die Herstellung der Lipidvesikel erfolgte analog zu der anionischen Lipidmischung.

Für die Verwendung der Modellmembransysteme wurden Stocklösungen von 10 mg/mL Lipid (DOPC, DOPG, DPPG, DPPC, Chol) in Chloroform/Methanol 4:1 (DPPG nur in Chloroform gelöst) hergestellt. Die fertige Lipidlösung hatte einen Proteinanteil von 1,94 mg (DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol 20:5:45:5:25 mol%). Das Chloroform wurde unter einem Stickstoffstrom verdampft. Über Nacht wurde die Lipidlösung im Vakuumtrockner getrocknet um sämtliche Lösungsmittelrückstände zu verdampfen. Der getrocknete Lipidfilm wurde für die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie-Messungen in 1 mL 10 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4 und für die Rasterkraftmikroskopie- und fluoreszenzspektroskopischen Messungen in 20 mM Tris, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4 gelöst, um eine Lipidkonzentration von 3 mM zu erhalten. Alle verwendeten Pufferlösungen wurden vorher durch einen 0,02 µm Filter filtriert. Nach dem Homogenisieren mit einem Laborrüttler wurde die Lipidlösung für 15 min in einem 65 °C warmen Wasserbad inkubiert und anschließend erfolgte eine Ultraschallbadbehandlung für 10 min. Danach wurde die Lipidlösung mit flüssigen Stickstoff eingefroren. Nach fünf Frier-Tau-Zyklen und Ultraschallbadbehandlungen hatten sich große multilamellare Vesikel gebildet.



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung des verwendeten Extruders von Avanti Polar Lipids. Dargestellt sind alle Einzelkomponenten mit den zwei Injektionsspritzen. Erstellt mit Autodesk Inventor Professionell 2016.

Mit einem Extruder (Abbildung 2.2) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) wurden bei einer Temperatur von 65 °C große unilamellare Vesikel (*LUV = Large Unilamellar Vesicles*) mit einer Größe von 100 nm geformt.[11, 192] Für die SPR-Messungen wurde die extrudierte Vesikellösung mit Puffer auf eine Konzentration von 0.5 mM verdünnt.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Proteinexpression von Rheb

Für die Expression von Rheb wurden 200 mL LB Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol versetzt und mit kompetenten *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL Zellen, die das Rheb-Plasmid tragen, angeimpft. Die LB-Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden sechs Kolben mit je 1,5 L TB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol versetzt und anschließend mit 25 mL Vorkultur angeimpft. Sobald die  $OD_{600nm}$  0,6 erreicht wurde, wurde mit 0,4 mM IPTG die Rheb-Expression induziert. Die Hauptkulturen wurden über Nacht bei 24 °C und 130 rpm im Schüttler inkubiert. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C, 6000 rpm für 15 min. Das erhaltende Zellpellet wurde zur Lagerung bei -80 °C eingefroren.

### 2.3.2 Proteinaufreinigung von Rheb

Die Aufreinigung erfolgte über den N-terminalen GST-*Tag* mit einer 5 mL GSTrap FF Säule (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland).[193] Für den Einsatz der GSTrap-Säule wurde eine Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min verwendet. Die GSTrap-Säule wurde mit 5 Säulenvolumina PBS-Puffer äquilibriert. Nach dem Auftragen des Proteins mit 1 mL/min wurde die Säule mit weiteren 5 bis 10 Säulenvolumina gewaschen (PBS-Puffer). Die Elution des Proteins erfolgte mit dem Elutionspuffer in 1 mL Fraktionen. Die einzelnen Rheb-Fractionen wurden zusammengefügt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte UV-spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 280 nm und wurde mittels Lambert-Beerschen Gesetz und dem Extinktionskoeffizient von  $16050 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bestimmt.[194–197]

Das Lambert-Beersche Gesetz ist definiert als:

$$E_{\lambda} = \lg \left( \frac{I_0}{I_1} \right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (2.1)$$

$E_{\lambda}$  ist die Extinktion.  $I_0$  und  $I_1$  sind die Intensitäten des einfallenden bzw. austretenden Lichts. Der Extinktionskoeffizient ist  $\varepsilon_{\lambda}$ , die Stoffmengenkonzentration ist  $c$  und die Schichtdicke der Küvette ist  $d$ .

### 2.3.3 *In vitro* Farnesylierung von Rheb

Ein 5 mL *in vitro* Farnesylierungsansatz (30 mM Tris, 20 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 μM ZnCl<sub>2</sub>, 1 mM DTE, pH 7,8) enthielt:

- 10 mg Rheb (500 nmol)
- 0,63 nmol (50 μg) Farnesyltransferase (Jena Bioscience, Jena, Deutschland)
- 500 nmol Farnesylpyrophosphat (Jena Bioscience, Jena, Deutschland)

Der *in vitro* Farnesylierungsansatz wurde für 3 h bei 30 °C unter Rühren inkubiert. Nach 30 min erfolgte eine zusätzliche Zugabe von 500 nmol Farnesylpyrophosphat.[47, 54]

### 2.3.4 Triton X-114-Extraktion von *in vitro* farnesyliertem Rheb

Für die Extraktion von *in vitro* farnesyliertem Rheb wurde eine 30 g/L Triton X-114 (Sigma) Lösung in 30 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,5 hergestellt. Auf Eis bildete sich eine klare Lösung. Anschließend wurde die Lösung in einem 37 °C warmen Wasserbad für 10 min inkubiert und danach bei 4300 rpm für 10 min bei 37 °C zentrifugiert. Zur besseren Phasentrennung wurde die Lösung kurz stehen gelassen. Anschließend wurde die obere wässrige Phase abgenommen. Die untere mit Triton X-114 angereicherte Phase wurde auf Eis gestellt und mit Puffer wieder aufgefüllt. Der Waschschrift mit Puffer und der anschließende Zentrifugationsschritt wurden dreimal wiederholt. So erhielt man eine angereicherte Triton X-114-Phase mit ca. 11 % Triton (Abbildung 2.3).[198]



**Abbildung 2.3:** Dargestellt ist die Phasentrennung zwischen der oberen wässrigen Phase und der unteren mit Triton X-114 angereicherten Phase.

Zur Kurz- bzw. Langzeitlagerung kann die Triton X-114-Phase bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert werden.[198]

Die Überlegung bei einer Triton X-114-Extraktion ist, dass Triton X-114 oberhalb von 30 °C Mizellen bildet. Das farnesylierte Rheb wird durch das Anfügen des Farnesylrests hydrophober und reichert sich in der Detergenzphase an. Das unfarnesylierte (hydrophile) Rheb bleibt in der wässrigen Pufferphase.

Für die Triton X-114-Extraktion von *in vitro* farnesyliertem Rheb wurden 2 mL der eiskalten 11 %igen Triton X-114-Lösung in ein 15 mL Falcon (F1) pipettiert. Der 5 mL Farnesylierungsansatz wurde vorsichtig hinzugegeben. Beim Durchmischen ist Schaumbildung zu vermeiden. Nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis (Lösung ist klar), erfolgte die Phasentrennung bei 37 °C im Wasserbad für 5 min. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (5 min, 30 °C, 4000 rpm, Ausschwingrotor: Beschleunigung: 9, Abbremsen: 1). In ein 15 mL Falcon (F2) wurde die obere wässrige Pufferphase mit dem unfarnesylierten Rheb und 1 mL Triton X-114-Lösung pipettiert. Die Lösung wurde vorsichtig durchgemischt und für 10 min auf Eis gestellt. Danach erfolgte die Phasentrennung für 5 min bei 37 °C im Wasserbad und die anschließende Zentrifugation. Die Schritte wurden so oft wiederholt, bis man drei Falcons F1, F2 und F3 mit jeweils einer Triton X-114-Phase mit farnesyliertem Rheb hatte. Die drei Triton X-114-Phasen (F1-F3) wurden vereinigt und mit kaltem PBS-Puffer gewaschen. Die Lösung wurde vorsichtig durchgemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Phasentrennung und Zentrifugation fanden wie oben beschrieben statt. Die obere wässrige Pufferphase wurde abgenommen und der Waschschrift wurde einmal wiederholt.[199–203]

Für die weitere Aufreinigung wurde die Triton X-114-Phase 1:10 mit kaltem PBS-Puffer verdünnt und mit 1 mL/min auf eine zuvor äquilibrierte (PBS-Puffer) GSTrap-Säule aufgetragen. Das farnesylierte Rheb bindet mit dem GST-*Tag* an die Säule, wohingegen das nicht ionische Detergenz nicht an die Säule adsorbiert. Das Triton X-114 konnte durch Waschen mit weiterem PBS-Puffer entfernt werden. Der Waschvorgang konnte durch eine Erhöhung der Absorption bei 280 nm beobachtet werden, weil Triton X-114 einen aromatischen Kohlenwasserstoffring besitzt, der UV-Licht absorbiert.

### 2.3.5 Enzymatisches Abschneiden des GST-*Tags* von Rheb

Das humane Rheb-Protein verfügt über eine Thrombin-Schnittstelle zwischen dem N-terminalen GST-*Tag* und dem Rheb. Thrombin ist eine Protease die spezifisch folgende Proteinabfolge Leu | Val | Pro | Arg || Gly | Ser als Erkennungssequenz besitzt (Schnittstelle ist zwischen Arg und Gly). Für einen enzymatischen Verdauungsansatz wurde ein 5 mL Mix aus 4,6 mL PBS-Puffer und 400 µL Thrombin hergestellt und mit einer Spritze auf die 5 mL GSTrap-Säule aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht für ca. 16 Stunden bei 25 °C.

Am nächsten Tag wurde eine HiTrap FF Benzamidin-Säule (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) [204] (bindet das Thrombin) in Reihe hinter die GSTrap-Säule geschaltet. Um den Lagerungspuffer der Benzamidin-Säule zu entfernen, wurde diese mit destillierten Wasser gewaschen und anschließend mit PBS-Puffer gespült (Flussgeschwindigkeit: 1 bis 2 mL/min, Säulenvolumina: 5 bis 10).

Das farnesylierte Rheb (ohne GST-*Tag*) wurde mit PBS-Puffer von der GSTrap-Säule und Benzamidin-Säule gewaschen und in 1 mL Fraktionen gesammelt (Flussgeschwindigkeit: 1 mL/min). Der GST-*Tag* konnte anschließend mit Elutionspuffer von der GSTrap-Säule eluiert werden. Das Thrombin wurde mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid von der Benzamidin-Säule gewaschen. Anschließend wird die GSTrap-Säule in 20% Ethanol und die Benzamidin-Säule im Lagerungspuffer gelagert.

### 2.3.6 SDS-PAGE

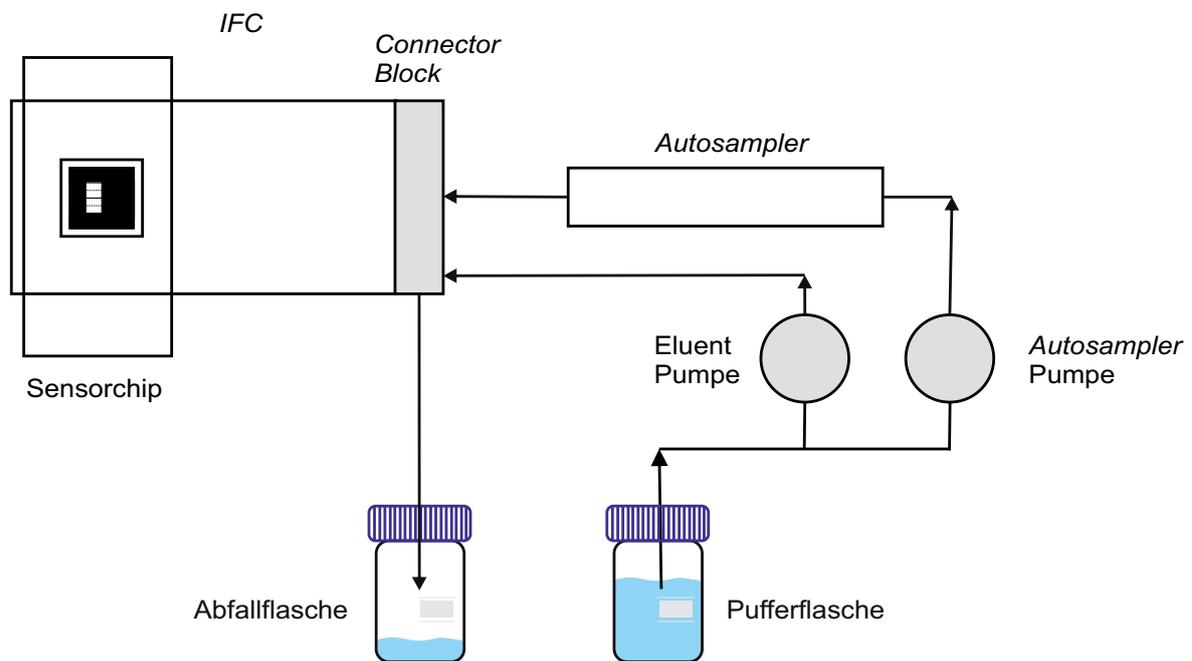
Zur Proteinanalyse wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) durchgeführt.[205] Das enthaltende SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat) sorgte für eine Maskierung der Proteineigenladung und somit erfolgte die Proteinauftrennung nur nach der jeweiligen Proteingröße bzw. dem Molekulargewicht.

Pro Proteinfraction wurden maximal 20  $\mu\text{L}$  Protein mit 5  $\mu\text{L}$  4x Laemmli-Puffer versetzt und in die Sammelgeltaschen aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde mit 80 V gestartet und auf 190 mV hochgesetzt sobald die Proben in das Trenngel gelaufen waren. Erreichte die Pufferlauffront das Ende des SDS-Gels, wurde die Gelelektrophorese beendet. Das SDS-Gel wurde für ca. 10 min in warmer Färbelösung inkubiert und anschließend mit warmer Entfärberlösung bis zum gewünschten Grad entfärbt.

## 2.4 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

### 2.4.1 Theoretischer Hintergrund

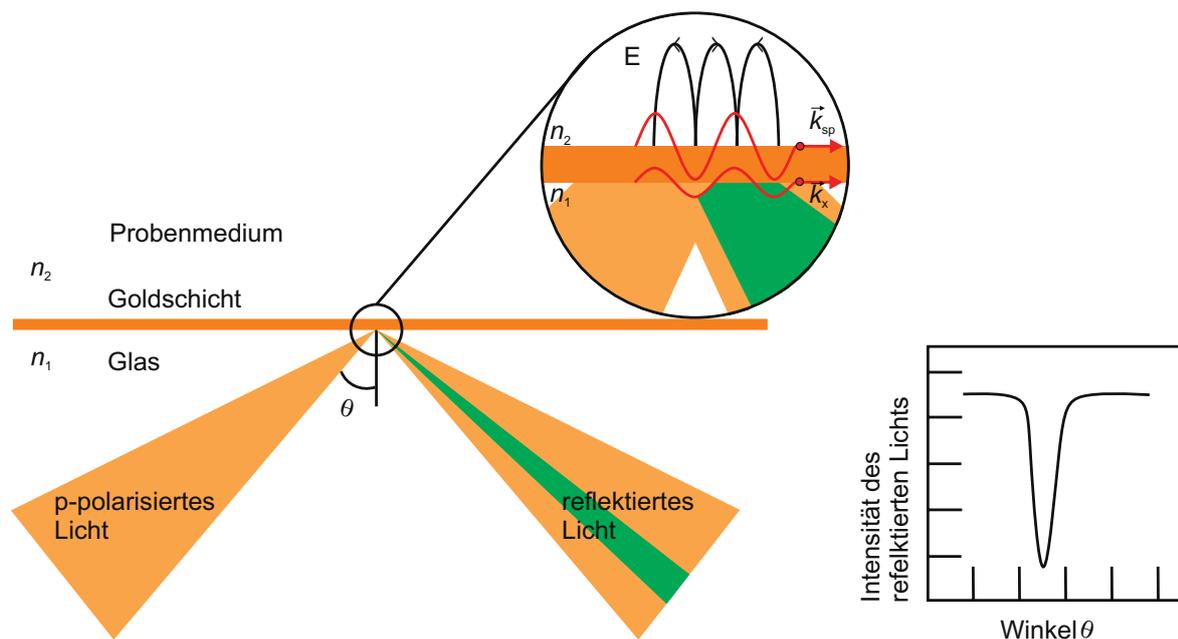
Das Messprinzip des verwendeten Biacore 3000 beruht auf der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR = *Surface Plasmon Resonance*). Dabei kann die Interaktion der zu untersuchenden Moleküle in Echtzeit und meistens ohne eine vorherige Markierung der Moleküle beobachtet werden. Die Immobilisierung eines der Moleküle (Ligand) findet auf der Sensorchipoberfläche statt, wohingegen das andere Molekül (Analyt) mit einem konstanten Fluss über die jeweilige Chipoberfläche geleitet wird. Aus dem Ergebnis der Messungen können kinetisch Assoziations- und Dissoziationskonstanten, die Konzentration des Moleküls als auch rein qualitative Aussagen über die Proteinbindung erzielt werden.[206, 207] Die Abbildung 2.4 zeigt ein Fließschema eines SPR-Systems mit den Hauptkomponenten (Puffersystem mit den beiden Pumpen, dem Probenautosampler und die Flusszelle (IFC = *Integrated Microfluidic artridge*)).



**Abbildung 2.4:** Fließschema eines SPR-Systems mit der Darstellung der zwei Pumpen, *Autosampler* und *Connector Block*, der die Proben und Puffer in die *IFC* injiziert. Erstellt nach [206].

Neben der Echtzeitmessung ist das geringe Probenvolumen ( $2 \mu\text{L}$ ) ein weiterer Vorteil der Oberflächenresonanzspektroskopie. Theoretisch können bis zu 192 Proben ( $2 \times$

96 Aluminium-Thermo-Probenhalter) analysiert werden. Das hier verwendete Biacore 3000 ermöglicht Messungen von Proteinkonzentrationen ab wenigen  $\text{pg}/\text{mm}^2$  und von Probengröße von 150 bis  $10^6$  g/mol und mehr Daltons. Das vielfältige Messspektrum reicht dabei von Messungen von Interaktionsstudien von Proteinen, Proteinkonjugaten, Nukleinsäuren, Lipiden, bis zu großen Proben wie Viren und ganze Zellen.[206, 207] Bei der Versuchsanordnung des Biacore 3000 besteht die Sensorchipoberfläche aus einem goldbedampften Glaschip.[208]



**Abbildung 2.5:** Schematische Darstellung des Messprinzips eines SPR-Geräts. In dem vergrößerten Bereich ist die Ausbreitung der evaneszenten Welle im Medium dargestellt. Licht, welches in ein Medium mit dem Brechungsindex  $n_1$  eindringt, erfährt an der Mediumgrenze interne Totalreflexion, vorausgesetzt, das Medium hat einen geringeren Brechungsindex  $n_2$ . Das evaneszente Feld  $E$  ist eine nicht-transversale Welle. Erstellt nach [209].

Der zu bindende Ligand kann über verschiedene Oberflächenmaterialien gebunden werden, dazu kann die Goldschicht standardmäßig mit einer Dextranoberfläche beschichtet werden.[206, 208, 210] Allerdings sind auch nicht-kovalente Bindungen biotinylierter Proteine über Streptavidin-Chips oder His-markierter Proteine über NTA-Chips möglich.[210] In dieser Arbeit wurde ein kommerziell erhältlicher L1-Sensorchip verwendet, bei dem die Lipide über hydrophobe Wechselwirkungen an die Oberfläche des

L1-Sensorchip binden.[211] Im nächsten Abschnitt wird die theoretische Funktionsweise eines SPRs näher beschrieben. Trifft zum Beispiel ein p-polarisierter Lichtstrahl oberhalb eines kritischen Winkels aus einem Medium mit einem höheren Brechungsindex ( $n_1$ ) auf die Grenzfläche zu einem Medium mit einem geringeren Brechungsindex ( $n_2$ ), so wird dieses Licht an der Grenzfläche totalreflektiert (TIR = *Total Internal Reflection*) und zurück in das Medium mit dem hohen Brechungsindex geleitet (Abbildung 2.5). Bei diesem Vorgang werden sogenannte Oberflächenplasmonen (longitudinale Elektronendichtewellen) an der ca. 50 nm dünnen Goldschicht erzeugt, die eine evaneszente Welle bilden, die in das Medium mit geringerem Brechungsindex reicht. Die Intensität dieser Oberflächenplasmonen nimmt exponentiell mit der Eindringtiefe ab.[209, 212–214] Die eindringenden Photonen können als Vektor mit zwei mathematischen Komponenten beschrieben werden. Die eine Komponente verläuft parallel zur Oberfläche, wohingegen die zweite Komponente senkrecht zur Oberfläche steht. Die Vektorengröße ist abhängig von dem Winkel des eintretenden Lichtstrahls. Die Oberflächenplasmonen können ebenfalls als Vektorgröße beschrieben werden. Es kommt nur dann zu einer Bildung der Oberflächenplasmonen, wenn die parallele Vektorgröße des eintretenden Lichts mit der Vektorgröße der Oberflächenplasmonen übereinstimmt. Das Ergebnis ist eine reduzierte Intensität des reflektierten Lichts (Oberflächenplasmonenresonanz) und die Intensität der evaneszenten Welle nimmt zu.[215]

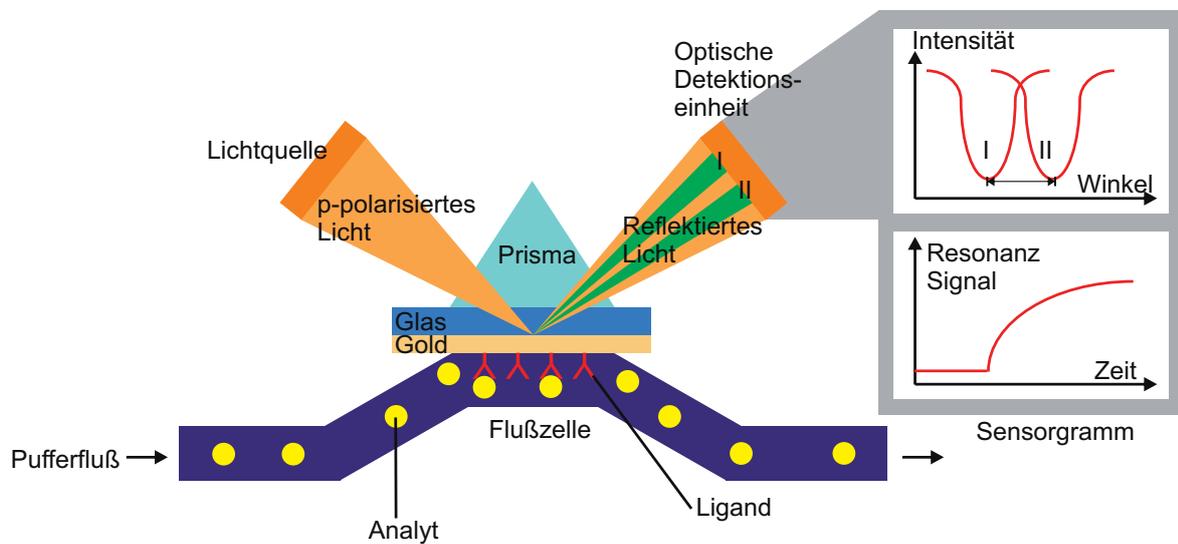
Die Feldvektoren der eintretenden Photonen ( $\vec{k}_x$ ) und der Oberflächenplasmonen ( $\vec{k}_{sp}$ ) sind definiert als:

$$\vec{k}_x = \frac{2 \cdot \pi}{\lambda} \cdot n_1 \cdot \sin\theta \quad (2.2)$$

$$\vec{k}_{sp} = \frac{2 \cdot \pi}{\lambda} \cdot \sqrt{\frac{n_{Gold}^2 \cdot n_2^2}{n_{Gold}^2 + n_2^2}} \quad (2.3)$$

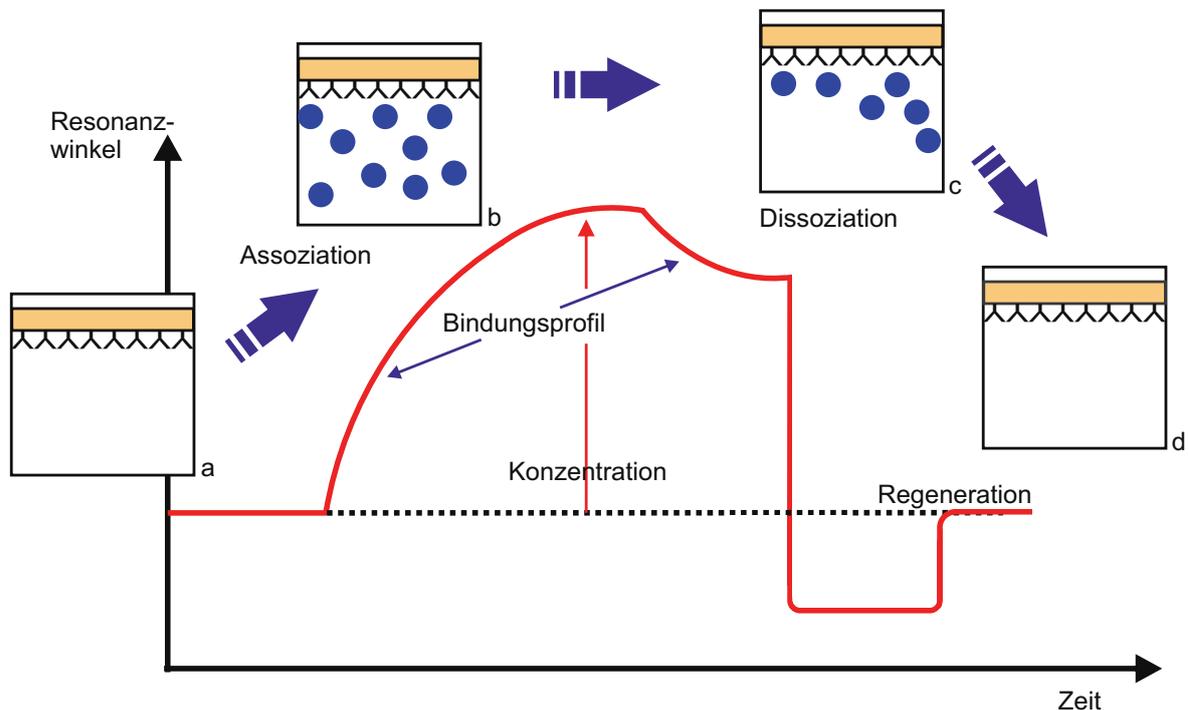
Die Wellenlänge ist  $\lambda$ , der Einfallswinkel des eintretenden Lichtstrahls ist  $\theta$  und der Brechungsindex der Goldschicht ist  $n_{Gold}$ . Die Brechungsindices der beiden Medien sind als  $n_1$  und  $n_2$  definiert. Durch die Bindung der Probe an die Chipoberfläche wird der Brechungsindex  $n_2$  erhöht, dadurch erhöht sich auch die Amplitude des Feldvektors

der Oberflächenplasmonen. Über die Änderung des Einfallswinkels des Lichts  $\theta$  und über die Wellenlänge des eintretenden Lichts kann die Resonanzbedingung erfüllt werden (Abbildung 2.5). Die Messeinheit bei der Oberflächenresonanzspektroskopie sind die *Resonance Units* (RU) (Abbildung 2.6). Dabei entsprechen 1000 RU einer Änderung des Resonanzwinkels von  $0,1^\circ$  bzw.  $1 \text{ ng/mm}^2$ . [214] Um eventuell auftretende Artefakte wie zum Beispiel die Rückbindung der Probe oder das Problem der Massentransferlimitierung zu unterbinden, werden hohe Flussraten (vom Hersteller empfohlen) verwendet. [214]



**Abbildung 2.6:** Schematische Darstellung des Messaufbaus eines SPR-Geräts. In gelb dargestellt ist der Analyt der an den Liganden (rot) bindet. Auf der Rückseite des immobilisierten Liganden befindet sich eine goldbedampfte Glasscheibe, auf die p-polarisiertes Licht mit Hilfe eines Prismas fokussiert wird. Als Ergebnis erhält man ein Intensität-zu-Winkelverhältnis, das intern in ein Sensorgramm (Resonanzsignal gegen die Zeit) umgerechnet wird. Erstellt nach [207, 209].

In Abbildung 2.7 sind die einzelnen Schritte einer SPR-Messung dargestellt. Eine Messung besteht aus mehreren Schritten (a bis d). Wird nur Laufpuffer injiziert (a), ändern sich die RU-Werte nicht. Erst mit dem Beginn der Assoziation (b) durch die Injektion des Analyten ändert sich der Resonanzwinkel. Der Analyt bindet an den immobilisierten Liganden und kann auch wieder abdissoziieren.



**Abbildung 2.7:** Schematische Darstellung eines Sensorgramms mit den verschiedenen Bindungsphasen. a) Pufferbasislinie, b) Injektion des Analyten und Bindung am immobilisierten Liganden → Signalanstieg, c) Dissoziation des Analyten → Signalabfall, d) Injektion der Regenerationslösung, alle Bindungsstellen des Liganden sollten wieder frei sein → Basislinie wird erreicht. Erstellt nach [207].

Durch das Stoppen der kontinuierlichen Zugabe des Analyten wird die Dissoziationsphase (c) eingeleitet. Durch die Zugabe von reinem Laufpuffer dissoziiert der Analyt vom Liganden und wird weggespült. Im Idealfall liegen nach der Interaktion alle Liganden wieder frei vor. Durch Regenerations- oder Waschlösung kann die Basislinie (d) wieder erreicht werden.

## 2.4.2 Praktische Durchführung

Die SPR-Messungen wurden mit einem Biacore 3000 (Biacore, Uppsala, Schweden, jetzt GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Neben den regelmäßigen Reinigungsschritten *Desorb* (0,5 % SDS, 50 mM Glycin, pH 9,5) und *Sanitize* (verdünnte Hypochloridlösung) wurde vor den jeweiligen Messungen ein komplettes Reinigungsprogramm *Super-Clean* durchgeführt.[216] Dabei wurde das SPR Gerät mit jeweils 0,5 % SDS, 6 M Harnstoff, 1 % Essigsäure und 0,2 M Natriumcarbonat gespült. Danach erfolgte ein Spülen mit ca. 40 °C warmem destilliertem Wasser. Zum Abschluss wurde das

*Sanitize* Reinigungsprogramm durchgeführt. Die beiden Reinigungsschritte *Desorb* und *Sanitize* bewirken eine Reinigung der Injektionsnadeln und der Flusszelle. Zusätzlich entfernt *Sanitize* bakterielle Rückstände aus dem System. Zur Überprüfung der Systemperformance nach der Reinigung wurde ein *System Check* mit 15 % Sucrose in HBS-EP-Puffer durchgeführt. Für die Untersuchungen der Protein-Membran-Wechselwirkungen wurde ein L1 Sensor Chip (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) verwendet, der eine lipophile Dextranschicht besitzt, an der die Lipide eine Membrandoppelschicht ausbilden können. Für die SPR-Messungen wurde das gesamte System viermal mit Hepes-Puffer gespült und die Chipoberfläche mit 30  $\mu\text{L}$  Isopropanol/50 mM NaOH (2:3), 10  $\mu\text{L}$  40 mM Oktyl- $\beta$ -D-Glukopyranosid, 30  $\mu\text{L}$  Puffer (20 mM Chaps, 100 mM NaCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ ) (Flussgeschwindigkeit 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) gereinigt. Alle Pufferlösungen wurden durch einen 0,2  $\mu\text{m}$  Filter filtriert und entgast. Die Proben wurden auf 10  $^\circ\text{C}$  herunter gekühlt und die SPR-Messungen fanden bei 25  $^\circ\text{C}$  statt.

Für die Vesikelimmobilisierung wurden 15  $\mu\text{L}$  der extrudierten Lipidvesikel (0,5 mM) zweimal mit einer Flussgeschwindigkeit von 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  injiziert. Danach erfolgte eine Injektion von 50  $\mu\text{L}$  Hepes-Puffer mit einer Flussrate von 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  und drei weiteren Injektionen von je 10  $\mu\text{L}$  25 mM NaOH mit einer Flussgeschwindigkeit von 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Zur Basislinienstabilisierung wurden zusätzlich 40  $\mu\text{L}$  Hepes-Puffer mit einer Flussrate von 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  injiziert. Danach wurden 40  $\mu\text{L}$  der Proteinlösung ( $c_{\text{K-Ras4B}} = 2 \mu\text{M}$ ,  $c_{\text{CaM}} = 3 \mu\text{M}$ ) mit einer Flussrate von 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  injiziert. Die Dissoziation wurde für 30 min verfolgt.

Nach einem kompletten Messvorgang wurde die Chipoberfläche mit einem Reinigungsschritt regeneriert. Die Lipidbedeckung wurde mit Hilfe von 0,5  $\mu\text{M}$  BSA (Rinderserumalbumin) kontrolliert. Dabei betrug der Anteil der Lipidbedeckung bei allen Messungen mindestens 80 %.

Die K-Ras4B-Experimente wurden mit einem *Multi-Step*-Modell (Zwei-Schritte-Modell) ausgewertet. Dieses Modell beschreibt als erstes die Bindung durch elektrostatische Wechselwirkungen. Anschließend erfolgt der zweite Bindungsschritt, der die Orientierung der Clusterbildung in der Membran beschreibt (welche mit den rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen beobachtet wurde). Mit folgender Gleichung lässt

sich dieses Modell beschreiben.



Das K-Ras4B (P) bindet an die immobilisierten Lipide (L) auf der Chipoberfläche. Daraus entsteht ein Komplex aus Protein und Lipid, der als PL beschrieben werden kann. Dieser Komplex reagiert in einem zweiten Schritt zu dem Komplex PL\*. Die Assoziations- und Dissoziationsparameter sind als  $k_{\text{on},1}$ ,  $k_{\text{on},2}$ ,  $k_{\text{off},1}$  und  $k_{\text{off},2}$  dargestellt. Ein zusätzlicher Parameter  $k_t$  für die Massentransferlimitierung wurde hinzugefügt. Der Parameter berücksichtigt, dass die Proteinbindung mit einer hohen Bindungskapazität durch Diffusion limitiert sein kann. Die Konzentrationen  $c(t)$  zum Zeitpunkt  $t = 0$  in der Lösung und an der Lipidoberfläche sind über folgende Gleichung definiert.

$$c_P(\text{bulk}) = c_P^0, c_P(0) = 0, c_L(0) = R_{\text{max}}, c_{PL}(0) = 0, c_{PL^*}(0) = 0 \quad (2.5)$$

Der Wert für  $R_{\text{max}}$  gibt die maximale Bindungskapazität der immobilisierten Membran an. Das gemessene RU-Signal ist proportional zu dem Anteil des Proteins, der an die immobilisierte Lipiddoppelschicht ( $c_{PL}$ ,  $c_{PL^*}$ ) gebunden hat, und basiert auf der Differenz zwischen der Proteinprobe und dem Laufpuffer.

Um unspezifische Bindungen zwischen dem Puffer und dem Protein mit dem reinem L1-Chip zu vermeiden, wurden diese Sensorgramme von den gemessenen Protein-Sensorgrammen subtrahiert. Anschließend erfolgte die Kurvenanpassung über einen Marquardt-Levenberg Algorithmus. Die angepassten Kurven wurden durch numerische Integration der Differentialgleichungen erstellt.

$$\begin{aligned} -\frac{dc_P}{dt} &= k_{\text{on},1} \cdot c_P \cdot c_L - k_{\text{off},1} \cdot c_{PL} - k_t(c_P^0 - c_P) \\ \frac{dc_L}{dt} &= -(k_{\text{on},1} \cdot c_P \cdot c_L - k_{\text{off},1} \cdot c_{PL}) \\ \frac{dc_{PL}}{dt} &= k_{\text{on},1} \cdot c_P \cdot c_L - k_{\text{off},1} \cdot c_{PL} - k_{\text{on},2} \cdot c_{PL} + k_{\text{off},2} \cdot c_{PL^*} \\ \frac{dc_{PL^*}}{dt} &= k_{\text{on},2} \cdot c_{PL} - k_{\text{off},2} \cdot c_{PL^*} \end{aligned} \quad (2.6)$$

Die Kurvenanpassung erfolgte mit dem BIAevaluation 4.1 Programm (Biacore, Uppsala,

Schweden). Die Assoziationsphase ( $t \rightarrow 0$ ) ist direkt proportional zu  $k_{\text{on},1}$  und wurde über eine lineare Regression in Origin 8.6 (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA) bestimmt. Das Ergebnis ist ein Wert für die direkte Steigung im Sensorgramm. Die anschließende Dissoziationsphase wurde mit einer biexponentiellen Funktion

$$R = A_1 \cdot e^{-k_{\text{off},1}(t-t_0)} + A_2 \cdot e^{-k_{\text{off},2}(t-t_0)} + \text{offset} \quad (2.7)$$

in der Software Origin 8.6 beschrieben. Das Ergebnis sind zwei unabhängige Dissoziationsraten,  $k_{\text{off},1}$  und  $k_{\text{off},2}$ , und die jeweiligen Anteile  $A_1$  und  $A_2$ .  $t_0$  beschreibt den Beginn der Dissoziationsphase wenn der Wechsel zwischen Protein- und Pufferlösung durchgeführt wird. Der relative Anteil von quasi-irreversibel gebundenem Protein wird von dem jeweiligen *Offset* Wert des biexponentiellen *Fits* und über die Amplitude am Anfangspunkt ( $t = 0$ ) der Dissoziationsphase mit Hilfe folgender Formel bestimmt.

$$\text{quasi-irrevers.} = \frac{\text{offset}}{A_1 + A_2 + \text{offset}} \quad (2.8)$$

Die mittlere Dissoziationskonstante  $k_{\text{diss}}$  lässt sich basierend auf Gleichung 2.7 über folgende Gleichung berechnen.

$$k_{\text{diss}} = \frac{A_1}{A_1 + A_2} \cdot k_{\text{off},1} + \frac{A_2}{A_1 + A_2} \cdot k_{\text{off},2} \quad (2.9)$$

Nach der Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsraten des Zwei-Schritte-Modells kann die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  mit der Gleichung

$$K_D = \frac{k_{\text{off},1}}{k_{\text{on},1}} \cdot \frac{k_{\text{off},2}}{k_{\text{on},1}} \quad (2.10)$$

bestimmt werden.

## 2.5 Rasterkraftmikroskopie

### 2.5.1 Theoretischer Hintergrund

Der Physiker R. Feynman (1918-1988) formulierte im Dezember 1959 bei dem Jahrestreffen der *American Physical Society* während seiner berühmten Rede mit dem Thema „*There's Plenty of Room at the Bottom*“, zentrale Fragestellungen der Biologie. Um diese beantworten zu können, benötige man leistungsfähige Mikroskope die eine hundertfach bessere Auflösung bieten als normale Lichtmikroskope.[217] Lichtmikroskope haben eine Auflösungsgrenze von etwa 400 nm, da dies die theoretische Auflösung von blauen Licht ist, das die kleinste Wellenlänge hat.[218] 1981 konnten G. Binnig und H. Rohrer am IBM in Zürich mit dem *Scanning Tunneling Microscope* (STM) erstmals hochaufgelöste Eigenschaften einer Probe erfassen.[219, 220] Der Nachteil von STM ist allerdings der Umstand, dass nur an elektrisch leitenden Oberflächen gemessen werden kann. Für ihre wissenschaftliche Leistung im Bereich der STM-Entwicklung erhielten G. Binnig und H. Rohrer zusammen mit E. Ruska (Elektronenmikroskop) 1986 den Nobelpreis für Physik.[221] Da die meisten biologischen Proben keine leitenden Eigenschaften haben, mussten die Proben im Hochvakuum gefriergetrocknet und anschließend mit einer Metallschicht (z.B. Gold- oder Platin-Iridium-Kohlemischfilm) überzogen werden. Die STM-Technologie diente als Grundlage für die Entwicklung des Rasterkraftmikroskops (AFM = *Atomic Force Microscope/Microscopy*) von G. Binnig, C. Quate und C. Gerber im Jahr 1986.[222] Mit dem nun entwickelten Rasterkraftmikroskop konnten auch nicht-leitende Oberflächen mit atomarer Auflösung untersucht werden. Einer der ersten Proben waren Purpurmembranen eines bakteriellen Photosyntheseorganells mit einer Auflösung von 1 bis 0,5 nm.[223] Allerdings gelang erst 1995 die hochauflösende Darstellung (<1 nm) dieser Strukturen unter physiologischen Bedingungen.[224] Eine weitere Anwendung wurde 1991 von S. Singh und D. J. Keller beschrieben. Dabei wurden synthetische DPPC- und DPPE-Membranen rasterkraftmikroskopisch untersucht und als mögliche Bindungsmöglichkeiten für Membranproteine beschrieben.[225] Diese Möglichkeit wird auch in der vorliegenden Arbeit verwendet, um Proteine auf einer Membranoberfläche immobilisieren zu können.

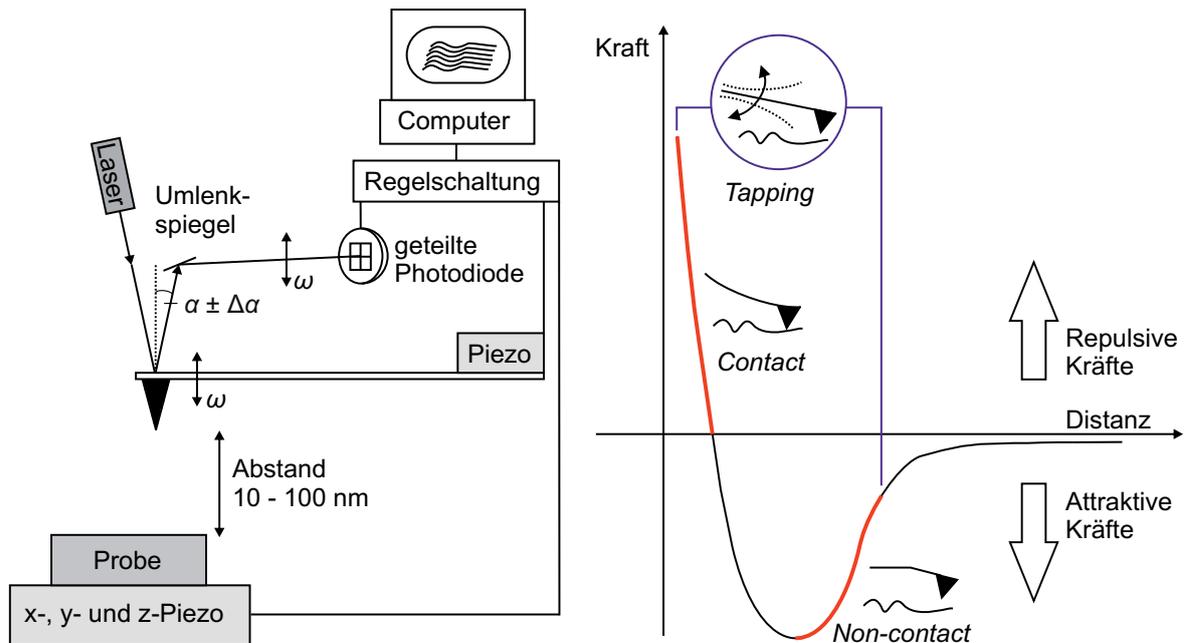
Es wurde 1989 von A. L. Weisenhorn und P. K. Hansma gezeigt, dass die geringste

zu erzielende Abbildungskraft (Kraft-Abstandskurven) bei ca. 0,1 nN liegt, wohingegen bei Messungen unter Raumbedingungen Kräfte zwischen Probenspitze und Probenoberfläche von 100 nN gemessen wurden.[226] Eine weitere Arbeit, die den Einfluss von Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen und van-der-Waals-Kräften untersuchte, wurde von H.-J. Butt 1991 veröffentlicht.[227] Neben den ersten dreidimensionalen AFM-Bildern von DNA (Arbeitsgruppe P. K. Hansma)[228–230], konnte 1989 auch die Echtzeitdarstellung des Aggregationsprozesses von Fibrinogen beobachtet werden.[231] Die genannten Beispiele zeigen deutlich die großen Einsatzmöglichkeiten der Rasterkraftmikroskopie. Neben der Darstellung der Oberflächentopografie von Proben wird die Rasterkraftmikroskopie auch für die Messung von Oberflächenelastizität und -viskosität oder auch der Oberflächenrauigkeit verwendet. Kommerziell wird das Prinzip der Rasterkraftmikroskopie auf dem Gebiet der Nanolithografie verwendet, dabei ist es möglich, Atome einzeln zu verschieben [232] oder auch Punkte in magneto-optischen Filmen [233] dichter zu packen. Eine denkbare Anwendung wäre die dichtere Packung von Speichermedien mit sehr großem Speicherplatz.[234]

Die Rasterkraftmikroskopie bietet die Möglichkeit, verschiedene Materialien hoch auflösend zu untersuchen. Gerade bei biologischen Proben macht man sich die Vorteile des AFMs zunutze, dass die Proben keine weiteren Modifikationen, wie z.B. *Protein-Labeling*, benötigen. Zudem können biologische Systeme zerstörungsfrei und unter physiologisch ähnlichen Bedingungen untersucht werden.

Bei der Rasterkraftmikroskopie unterscheidet man zwischen drei Modi. Im *Contact*-Modus werden die repulsiven Kräfte gemessen und der *Cantilever* hat immer Kontakt mit der Probenoberfläche.[235] Es kann dabei sowohl mit konstanter Kraft als auch Höhe gemessen werden.[236] Zu dem *Non-contact*-Modus gehört ein weiterer Modus, der als *Tapping*-Modus bezeichnet wird.[235] Im *Tapping*-Modus kommt es nur kurzzeitig zu einer direkten Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe.[235] In dieser Arbeit wurde ausschließlich der *Tapping*-Modus für Flüssig-AFM-Messungen verwendet.

Die Hauptbestandteile (Abbildung 2.8) eines Rasterkraftmikroskops sind ein *Cantilever* mit der Messspitze aus Silizium, Siliziumoxid oder Siliziumnitrid, ein Laser, der die genaue Position des *Cantilevers* detektiert, und ein Detektionssystem, das die Kräfteinflüsse zwischen Messspitze und Probe detektiert.[235, 236] In Abbildung 2.8 sind die oben genannten Komponenten dargestellt.

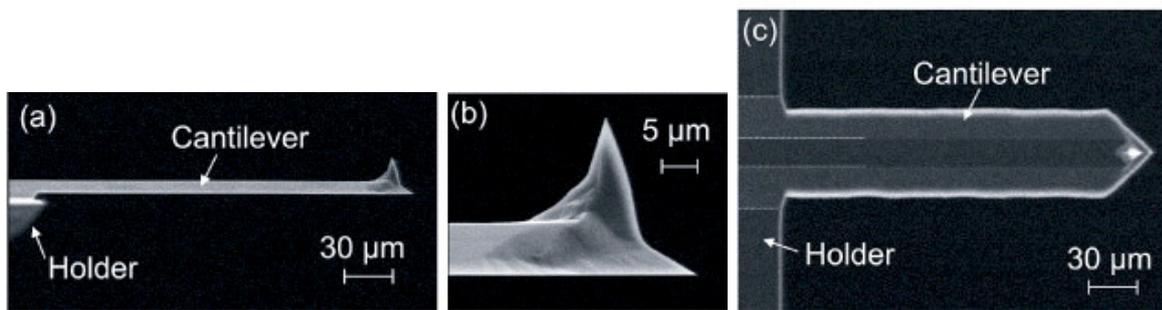


**Abbildung 2.8:** Links: Schematische Darstellung eines AFM Aufbaus im *Tapping*-Modus. Dargestellt sind die Hauptbauteile: Piezo, Probe, *Cantilever*, Laser, Photodiode und die Computersteuerung. Erstellt nach [237]. Rechts: Darstellung des Lennard-Jones-Potentials mit den jeweiligen Kräften, die bei den AFM-Messmodi zwischen Messspitze und Probenoberfläche auftreten. Erstellt nach [238].

Die Wechselwirkung der Messspitze mit der Probe (*Cantilever* biegt sich) bzw. die Auflage- oder Deformationskraft  $F_D$  kann über das Hookesche-Gesetz beschrieben werden [239]:

$$F_D = k_D \cdot \delta_c \quad (2.11)$$

Die Federkonstante  $k_D$  und die Auslenkung  $\delta_c$  sind auf die Ruheausgangslage bezogen. Die Abbildung 2.9 zeigt die filigrane Struktur von heutigen *Cantilevern*. Mit bloßem Auge ist nur der Cantileverarm zu erkennen. Die Messspitze ist erst auf den Sekundärelektronenmikroskopiebildern zu sehen.



**Abbildung 2.9:** Sekundärelektronenmikroskopiebilder (SEM) von einem *Cantilever*. Bild (a) zeigt eine Seitenansicht, die in Bild (b) vergrößert dargestellt ist. Am Ende des Cantileverarms ist die Sensorspitze (*Tip*) zu erkennen. Bild (c) ist eine Ansicht von unten.[240]

Zu den wichtigsten Parametern bei der Rasterkraftmikroskopie gehören die Resonanzfrequenz  $\omega_0$ , die Federkonstante  $k_D$  des *Cantilevers* und die im Idealfall atomare Messspitze des *Cantilevers* (scharfe Spitze mit kleinem Krümmungsradius und kleinem Öffnungswinkel) sowie Störeinflüsse (externe Schwingungen, Temperatur).[235, 236]

Die Federkonstante ist hier definiert als:

$$k_D = Z \cdot D^3 \cdot \frac{B}{4L^3} \quad . \quad (2.12)$$

$Z$  ist das Elastizitätsmodul (Zugmodul),  $B$  die Breite,  $L$  die Länge,  $D$  die Dicke des *Cantilevers* und  $\rho$  seine Materialdichte.[239] Die Resonanzfrequenz des *Cantilevers* ergibt sich bei bekannter Masse  $m_{\text{eff}}$  aus der Federkonstanten  $k_D$ :

$$\omega_0 = \left( \frac{k_D}{m_{\text{eff}}} \right)^{\frac{1}{2}} \quad . \quad (2.13)$$

Die Federkonstante sollte möglichst klein sein um auch kleine Kräfte detektieren zu können. Im Gegensatz dazu, sollte die Resonanzfrequenz möglichst groß sein, um gegen mechanische Schwingungen unempfindlich zu sein. Erreicht wird diese durch eine möglichst kleine Masse des *Cantilevers*.[241]

Der Grundaufbau eines Rasterkraftmikroskops (Abbildung 2.8) ist dieser, dass ein Laserstrahl von der Rückseite des *Cantilevers* reflektiert wird und dieser von einer viergeteilten Photodiode detektiert wird. Die beiden Spannungswerte für die oberen und unteren zwei Felder der Photodiode liefern in Abhängigkeit des Reflexionswin-

kel  $\alpha$  (anhängig von der Cantileverauslenkung) unterschiedliche Spannungswerte (Abbildung 2.8). Das gebildete Differenzsignal wird in ein Höhenprofil umgerechnet und liefert so die Topografie der Probe. Bei der AFM-Messung wird jede Scanlinie zweimal aufgenommen.[236] Der schnellen horizontalen Hinbewegung, auch als *trace* bezeichnet, und der Rückbewegung *retrace* können unterschiedliche Signale zugeordnet werden.[236, 241] Bei dem *Tapping*-Modus werden spezielle *Cantilever* verwendet, die durch ein piezokeramisches Element zur Schwingung bei der Eigenfrequenz  $\omega_0$  und konstanter Amplitude angeregt werden. Die attraktiven van-der-Waals-Wechselwirkungen innerhalb von 2 bis 20 nm zur Probe werden im *Tapping*-Modus genutzt, um eine Topografie der Probe zu erhalten.[236]

Außerhalb des van-der-Waals-Potentials ist die Amplitude (erzeugt durch die Cantileverschwingung) durch die Federkonstante und die Anregungsenergie bestimmt. Kommt es zu einer Oberflächenannäherung, so überlagern sich das van-der-Waals- und das Spitzenpotential. Die Folge ist eine reduzierte Resonanzfrequenz und eine Abnahme der Amplitude der Schwingung bei der Eigenfrequenz.[237].

Der Laserstrahl schwingt, wie der *Cantilever* auch, auf der Photodiode auf und ab und liefert so ein Höhensignal. Ein aufgenommenes Phasensignal ist die Phasenverschiebung von der Schwingungsanregung und der echten Cantileverschwingung. Die Phasenverschiebung ist von verschiedenen Eigenschaften der Probe abhängig.[236]

Auf den *Cantilever* können anziehende und abstoßende Kräfte wirken, die lang- oder kurzreichweitig sein können. Dabei beruht das Messprinzip auf der Wechselwirkung zwischen Probe und Messspitze (Abbildung 2.8). Als Modellbeispiel dient oftmals ein Lennard-Jones-Potential.[242]

$$U_{LJ} = 4E \left[ \left( \frac{r_0}{r} \right)^{12} - \left( \frac{r_0}{r} \right)^6 \right] \quad (2.14)$$

Der Abstand der beiden Atome ist  $r$ , der Kontaktabstand ist  $r_0$  und die Tiefe des Potentialstopfes ist  $E$  (bei  $r = 2^{\frac{1}{6}} \cdot r_0$ ). Die potenzielle Energie ist bei  $r = r_0$  gleich Null.[243–245] Das Lennard-Jones-Potential berücksichtigt sowohl die repulsiven Wechselwirkungen in direkter Probennähe, als auch die van-der-Waals-Wechselwirkungen in größerer Entfernung.[242]

Kurzreichweitige Kräfte haben einen Interaktionsradius von etwa 1 nm, wohingegen

langreichweitige Kräfte zwischen 1 und 100 nm wirken.[246] Zu den van-der-Waals-Kräften gehören alle inter- und intramolekularen Wechselwirkungen, die auf einem permanenten oder induzierten Dipol basieren. Das van-der-Waals-Potential bildet sich aus den einzelnen Potentialen der jeweiligen Wechselwirkungen [247]:

- $U_{\text{Orient.}}$ : Dipol-Dipol-Wechselwirkung, die Dipole richten sich relativ zueinander aus (Orientierung)
- $U_{\text{Ind.}}$ : Dipolinduzierte Wechselwirkung, es wird ein Dipolmoment im Feld eines Dipols erzeugt (Debye)
- $U_{\text{Disp.}}$ : Londonsche Dispersionswechselwirkung, (Wechselwirkung zwischen zwei induzierten Dipolen) es treten kurzfristige Fluktuationen in der Elektronendichteverteilung eines unpolaren Moleküls auf (Dispersion), dadurch entsteht ein momentaner Dipol, der mit einem zweiten Molekül ein Dipol erzeugt.

$$U_{\text{vdW}} = U_{\text{Orient.}} + U_{\text{Ind.}} + U_{\text{Disp.}} \quad (2.15)$$

Für das van-der-Waals-Potential bei der Rasterkraftmikroskopie wird das Wechselwirkungspotential zwischen einer Kugel mit Radius  $R$  und einer Probenoberfläche im Abstand  $z$  ( $z \ll R$ ) mit Hilfe der Hamaker-Konstante ( $A_H$ ) bestimmt.[241, 244, 248] Die Hamaker-Konstante  $A_H$  ist abhängig von der atomaren Polarisierbarkeit und von der Dichte der Messspitze und der Probenoberfläche.[218]

$$U_{\text{vdW(Kugel-Oberfläche)}} = -\frac{A_H \cdot R}{6z} \quad (2.16)$$

Die van-der-Waals-Kraft ist für eine sphärische Messspitze proportional zu  $\frac{1}{z^2}$  und für eine konische Form gilt  $\frac{1}{z}$ .[249]

Die langreichweitigen elektrostatischen Wechselwirkungen (Coulomb-Wechselwirkung) treten zwischen zwei geladenen Teilchen auf. Sie ist mit den Ladungen  $q_1$  und  $q_2$  im Abstand  $d$  folgendermaßen definiert:

$$U_C = \frac{q_1 \cdot q_2}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot d} \quad (2.17)$$

Die Dielektrizitätszahl des Vakuums ist  $\varepsilon_0$  und die relative Dielektrizitätszahl ist durch  $\varepsilon_r$  beschrieben.

Im nächsten Abschnitt wird auf die auftretenden Kräfte in Flüssigkeiten eingegangen, da in Flüssigkeiten ein anderes Verhalten beobachtet werden kann. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Fest-Flüssig-Grenzfläche beeinflussen die Wechselwirkungen, sobald der *Cantilever* in die Flüssigkeit eintaucht. Das Verhalten der Probenoberfläche kann somit von den Eigenschaften in einer Gasatmosphäre abweichen. Die Kapillarkraft entfällt bei Messungen in Flüssigkeiten. Die Eigenschaften des Dielektrikums beeinflussen die langreichweitigen Wechselwirkungen, so dass die Coulomb-Wechselwirkung  $U_C$  eine  $\frac{1}{\varepsilon_r}$ -Abhängigkeit besitzt. Das Verhalten von van-der-Waals-Kräften ist komplizierter, da diese von den statischen und dynamischen dielektrischen Eigenschaften der Messspitze, der Probe und des jeweiligen Mediums abhängig sind.[250] Zusätzliche Effekte bei Messungen in Flüssigkeiten sind die Hydrophilie, hydrophobe Effekte und das Quetschen von Flüssigkeitsmolekülen zwischen der Messspitze und der Probenoberfläche.[239]

Bei Flüssig-AFM-Messungen kommen auch Ladungsanteile durch geladene Ionen in der Lösung zustande, die eine Interferenz erzeugen können und so Einfluss auf die Topografie nehmen. Die Oberflächenladung steht mit Gegenionen im Gleichgewicht. Nach dem Boltzmann-Gesetz nimmt die Gegenionenkonzentration exponentiell mit der Distanz zur Probenoberfläche ab. Dieser Vorgang kann durch die Debye-Länge beschrieben werden [251]:

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot \kappa_B \cdot T}{e^2 \cdot \sum_i c_i \cdot q_i^2}} \quad . \quad (2.18)$$

Die Boltzmann-Konstante ist  $\kappa_B$ ,  $T$  ist die absolute Temperatur,  $e$  die Ladung,  $\varepsilon_0$  ist die Permittivität des Vakuums und  $\varepsilon_r$  ist die relative Dielektrizitätskonstante der Flüssigkeit. Die Debye-Länge ist durch die Valenz der Ionen  $q_i$  und durch die Konzentrationen  $c_i$  der jeweiligen Elektrolytkomponente gegeben und kann als Dicke der elektrischen Doppelschicht angesehen werden.

Die geladenen Doppelschichten in einer Elektrolytlösung an Cantilever- und Probenoberflächen können zu einer Abstoßung führen (höhere Kraft für den Oberflächenkon-

takt nötig).[251] Ein Grund für dieses Phänomen sind bestimmte Cantilvermaterialien wie zum Beispiel Siliziumnitrid, das Ladungen „einfangen“ kann.[252] Diese Interaktion zwischen der elektrostatischen Kraft und der van-der-Waals-Kraft kann mit Hilfe der DLVO-Theorie (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek-Theorie) beschrieben werden. Die elektrostatische Kraft zwischen der sphärischen Messspitze und der Probenoberfläche ist definiert als:

$$F_{el}(z) = \frac{4\pi \cdot R \cdot \sigma_P \cdot \sigma_S \cdot \lambda_D}{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r} \cdot e^{-\frac{z}{\lambda_D}} \quad . \quad (2.19)$$

Die Distanz zwischen den beiden Oberflächen ist  $z$ ,  $R$  ist der Radius der Messspitze und  $\sigma_P$  und  $\sigma_S$  sind die Dichten der Oberflächenladungen der Probe und der Messspitze.[251] Durch Veränderung der Ionenkonzentration lässt sich die elektrostatische Wechselwirkung reduzieren.[243]

Durch das Auftreten von verschiedenen möglichen Messartefakten ist eine sorgsame Bewertung der Oberflächenbilder und deren Auswertung für jede AFM-Messung nötig. Mit wachsender Erfahrung können auftretende Artefakte, wie zum Beispiel thermische Verformung oder das Auftreten einer Doppelspitze, schon während der Messung erkannt und beseitigt werden. Ein thermischer Drift kann verhindert werden, indem mit einer höheren Geschwindigkeit gescannt wird, allerdings sinkt dabei oftmals die Auflösungsqualität. Eine weitere Möglichkeit ist, dass erst gemessen wird, wenn sich ein thermisches Gleichgewicht eingestellt hat. Gegen äußere Schwingungen können speziell abgedichtete Abdeckungen und Schwingungstische verwendet werden.[236] Das Einstellen von *Feedback*-Parametern (*Integral-gain* und *Propotional-gain*) ermöglicht eine Qualitätskontrolle der Topografiebilder. Zu geringe Parameter erzeugen ein unscharfes Bild der Probenoberfläche, wohingegen bei zu großen Parametern das Topografiesignal von einer Schwingung überlagert wird. Schatten auf der Probenoberfläche deuten ebenfalls auf falsch eingestellte Scanparameter hin.[241] Um eine gleichbleibende Scanqualität zu erreichen, ist es nötig den Scanner in regelmäßigen Abständen mit einem Kalibriergitter zu kalibrieren, damit die Oberflächentopografie auch den reellen Werten entspricht. Wie Abbildung 2.8 zeigt, ändert sich die auftretende Kraft stark mit dem Abstand zwischen Messspitze und Probe. Daraus ergeben sich gute Auflösungen in  $z$ -Richtung von ca. 0,01 nm und in  $x$ -Richtung von etwa 0,1 nm.[241] Aufgrund

der hohen Auflösung von Flüssig-AFM-Messungen eignet sich dieser Messmodus gut, um einen detaillierten Einblick in die Topografie und die Strukturveränderungen von verschiedenen biologischen Proben zu erhalten.

## 2.5.2 Praktische Durchführung

Für die AFM-Messungen wurden auf Metallplättchen Teflonscheiben geklebt, die wiederum die Basis für die Micaplättchen bildeten. Mit einem Klebestreifen wurde eine Schicht der Micaoberfläche abgezogen, so dass eine homogene glatte Oberfläche für die Vesikelfusion entstand. Mica (englisch: *Glimmer*) ist ein natürliches Schichtsilikat (z.B. Muskovit), das die Eigenschaft besitzt, atomar-glatte Oberflächen ausbilden zu können. Auf der frisch gespalteten Micaoberfläche wurden 35  $\mu\text{L}$  extrudierte Lipidlösung und 35  $\mu\text{L}$  des jeweiligen Puffers aufgetragen. Die Proben wurden anschließend in einer befeuchteten Inkubationskammer für 2 Stunden bei ca. 70 °C inkubiert.

Nach der Vesikelfusion wurde die Micaoberfläche vorsichtig mit Puffer gespült, um nicht gespreitete Lipide zu entfernen. Für zeitabhängige AFM-Messungen der Membran-Protein-Wechselwirkung wurde die Probe in der Flüssig-AFM-Zelle positioniert und mehrere Bilder von verschiedenen Bereichen der Membranoberfläche aufgenommen. Anschließend wurden für die K-Ras4B- und CaM-Interaktionen 800  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Probe ( $c_{\text{K-Ras4B}} = 0,2 \mu\text{M}$ ,  $c_{\text{CaM}} = 0,3 \mu\text{M}$ ,  $c_{\text{K-Ras4B/CaM}} = 0,2 \mu\text{M} / 0,3 \mu\text{M}$ ) in die Flüssig-AFM-Zelle (MTFML, Veeco, jetzt Bruker, Mannheim, Deutschland) injiziert. Bei den anderen AFM-Messungen wurde analog verfahren. Für die Messungen der DOPC/DOPS- (95:5 mol% und 90:10 mol%) und DOPC-Membran mit den beiden Ras-Proteinen wurden 800  $\mu\text{L}$  K-Ras4B ( $c_{\text{K-Ras4B}} = 0,2 \mu\text{M}$ ) bzw. 200  $\mu\text{L}$  N-Ras ( $c_{\text{N-Ras}} = 4,5 \mu\text{M}$ ) injiziert. Bei der Interaktionsstudie zwischen der Phospholipase A2 und der Membran wurden 250  $\mu\text{L}$  PLA2 ( $c_{\text{PLA2}} = 0,35 \mu\text{M}$ ) mit 0,5 mM EGTA bzw. 2 mM  $\text{CaCl}_2$  injiziert. Für die Messungen an den DOPC/SM/Chol- und DOPC-Membranen wurden 800  $\mu\text{L}$  des *Tweezers* CLR01 ( $c_{\text{CLR01}} = 150 \mu\text{M}$ ) injiziert.

Nach einer Stunde Inkubation (bei CLR01: 1 min und 1 h, bei PLA2: 10 min) bei Raumtemperatur wurde die Flüssig-AFM-Zelle mit Puffer gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. Die vorher gescannten Bereiche der Membranoberfläche wurden erneut gescannt, um Veränderungen der Topografie beobachten zu können.

Die AFM-Messungen wurden mit einem *MultiMode*<sup>®</sup> *Atomic Force Microscope* (Digital Instruments Inc., jetzt Bruker, Santa Barbara, Kalifornien, USA) im *Tapping*-Modus aufgenommen. Die software-seitige Steuerung erfolgte über *NanoScope Control* mit einem *NanoScope*<sup>®</sup> IIIa *Scanning Probe Microscope Controller* (Digital Instruments Inc., jetzt Bruker, Santa Barbara, Kalifornien, USA) und einem J-Scanner (Scangröße 125  $\mu\text{m}$ ). Als *Cantilever* wurden SNL-*Cantilever* (*Sharp Nitride Lever*) mit einer nominalen Kraftkonstanten von  $0,24 \text{ Nm}^{-1}$  verwendet. Der Cantileverfrequenzbereich lag um 9 kHz und die Amplitude variierte zwischen 200 und 800 mV. Die Scangeschwindigkeit (*scan frequency*) lag zwischen 1 und 2 Hz. Die topografischen Bilder wurden mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixel aufgenommen und anschließend mit der Analysesoftware *NanoScope 5* und *6* (Veeco, jetzt Bruker, Mannheim, Deutschland) bearbeitet.

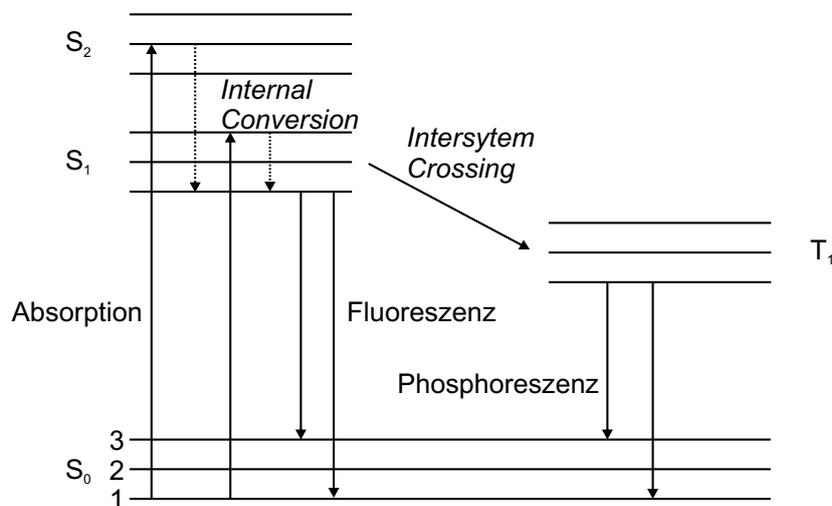
## 2.6 Fluoreszenzanisotropie

Für einen detaillierten Einblick in die Fluoreszenzspektroskopie wird an dieser Stelle auf die beiden Bücher *Principles of Fluorescence Spectroscopy* von J. R. Lakowicz und *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* von B. Valeur verwiesen.[253, 254]

### 2.6.1 Theoretischer Hintergrund

In dem nächsten Abschnitt wird ein kurzer Einblick in die Theorie der Fluoreszenzspektroskopie gegeben.

Das Jablonski-Diagramm zeigt die möglichen Energieübergänge eines Valenzelektrons in die verschiedenen Anregungszustände eines Moleküls. Auf der  $y$ -Achse ist hierbei die Energie aufgetragen. In  $x$ -Achsenrichtung ist die Spinmultiplizität (Singulett, Triplet) durch waagerechte Linien dargestellt. Da ein Molekül eine große Anzahl an Schwingungsniveaus besitzen kann, sind in Abbildung 2.10 nur einige beispielhaft eingezeichnet.[253]



**Abbildung 2.10:** Schematische Darstellung eines Jablonski-Diagramms. Dargestellt sind mögliche Relaxationsprozesse des Fluorophors. Erstellt nach [253].

Ein Molekül kann durch die Absorption eines Photons aus den Grundzustand S<sub>0</sub> in einen elektronisch angeregten Zustand übergehen. Neben dem Übergang in den ersten Singulett-Zustand S<sub>1</sub> sind auch Übergänge in höhere Zustände möglich (z.B. S<sub>2</sub>). Dieser Prozess dauert etwa 10<sup>-15</sup> s. Das angeregte Molekül will nun seine überschüssige Energie wieder abgeben.[253, 254] Dies kann über verschiedene Relaxationswege passieren:

- Fluoreszenz
- Schwingungsrelaxation (*Vibrational Relaxation* = VR, Interne Umwandlung oder auch *Internal Conversion* (IC))
- Phosphoreszenz (*Intersystem Crossing*)

Die aufgezählten Prozesse unterteilen sich in strahlungslose und strahlungsgekoppelte Übergänge. Die *Vibrational Relaxation* und die *Internal Conversion* sind beide strahlungslos. Bei der *Vibrational Relaxation* passiert ein Übergang zwischen Schwingungsniveaus innerhalb eines elektronischen Zustands. Dabei wird kinetische Energie an die Schwingungszustände innerhalb oder auch an nahe Moleküle abgegeben. Die Zeit für diesen Übergang beträgt  $10^{-12}$  bis  $10^{-10}$  s und folgt meistens direkt nach der Absorption. Bei der *Internal Conversion* überlappen die verschiedenen elektronischen Schwingungsniveaus bei höheren Anregungsniveaus. Dabei ändert sich der elektronische Grundzustand. Die Zeit beträgt etwa  $10^{-11}$  bis  $10^{-9}$  s. Zu den strahlungsgekoppelten Übergängen zählen die Fluoreszenz und die Phosphoreszenz. Unter Fluoreszenz versteht man den Übergang in den Grundzustand unter Photonenabgabe. Dieser Vorgang ist relativ langsam mit  $10^{-9}$  bis  $10^{-7}$  s. Durch einen Energieverlust durch zuvor erfolgte Schwingungsrelaxationen kommt es zu einer Rotverschiebung (*Stokes shift*). Die Phosphoreszenz ist ein Prozess, bei dem ein Photon abgegeben wird und der in Folge des *Intersystem Crossing* abläuft. Beide Prozesse sind sehr langsame Prozesse ( $10^{-6}$  bis 1 s).[253, 254]

Die Fluoreszenzquantenausbeute ist mit den Geschwindigkeitskonstanten über folgende Gleichung verknüpft:

$$Q = \frac{k_F}{k_F + k_{IC}} \quad (2.20)$$

und ist als Verhältnis der Anzahl von emittierten zu absorbierten Photonen definiert.[253, 254]

Die Fluoreszenzlebensdauer (meistens im Nanosekundenbereich) ist definiert als die mittlere Verweildauer eines Elektrons im angeregten Zustand:

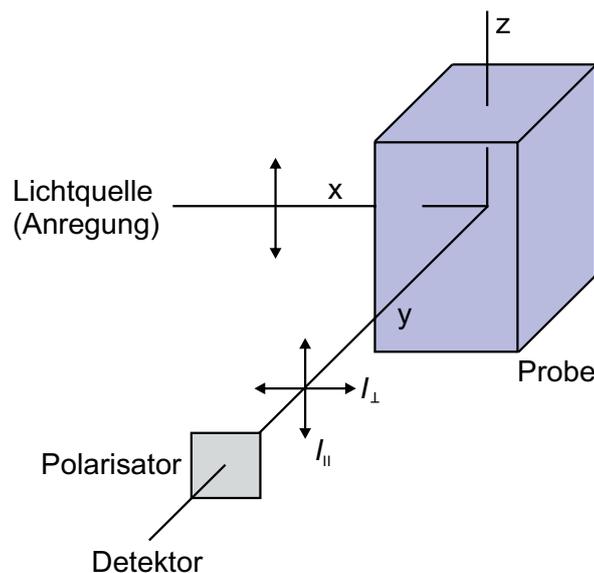
$$\tau_F = \frac{1}{k_F + k_{IC}} \quad (2.21)$$

Die Gleichung 2.21 stellt aber nur eine vereinfachte Form dar. Durch weitere Prozesse kann sich der Zusammenhang verkomplizieren. Die Zerfallsrate  $k$  ist die Übergangswahrscheinlichkeit bzw. die Zeitskala für jeden einzelnen Prozess.[253, 255]

Die zeitliche Reduzierung der Fluoreszenzintensität  $I_F(t)$  ist für den einfachsten Fall ein Zerfall erster Ordnung.[253]

$$I_F(t) = I_0 \cdot e^{\frac{-t}{\tau_F}} \quad (2.22)$$

Die Fluoreszenzanisotropie wird oftmals in L-Konfiguration (Abbildung 2.11) gemessen, das heißt, dass die Emission sowohl in horizontaler, als auch in vertikaler Richtung (nacheinander) detektiert wird.[253]



**Abbildung 2.11:** Schematische Darstellung der Fluoreszenzanisotropie-Messung im L-Format. Die Probe wird mit linear polarisiertem Licht angeregt, und die Emission erfolgt in horizontaler und vertikaler Richtung. Erstellt nach [253].

Die Fluoreszenzanisotropie ist definiert als:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2.23)$$

Die Fluoreszenzanisotropie ist  $r$ ,  $I_{\parallel}$  ist die vertikale Fluoreszenzkomponente und  $I_{\perp}$

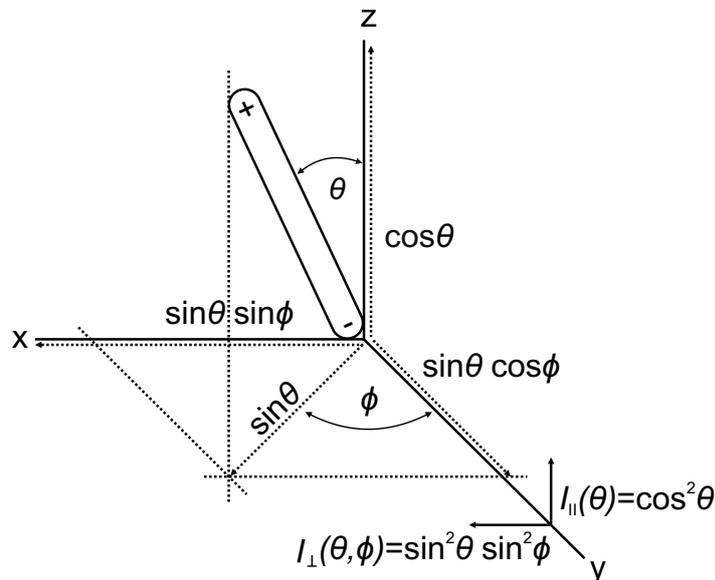
ist die horizontale Fluoreszenzkomponente. Für die Messung der Fluoreszenzanisotropie wird vertikal polarisiertes Licht benötigt. Licht ist normalerweise unpolarisiert und besitzt alle Schwingungsrichtungen senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. Vertikal polarisiertes Licht wird erzeugt, indem Licht durch einen Polarisator geschickt wird, der nur den vertikalen Teil des Lichts durchlässt. Für die Fluoreszenzemission ergibt sich die Gesamtintensität  $I_{ges}$  [237, 253]:

$$I_{ges} = I_{\parallel} + 2I_{\perp} \quad . \quad (2.24)$$

Es können drei Polarisationsarten auftreten [237, 253]:

- vollständig polarisiertes Licht:  $I_{\perp} = 0$ , es folgt eine Anisotropie von eins, wird aber aufgrund der Photoselektion (Beschreibung im Text) in Lösung nicht erreicht.
- unpolarisiertes Licht:  $I_{\parallel} = I_{\perp}$ , es ergibt sich für die Anisotropie ein Wert von null.
- teilweise polarisiertes Licht: Anisotropiewert ist kleiner als eins.

Die Abbildung 2.12 zeigt einen Fluorophor, welcher als Dipolmoment dargestellt ist.



**Abbildung 2.12:** Schematische Darstellung der Emissionsintensitäten eines Fluorophors in einem Koordinatensystem. Erstellt nach [253].

In einer Lösung sind die Fluorophormoleküle zufällig angeordnet. Werden diese nun mit

parallel zur  $z$ -Achse polarisiertem Licht angeregt, so werden alle Moleküle die zur  $z$ -Achse den gleichen Winkel  $\theta$  haben, mit der gleichen Wahrscheinlichkeit (proportional zu  $\cos^2\theta$ ) angeregt. Die Winkelabhängigkeit  $\phi$  von  $I_{\perp}$  kann somit als Mittelwert von  $\langle \sin^2\phi \rangle = \frac{1}{2}$  beschrieben werden. Somit ergibt sich mit  $I_{\parallel} = \langle \cos^2\theta \rangle$  und  $\sin^2\theta = 1 - \cos^2\theta$  für die Anisotropie:

$$r = \frac{3 \langle \cos^2\theta \rangle - 1}{2} \quad (2.25)$$

Der beschriebene Vorgang wird auch als PhotoSelektion bezeichnet.

Wird von einer statischen zufälligen Verteilung der Orientierungen ausgegangen, so ist die Molekülanzahl mit einem Winkel zwischen  $\theta$  und  $\theta + d\theta$  proportional zur Größe einer Kugeloberfläche zwischen ebendiesem Winkel, der proportional zu  $\sin\theta d\theta$  ist. Mit  $f(\theta)d\theta = \cos^2\theta \sin\theta d\theta$  kann die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Moleküle dargestellt werden. Für den Mittelwert von  $\langle \cos^2\theta \rangle$  lässt sich ein Wert von  $\frac{3}{5}$  errechnen. Mit der Gleichung 2.25 ergibt sich nun eine maximale Anisotropie von:

$$r_{max} = \frac{2}{5} \quad (2.26)$$

Berücksichtigt man nun einen weiteren Parameter, die Rotationsdiffusion (Verkippung des Fluoreszenzdipolmoments durch Rotation) gegenüber dem Absorptionsdipolmoment mit dem Winkel  $\beta$ , verringert sich die Anisotropie weiter. Der Faktor der Verringerung liegt bei  $\frac{3 \langle \cos^2\beta \rangle - 1}{2}$  (Vergleich mit der Anisotropieverringern durch die Neigung des Dipols beim Winkel  $\theta$  um den Faktor  $\frac{3 \langle \cos^2\theta \rangle - 1}{2} = \frac{2}{5}$ ). Somit ergibt sich in Abwesenheit aller depolarisierenden Prozesse für die maximale Anisotropie  $r$  ein Wert von maximal 0,4.[253, 256] Für die maximale Anisotropie  $r$  ergibt sich folgende Gleichung:

$$r = \frac{2}{5} \frac{3 \langle \cos^2\beta \rangle - 1}{2} \quad (2.27)$$

Eine Änderung der Orientierung des Dipolmoments während der Fluoreszenzlebensdauer sorgt für eine Depolarisation und einer Reduzierung der Anisotropie. Die Brownsche-Molekularbewegung sorgt bei frei diffundierenden Molekülen zu einer Rückkehr in die zufällige Dipolmomentorientierung.

Die Rotationskorrelationszeit  $\theta_{rot}$  ist sowohl von der Größe, als auch von der Form des Moleküls und der Lösungsumgebung abhängig [253]:

$$\theta_{rot} = \frac{\eta \cdot V_{eff}}{\kappa_B \cdot T} \quad (2.28)$$

Die Viskosität des Lösungsmittels ist  $\eta$ , das molekulare Volumen des Moleküls ist  $V_{eff}$ , die Boltzmann-Konstante ist  $\kappa_B$  und die Temperatur ist  $T$ .

Der Zusammenhang zwischen den drei Parametern von der Anisotropie  $r$ , der Rotationskorrelationszeit  $\theta_{rot}$ , und der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_F$  ist über die Perrin-Gleichung gegeben.[253]

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left( 1 + \frac{\tau_F}{\theta_{rot}} \right) \quad (2.29)$$

## 2.6.2 Praktische Durchführung

Die Fluoreszenzanisotropie-Messungen wurden an einem K2 Phasen- und Modulations-Fluorometer (ISS Inc., Champaign, IL, USA) durchgeführt. Die Temperatur wurde während den Messungen mit einem Wasserbad konstant bei  $25 \text{ °C} \pm 0,1 \text{ °C}$  gehalten. Die zeitabhängigen Fluoreszenzlebenszeiten und die Fluoreszenzanisotropie-Messungen wurden mit vertikal polarisiertem und anregungsmoduliertem Licht durchgeführt. Für jede Anregungsfrequenz wurde das Modulationsverhältnis und die differentielle Phase zwischen dem parallelen und vertikalen Fluoreszenzanteil gemessen. Die Anregung von Dansyl-gelabelten Calmodulin erfolgte mit einer Laserdiode bei 370 nm (ISS Inc., Champaign, IL, USA; mit  $370 \pm 10$  nm Anregungsfilter). Ein Funktionsgenerator erzeugte dabei intensitätsmoduliertes Anregungslicht über einen Frequenzbereich von 2 bis 173 MHz bei einer *cross*-Korrelations-Frequenz von 400 Hz. Für Modulationsmessungen wurde ein RF-Signal von +13 dBm benutzt. Für die Dansyl-Emission wurde ein 400 nm Langpass-Filter eingebaut. Sowohl für die Fluoreszenzlebenszeit-Messungen, als auch für die Anisotropie-Messungen wurde eine 5 mm Quartz-Küvette verwendet. Der Emissionspolarisator wurde auf den *Magic Angle* von  $54,7^\circ$  eingestellt, so dass die Anregung mit vertikal polarisiertes Licht ( $0^\circ$ ) erfolgte. Als Referenz für die Lebenszeit wurde die Fluoreszenz der Benzolverbindung POPOP (1,4-Bis-(5-phenyloxazol-2-yl)-

benzol) ( $\tau = 1,35$  ns in Ethanol [253]) verwendet. Bei den Anisotropie-Messungen mit vertikal polarisiertem Licht wurde die Emission mit einem Polarisationswinkel von  $0^\circ$  und  $90^\circ$  gemessen. Die jeweiligen Phasen- und Modulationsmessungen wurden als Funktion der Frequenzmodulation gemessen. Die Fluoreszenzlebenszeit wurde mit einem Modell, das drei diskrete Lebenszeitkomponenten enthält, gefittet, die wiederum den Fluoreszenzintensitätszerfall beschreiben:

$$I(t) = \alpha_1 \cdot e^{\frac{-t}{\tau_1}} + \alpha_2 \cdot e^{\frac{-t}{\tau_2}} + \alpha_3 \cdot e^{\frac{-t}{\tau_3}} \quad . \quad (2.30)$$

Die Fluoreszenzlebenszeiten sind  $\tau_1, \tau_2, \tau_3$  und die pre-exponentiellen Faktoren  $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$  sind die jeweiligen Amplituden. Der Streulichtanteil wurde bei diesem Modell mit  $\tau_1$  konstant bei 0,01 ns gehalten. Bei den *Fits* wurde der Fehler für den Phasenverlauf und für das Modulationsverhältnis auf  $0.20^\circ$  bzw. 0.0040 gesetzt. Mit Hilfe dieser Parameter konnte eine mittlere Fluoreszenzlebenszeit  $\langle \tau \rangle$  für das Dansyl-gelabelte Protein mit folgender Gleichung bestimmt werden:

$$\langle \tau \rangle = f_1 \cdot \tau_1 + f_2 \cdot \tau_2 + f_3 \cdot \tau_3 \quad (2.31)$$

mit den fraktionalen Beiträgen  $f_1, f_2$  und  $f_3$ , die aus der Fluoreszenzlebenszeit und den jeweiligen Amplituden mit Hilfe der folgenden Gleichung berechnet werden konnten:

$$f_i = \frac{\alpha_i \cdot \tau_i}{\sum_i \alpha_i \cdot \tau_i} \quad . \quad (2.32)$$

Die *Fit*-Qualität für den gesamten Frequenzbereich wurde mit der Methode der kleinsten Quadrate und mit dem reduzierten  $\chi^2$ -Wert im Bereich von 1 bis 10 kontrolliert. Der Anisotropiezerfall wurde durch einen biexponentiellen *Fit* der differentiellen polarisierten Phasenwinkeln und der Modulationsverhältnisse nach folgender Formel bestimmt:

$$r(t) = r_0 \left[ g_1 \cdot e^{\frac{-t}{\theta_1}} + g_2 \cdot e^{\frac{-t}{\theta_2}} \right] = r_{0,1} \cdot e^{\frac{-t}{\theta_1}} + r_{0,2} \cdot e^{\frac{-t}{\theta_2}} \quad . \quad (2.33)$$

Die maximale Anisotropie ist  $r_0$ ,  $\theta_1$  und  $\theta_2$  sind die Rotationskorrelationszeiten des Dansyl-Labels. Die gesamte Rotation des Proteins ist gleich der gesamten Rotations-

korrelationszeit  $\theta_{Protein}$  des Dansyl-gelabelten Proteins. Die Parameter  $g_1$  und  $g_2$  sind die anteiligen Amplituden für jede Komponente beim Anisotropieabfall, die in Summe eins ergeben ( $r_{0,1} = r_0 \cdot g_1$  und  $r_{0,2} = r_0 \cdot g_2$ ). Für die *Fits* wurden die vorher bestimmten Lebenszeiten als feste Parameter verwendet und die *delta phase errors* und die *amplitude ratio errors* auf  $0,20^\circ$  bzw.  $0,0040$  gesetzt. Mit Hilfe der Methode der nichtlinearen Fehlerquadrate wurde die *Fit*-Güte für das Modell der Phasen- und Modulationsdaten beurteilt.[253] Der reduzierte Wert ist mit  $v = 2n_f - p - 1$  ( $v$  ist die Anzahl der Freiheitsgrade,  $n_f$  ist die Anzahl der Modulationsfrequenzen,  $p$  ist die Anzahl der frei wählbaren Parameter) definiert als:

$$\chi_R^2 = \frac{1}{v} \sum_{i=1}^{n_f} \left[ \frac{[\phi_m \cdot (\omega_i) - \phi_c \cdot (\omega_i)]^2}{\sigma_\phi^2} + \frac{[M_m \cdot (\omega_i) - M_c \cdot (\omega_i)]^2}{\sigma_M^2} \right] \quad . \quad (2.34)$$

Die berechnete und gemessene Phasenverschiebung ist  $\phi_c(\omega_i)$  bzw.  $\phi_m(\omega_i)$ . Die berechnete und gemessene Modulation ist  $M_c(\omega_i)$  bzw.  $M_m(\omega_i)$ . Die Standardabweichung für die Phasenverschiebung und Modulation ist  $\sigma_\phi^2$  bzw.  $\sigma_M^2$ .

Die Fitgüte für die Fluoreszenzanisotropie wurde ebenfalls über die Methode der nichtlinearen Fehlerquadrate mit  $v = 2n_f - p - 1$  bestimmt [253]:

$$\chi_R^2 = \frac{1}{v} \sum_{i=1}^{n_f} \left[ \frac{[\Delta_m \cdot (\omega_i) - \Delta_c \cdot (\omega_i)]^2}{\sigma_\Delta^2} + \frac{[\Lambda_m \cdot (\omega_i) - \Lambda_c \cdot (\omega_i)]^2}{\sigma_\Lambda^2} \right] \quad . \quad (2.35)$$

Anstelle der Phasenverschiebung  $\phi(\omega)$  wird die differentielle Phase  $\Delta(\omega_i)$  verwendet, bzw. die Modulation  $M$  durch das Modulationsverhältnis  $\Lambda(\omega_i)$  ersetzt. Die berechnete und gemessene differentielle Phase ist  $\Delta_c(\omega_i)$  bzw.  $\Delta_m(\omega_i)$ . Das berechnete und gemessene Modulationsverhältnis ist  $\Lambda_c(\omega_i)$  bzw.  $\Lambda_m(\omega_i)$ . Die Standardabweichung für die differentielle Phase und das Modulationsverhältnis ist  $\sigma_\Delta^2$  bzw.  $\sigma_\Lambda^2$ . Die Werte des reduzierten  $\chi^2$  wurden in einem Bereich zwischen 0,3 und 5,4 bestimmt. Die *Fits* wurden mit der VINCI Analyse Software (ISS Inc., Champaign, IL, USA) durchgeführt.

Für die Protein-Messungen in Lösung wurde das Dansyl-gelabelte Calmodulin mit Tris-Puffer (20 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) auf eine Konzentration von 3  $\mu$ M verdünnt. Als erstes wurden die Lebenszeiten und die Anisotropie in Abwesenheit von K-Ras4B gemessen. Anschließend wurde K-Ras4B ( $c_{K-Ras4B} = 2 \mu$ M) hin-

---

zugegeben und die Lösung wurde für 15 min inkubiert. Danach wurde die anionische Lipid-*Raft*-Mischung (DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol 20:5:45:5:25 mol%) hinzupipettiert und noch einmal für 45 min inkubiert ( $c_{\text{Lipide}} = 0.4 \text{ mM}$ , Lipid/K-Ras4B Verhältnis 200:1). Nach der Stokes-Einstein-Beziehung ist die experimentell bestimmte Rotationskorrelationszeit  $\theta_{\text{Protein}}$  proportional zu der Größe (hydrodynamischer Radius/Volumen) des fluoreszierenden Proteins (hier: Dansyl-gelabeltes Calmodulin). Der Wert für die Rotationskorrelationszeit von 9,4 ns für Dansyl-gelabeltes Calmodulin in Lösung ist wesentlich größer als der Wert, der für ein hydratisiertes sphärisches Protein mit einem Molekülvolumen von  $32,4 \text{ nm}^3$  ( $\theta = 7,0 \text{ ns}$ ) berechnet wurde. Dementsprechend muss von einer nicht sphärischen Form des Calmodulins (monomerisch gebundenes Calcium) ausgegangen werden. Dies bestätigt auch die Hantel-ähnliche Form (siehe Röntgenkristallstrukturen Abbildung 1.7) von Calcium-gebundendem Calmodulin.

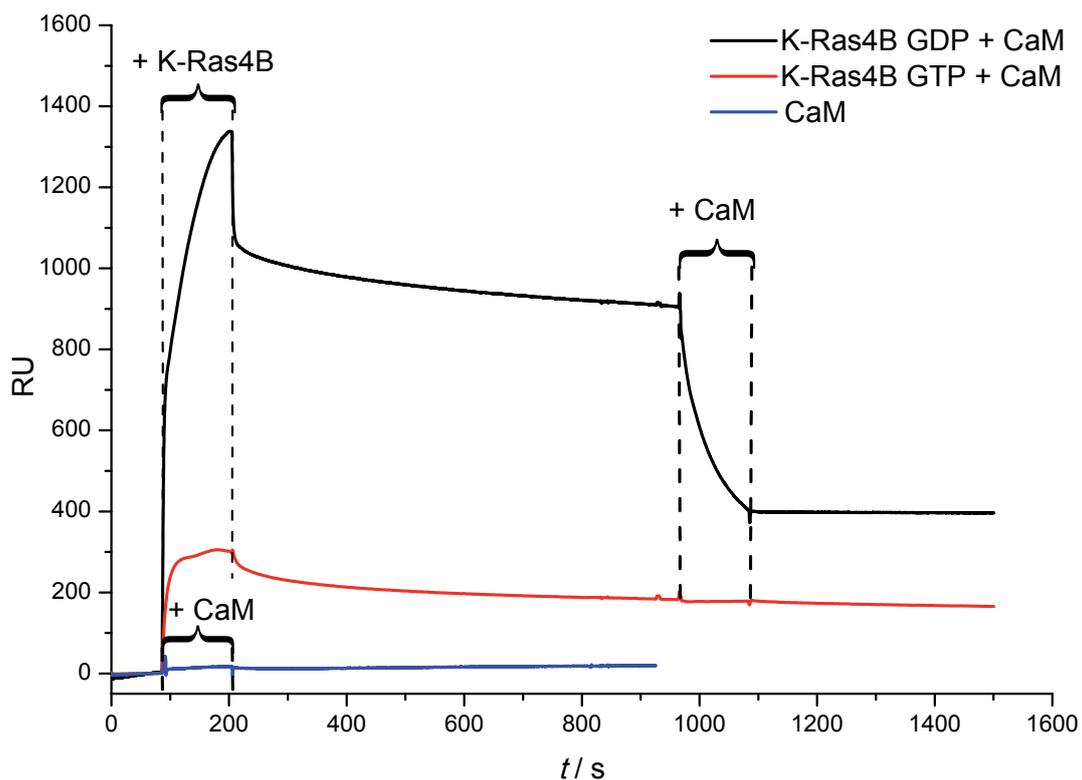


## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Interaktion zwischen Calmodulin und K-Ras4B in einem Membransystem

Das etablierte anionische *Raft*-Modellmembransystem mit der Lipidzusammensetzung DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol 20:5:45:5:25 mol% und der Phasenkoexistenz von *liquid-ordered* ( $l_o$ ) und *liquid-disordered* ( $l_d$ ) Phase imitiert heterogene Plasmamembranen mit unterschiedlicher Membranordnung.[34, 257] Phosphatidylglycerol (PG) ist ein weitverbreitetes Modelllipid für negative Phospholipide, das elektrostatische Effekte von monovalenten sauren Lipiden der Säugetiermembran nachahmt. Frühere Untersuchungen mit N-Ras und K-Ras4B haben gezeigt, dass die Membraninteraktion unabhängig der heterogenen Membranzusammensetzung ist.[192, 258, 259] Aufgrund dieses Erkenntnis wird das niedrig schmelzende Lipid DOPC bei Modellmembransystemen mit Phasenkoexistenz als Bestandteil der fluiden Phase verwendet. In dem folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Veröffentlichung *Regulation of K-Ras4B membrane binding by calmodulin* präsentiert und diskutiert.[260] Für die Experimente wurde semisynthetisches vollfunktionsfähiges lipidiertes GDP-gebundenes und GTP-gebundenes (GppNHP als nichthydrolisierbares GTP-Analogon) K-Ras4B [261] in An- und Abwesenheit von Calmodulin bzw. der anionischen *Raft*-Membran untersucht. Als erstes wurden SPR-Experimente durchgeführt, um die Dissoziationsfähigkeit von Calmodulin an Membran-gebundenes K-Ras4B zu untersuchen. Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie-Untersuchungen ermöglichen die Echtzeitdetektion von Bindungs- und Dissoziationskinetiken von Proteinen an und von der Membranoberfläche (ohne ein spezifisches *Labeling*) durch die Messung der unterschiedlichen Resonanzwinkel.[262]

Das erhaltene Sensorgramm ist eine Darstellung des SPR-Signals in *Resonance Units* ( $1 \text{ RU} = 1 \text{ pg} \times \text{mm}^{-2}$ , Oberflächenbedeckung mit Protein bezogen auf Protein pro Quadratmillimeter Oberfläche) gegen die Zeit.[263, 264] Für Calcium-gebundenes Calmodulin ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) konnte kein signifikanter Anstieg der *Resonance Units* nach der Proteininjektion (Abbildung 3.1 blaue Linie) beobachtet werden. Daraus kann man schließen, dass Calmodulin ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) nicht an die immobilisierte Membran bindet. Der Grund dafür sind die repulsiven Interaktionen zwischen der negativ geladenen Oberfläche von Calmodulin ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) (Nettoladung von -15 bei pH 7 bei der Bindung mit vier Calciumionen) und der anionischen Membran (Abbildung 1.8). Im Gegensatz dazu binden sowohl GDP- als auch GTP-gebundenes K-Ras4B an die anionische Modellmembran, was durch den Anstieg der RU-Werte nach der Proteininjektion deutlich wird.

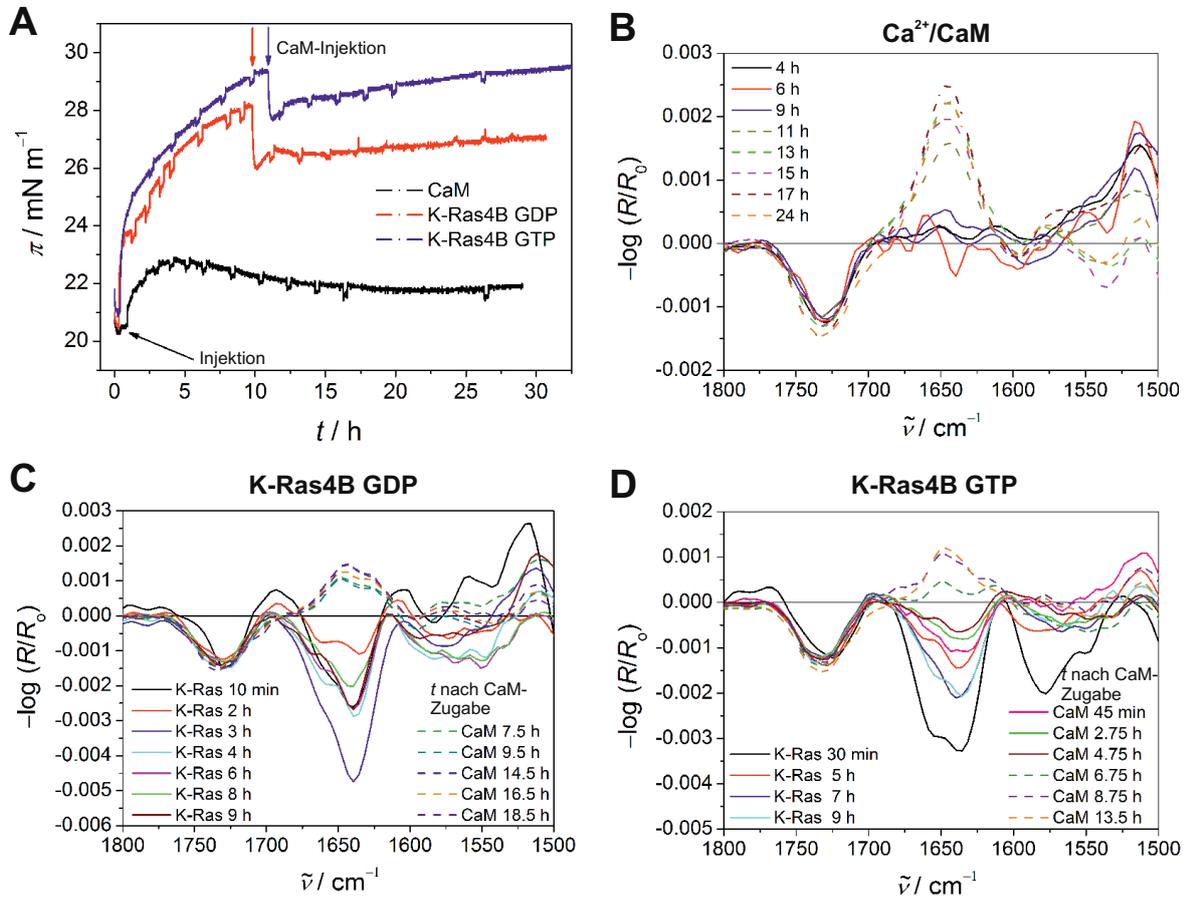


**Abbildung 3.1:** SPR-Sensorgramm der Bindung von GDP- und GTP-gebundenen K-Ras4B ( $c_{\text{K-Ras4B}} = 2 \mu\text{M}$ ) an die anionische Lipid-Raft-Membran mit anschließender Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  ( $c_{\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}} = 3 \mu\text{M}$ ).

Als Kontrolle wurde unfarnesyliertes K-Ras4B verwendet, dass keine signifikante Mem-

branbindung zeigte (*Regulation of K-Ras4B membrane binding by calmodulin: Supporting Information*, Abbildung S2).[260] Nach dem Wechsel der Proteinlösung zu Puffer, kann die Dissoziation von K-Ras4B von der Membran verfolgt werden. Die Dissoziation von der Membran führt zu einem quasi-irreversiblen gebundenen Proteinanteil von 72 und 65 % für K-Ras4B GDP und K-Ras4B GTP. Diese Ergebnisse bestätigen vorherige Resultate.[11] Die anschließende Zugabe von Calcium-gebundenem Calmodulin ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) sorgte für eine signifikante Reduzierung der RU-Werte, was auf eine Freisetzung von Membran-gebundenem K-Ras4B GDP hindeutet. Bei dem  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{K-Ras4B}$ -Komplex ist der Farnesylanker von K-Ras4B im hydrophoben Tunnel von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  lokalisiert, was eine Membranbindung des Farnesylankers in die Membran verhindert. Für aktives K-Ras4B konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Im Vergleich zur vorherigen Studie konnte keine Membranextraktion für sowohl aktives und inaktives K-Ras4B durch PDE $\delta$  beobachtet werden. Im Gegensatz zu  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  bindet PDE $\delta$  selbst mit einer relativ starken Affinität an heterogene Membranen.[11] Als zweites wurden für die Interaktion zwischen K-Ras4B und  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  an anionischen Lipid-*Raft*-Membranmonoschichten simultan IRRA-Spektren und die Oberflächendruckisotherme gegen die Zeit ( $\pi/t$ ) aufgenommen. Die IRRAS-Messungen wurden von Dr. Shobhna Kapoor durchgeführt. Bei IRRAS-Messungen basiert die langsame Kinetik der K-Ras-Verteilung auf der Abwesenheit von Konvektion, so dass der Diffusionsprozess zur Lipidgrenzfläche sehr langsam ist. *In vivo* ist dieser Prozess wesentlich schneller, was auf die unterschiedliche Dynamik in der biologischen Zelle zurückzuführen ist. Allerdings wird der hier untersuchte biophysikalische Prozess nicht durch die unterschiedliche Dynamik beeinflusst. Aufgrund der sehr langsamen Diffusion zur Lipidgrenzfläche kann jedes kinetische Intermediat durch IRRAS aufgelöst werden. Die Langzeitstabilität und Integrität der reinen Lipidmonoschicht an der  $\text{D}_2\text{O}$ -Subphase wurde mit einem Kontroll-Experiment bestätigt. Die Proteininjektion unterhalb der Lipidmonoschicht wurde bei  $\pi \approx 20 \text{ mN} \times \text{m}^{-1}$  durchgeführt. Die geringen Änderungen des Oberflächendrucks mit dem Verschwinden der Amid-I-Bande in den dazugehörigen IRRA-Spektren deuten darauf hin, dass  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  nicht an die Lipidmonoschicht bindet (Abbildung 3.2 Bild A und B). Stattdessen konnte eine Akkumulation von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  an der Luft/ $\text{D}_2\text{O}$ -Grenzfläche im Referenztrug beobachtet werden, was die

IR-Bande bei  $1646\text{ cm}^{-1}$  für die charakteristische  $\alpha$ -helicale Struktur von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  bestätigt (Abbildung 3.2 Bild B).



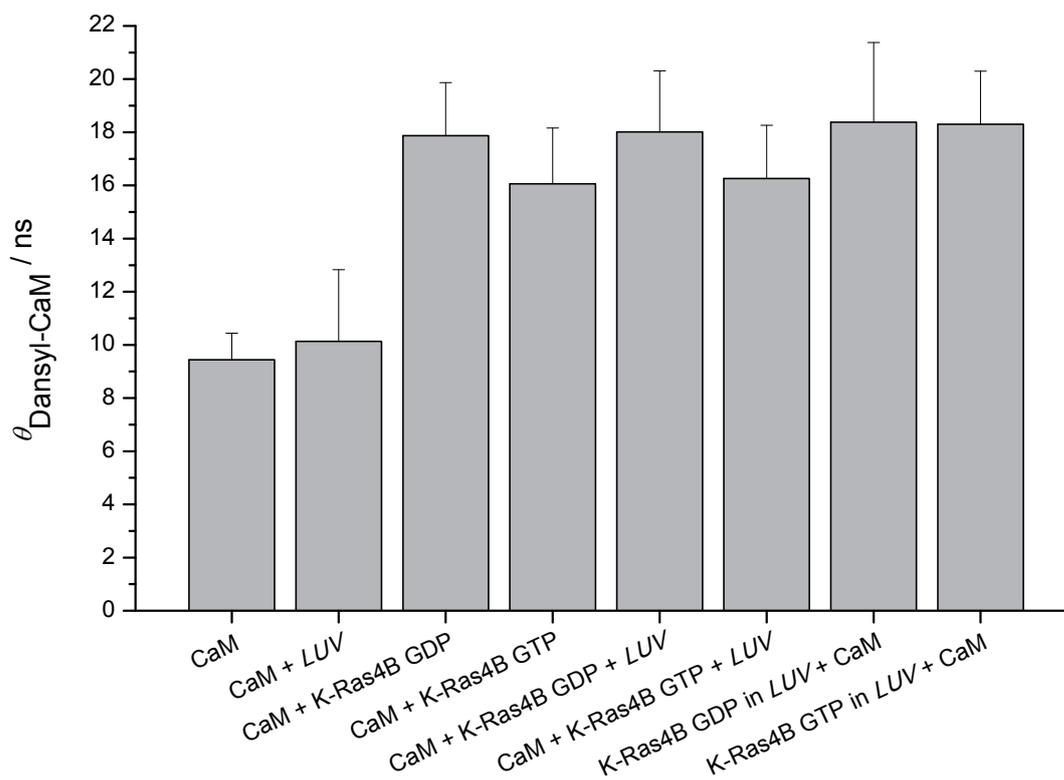
**Abbildung 3.2:** A: Oberflächendruckprofil von K-Ras4B GDP, K-Ras4B GTP und  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  nach der Interaktion mit der anionischen Lipid-Raft-Monoschicht. Nach  $\sim 10$  h wurde eine konzentrierte Lösung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  in die  $\text{D}_2\text{O}$ -Grenzphase injiziert und innerhalb von 15 min ist ein signifikanter Abfall des Oberflächendrucks für K-Ras4B GDP und K-Ras4B GTP zu beobachten. Die dazugehörigen IRRAS-Spektren für  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (B), K-Ras4B GDP (C) und K-Ras4B GTP (D) mit der anionischen Lipid-Raft-Membranmonoschicht ( $\sim 20\text{ mN} \times \text{m}^{-1}$ ) wurden mit p-polarisiertem Licht mit einem Einfallswinkel von  $35^\circ$  aufgenommen. In Bild C und D ist die Legende für die Proteinbindung an die Lipidmonoschicht in einem zeitabhängigen Bereich bis zu 9 h nach der Proteinzugabe zu der Membran dargestellt. Nach  $\sim 10$  h wurde Calmodulin in die  $\text{D}_2\text{O}$ -Grenzphase des Langmuir-Trogs injiziert, und die Legende für die Spektren nach der Calmodulin-Zugabe zu dem Membran-gebundenen K-Ras4B ist auf der rechten Seite dargestellt. Die gestrichelten Linien zeigen die Akkumulation des Proteins an der Luft/ $\text{D}_2\text{O}$ -Grenzphase im Referenztrug. Die IRRAS-Messungen wurden von Dr. Shobhna Kapoor durchgeführt.

Diese IRRAS-Ergebnisse bestätigen ebenfalls die repulsiven Interaktionen zwischen  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  und der anionischen Membran. Zum Vergleich: PDE $\delta$  hat eine Nettoladung

von -2 bei einem pH-Wert von 7,5. In vorherigen Studien konnte eine Interaktion mit den Kopfgruppen der Lipide zusammen mit einer starken Amid-I-Bandenintensität für PDE $\delta$  in den IRRA-Spektren detektiert werden. Dies deutet auf eine parallele Orientierung der  $\beta$ -Faltblätter von PDE $\delta$  an der Membranoberfläche hin.[11] Im Gegensatz zu Ca<sup>2+</sup>/CaM zeigen K-Ras4B GDP und K-Ras4B GTP eine intensive Amid-I-Bande in den IRRA-Spektren mit einem Maximum bei 1639 cm<sup>-1</sup> (Abbildung 3.2 Bild C und D). Das dazugehörige  $\pi/t$ -Profil (Abbildung 3.2 Bild A) deutet auf eine effektive Insertion des Farnesylinkers von K-Ras4B in die Lipidmonoschicht hin. Der Anstieg des Oberflächendrucks bestätigt diese Beobachtung. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit früheren Messungen von K-Ras4B an Membranen überein.[11, 192, 265] Dazugehörige FT-IR spektroskopische Messungen bestätigen die Langzeitstabilität der K-Ras4B Proteine in Ab- und Anwesenheit von Membranen durch die Detektion von keinen signifikanten Änderungen der Sekundärstruktur über den gesamten Zeitraum.[192, 266] Nach der Injektion von Ca<sup>2+</sup>/CaM in die D<sub>2</sub>O-Subphase des Langmuir-Trogs wurde ein signifikanter Abfall des Oberflächendrucks innerhalb von ca. 15 min detektiert (Abbildung 3.2 Bild A). Zusammen mit dem Verschwinden der Amid-I-Bande im IRRA-Spektrum (Abbildung 3.2 Bild C und D) und dem Auftreten des Proteins in der Luft/D<sub>2</sub>O-Grenzphase, deuten diese Beobachtungen auf eine partielle Extraktion des Membran-gebundenen K-Ras4B von der Lipidmonoschicht durch Ca<sup>2+</sup>/CaM hin. Dieser Vorgang ist unabhängig von der Nukleotidbeladung des K-Ras4B Proteins. In Übereinstimmung mit dem elektrostatischen Repulsionsmodell, führt die Bindung des stark negativ geladenen Ca<sup>2+</sup>/CaM an den polybasischen Bereich des Membran-gebundenen K-Ras4B, zu einer Umkehrung der Ladung durch die Repulsion des Komplexes von der anionischen Lipidmonoschicht. Hier kommt es zu einer Akkumulation des K-Ras4B/Ca<sup>2+</sup>/CaM-Komplexes an der Luft/D<sub>2</sub>O-Grenzschicht (gestrichelte Linien). Bei den früheren Untersuchungen mit PDE $\delta$  kommt es zu einer Dissoziation des K-Ras4B/PDE $\delta$ -Komplexes in Anwesenheit von anionischen Lipidmonoschichten, weil das  $\pi$ -Profil und das IRRA-Spektrum des Komplexes denen von aktivem und inaktivem Membran-gebundenen K-Ras4B ähnelt.[11]

Als dritte Methode wurden Fluoreszenzanisotropie-Messungen durchgeführt, um eindeutig feststellen zu können, ob Ca<sup>2+</sup>/CaM Membran-gebundenes K-Ras4B von der

Membran extrahieren kann. Die Lebenszeit-Messungen von Dansyl-gelabelten  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  in Puffer haben eine Fluoreszenzlebenszeit von  $15,9 \pm 0,4$  ns ergeben. Der erhaltene Wert für die Fluoreszenzlebenszeit steht in Übereinstimmung mit Literaturwerten.[267] Die anschließend durchgeführten Anisotropie-Messungen haben für die gesamte Rotationskorrelationszeit  $\theta$  einen Wert von  $9,4 \pm 0,9$  ns für  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  in Puffer ergeben. Frühere Untersuchungen bestätigen diesen Wert.[268, 269] Die Zugabe der Lipidvesikel hat keinen signifikanten Einfluss auf die  $\theta_{\text{Dansyl-CaM}}$ , was die SPR- und IRRAS-Ergebnisse mit der nicht vorhandenen Membranbindung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  bestätigen. Da die gesamte Rotationsbewegung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  von der Gesamtdimension des Proteins abhängig ist, wird für den Komplex mit K-Ras4B ein erheblicher Anstieg für die Rotationskorrelationszeit  $\theta_{\text{Dansyl-CaM}}$  erwartet.

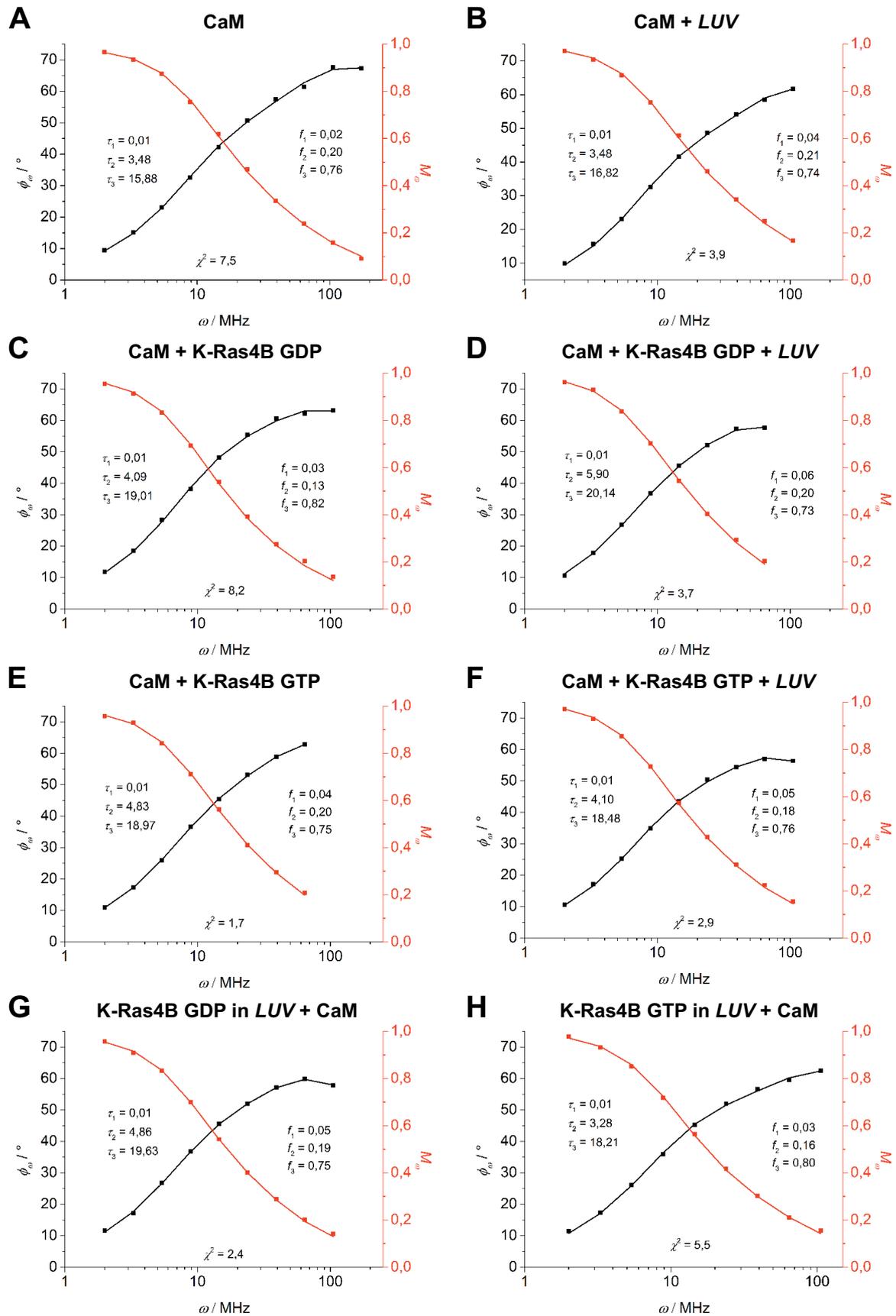


**Abbildung 3.3:** Diagramm der Rotationskorrelationszeiten von Dansyl-gelabelten  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  bei  $T = 25$  °C. Dargestellt sind die Ergebnisse für  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  in An- und Abwesenheit von GDP- und GTP-beladenem K-Ras4B und/oder der anionischen Lipid-Raft-Membran (Lipid/K-Ras4B-Verhältnis von 200:1). Die dazugehörigen *Fit*-Parameter sind in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 dargestellt.

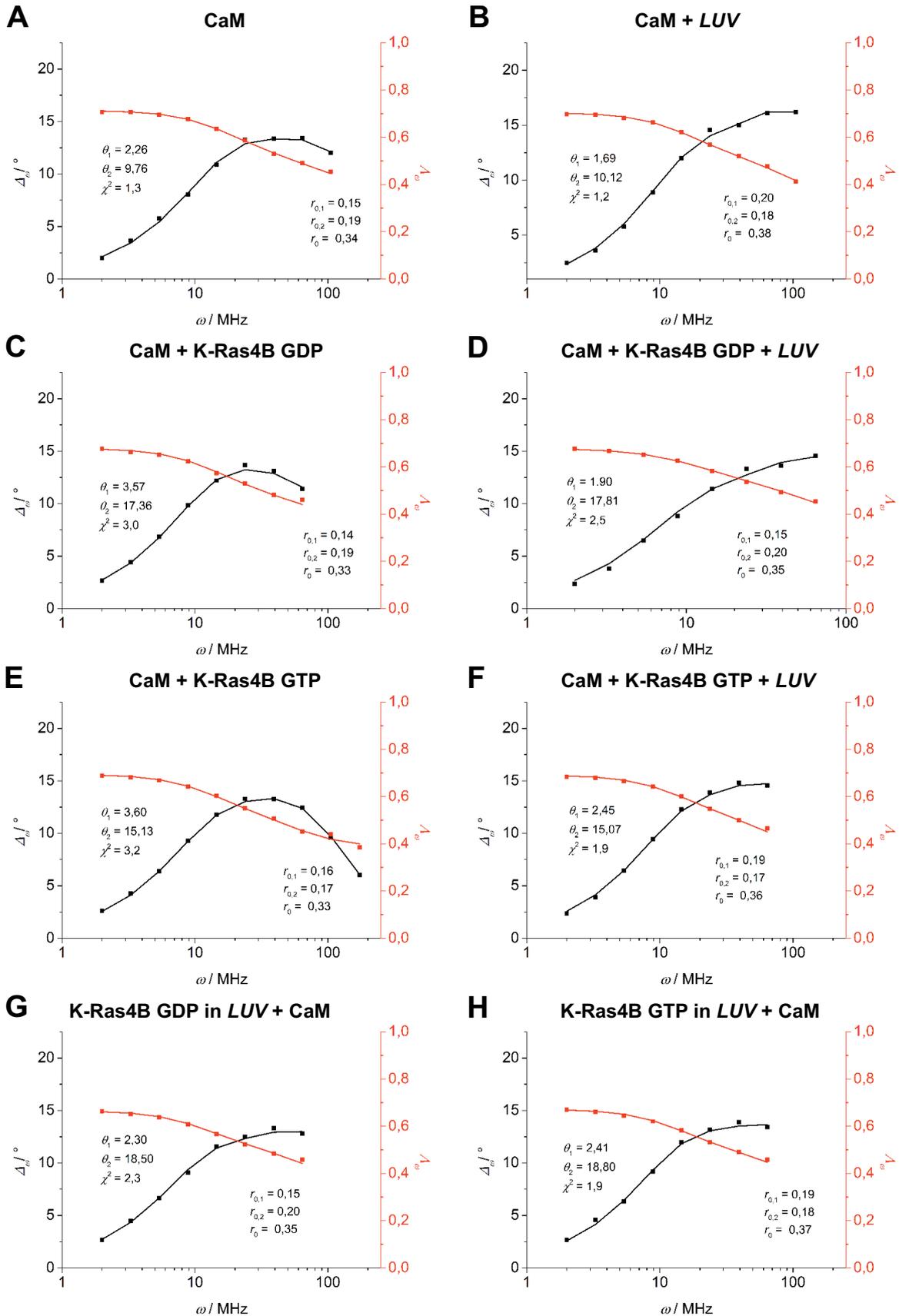
Diese Erwartung wurde durch die Messung der Rotationskorrelationszeit von 17,9 und

---

16,1 ns für den  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Komplex mit K-Ras4B GDP bzw. GTP in Lösung bestätigt. Die Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5 sowie die Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 zeigen repräsentative Daten der Fluoreszenzanisotropie-Messungen. In Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5 sind die repräsentativen *Fits* der einzelnen Messungen dargestellt. Die Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 zeigen die einzelnen Fluoreszenzlebens- und Rotationskorrelationszeiten der jeweiligen Messungen.



**Abbildung 3.4:** Repräsentative Daten der Phasenwinkel  $\phi_\omega$  und Modulation  $M_\omega$  für Dansyl-gelabeltes CaM unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (rot und schwarz). Die dazugehörigen Fits sind als durchgehende Linien dargestellt. Alle Werte sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.



**Abbildung 3.5:** Repräsentative Daten der Phasendifferenz  $\Delta_\omega$  und des Modulationsverhältnisses  $\Delta_\omega/\omega$  für Dansyl-gelabeltes CaM unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (rot und schwarz). Die dazugehörigen *Fits* sind als durchgehende Linien dargestellt. Alle Werte sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

**Tabelle 3.1:** Ergebnisse der Fluoreszenzlebenszeit-Analyse. Die Fluoreszenzlebenszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  von Dansyl-gelabeltem  $\text{Ca}^{2+}$ -geladenem CaM und die dazugehörigen anteiligen Beiträge  $f_1$  und  $f_2$  sind als Mittelwerte mit der Standardabweichung angegeben. Die  $\chi^2$  Werte wurden im Bereich von 1 bis 10 angegeben.

	$f_1$	$\tau_1$ / ns	$f_2$	$\tau_2$ / ns	$f_3$	$\tau_3$ / ns
CaM	$0,03 \pm 0,01$	0,01	$0,21 \pm 0,02$	$3,50 \pm 0,38$	$0,75 \pm 0,02$	$15,93 \pm 0,39$
CaM + LUV	$0,04 \pm 0,00$	0,01	$0,22 \pm 0,01$	$3,74 \pm 0,35$	$0,73 \pm 0,02$	$16,98 \pm 0,33$
CaM + K-Ras4B GDP	$0,03 \pm 0,01$	0,01	$0,17 \pm 0,04$	$4,56 \pm 1,16$	$0,78 \pm 0,03$	$19,23 \pm 1,27$
CaM + K-Ras4B GTP	$0,04 \pm 0,01$	0,01	$0,19 \pm 0,03$	$4,80 \pm 0,65$	$0,76 \pm 0,03$	$19,35 \pm 0,56$
CaM + K-Ras4B GDP + LUV	$0,05 \pm 0,01$	0,01	$0,20 \pm 0,02$	$4,96 \pm 0,95$	$0,74 \pm 0,02$	$19,79 \pm 0,71$
CaM + K-Ras4B GTP + LUV	$0,06 \pm 0,02$	0,01	$0,21 \pm 0,02$	$4,84 \pm 1,22$	$0,73 \pm 0,03$	$19,33 \pm 0,85$
K-Ras4B GDP in LUV + CaM	$0,04 \pm 0,02$	0,01	$0,19 \pm 0,03$	$4,06 \pm 1,33$	$0,77 \pm 0,04$	$19,30 \pm 0,65$
K-Ras4B GDP in LUV + CaM	$0,03 \pm 0,01$	0,01	$0,17 \pm 0,02$	$3,35 \pm 0,38$	$0,79 \pm 0,02$	$18,44 \pm 0,52$

**Tabelle 3.2:** Ergebnisse der Fluoreszenzanisotropie-Analyse. Die Rotationskorrelationszeiten  $\theta_1$  und  $\theta_2$  ( $\theta_2$  ist gleich der Gesamtrrotationskorrelationszeit des Proteins, z.B.  $\theta_2 = \theta_{\text{Dansyl-CaM}}$ ) des Dansyl-gelabelten  $\text{Ca}^{2+}$ -geladenen CaM und die dazugehörigen Werte für  $r_{0,1}$  und  $r_{0,2}$  sind als Mittelwerte mit der Standardabweichung angegeben. Die  $\chi^2$  Werte wurden im Bereich von 0,3 bis 5,4 angegeben.

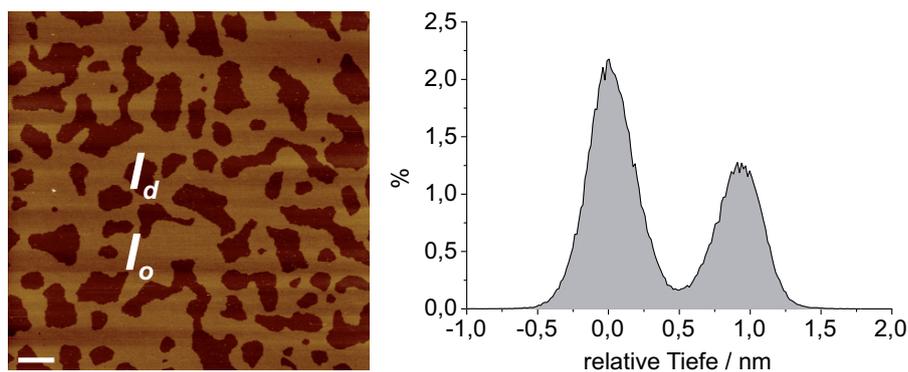
	$r_{0,1}$	$\theta_1$ / ns	$r_{0,2}$	$\theta_2$ / ns	$r_0$
CaM	$0,15 \pm 0,03$	$1,97 \pm 0,54$	$0,20 \pm 0,02$	$9,44 \pm 0,87$	$0,35 \pm 0,02$
CaM + LUV	$0,19 \pm 0,06$	$1,87 \pm 0,73$	$0,18 \pm 0,06$	$10,13 \pm 2,73$	$0,37 \pm 0,01$
CaM + K-Ras4B GDP	$0,15 \pm 0,02$	$3,62 \pm 0,60$	$0,19 \pm 0,02$	$17,87 \pm 1,29$	$0,33 \pm 0,01$
CaM + K-Ras4B GTP	$0,15 \pm 0,02$	$3,68 \pm 0,69$	$0,18 \pm 0,02$	$16,06 \pm 2,09$	$0,33 \pm 0,01$
CaM + K-Ras4B GDP + LUV	$0,19 \pm 0,03$	$2,22 \pm 0,60$	$0,17 \pm 0,02$	$18,01 \pm 2,30$	$0,36 \pm 0,01$
CaM + K-Ras4B GTP + LUV	$0,18 \pm 0,03$	$2,26 \pm 0,72$	$0,18 \pm 0,03$	$16,26 \pm 1,70$	$0,36 \pm 0,01$
K-Ras4B GDP in LUV + CaM	$0,16 \pm 0,01$	$2,47 \pm 0,77$	$0,20 \pm 0,02$	$18,38 \pm 0,55$	$0,36 \pm 0,02$
K-Ras4B GDP in LUV + CaM	$0,19 \pm 0,01$	$2,41 \pm 0,58$	$0,18 \pm 0,02$	$18,30 \pm 1,72$	$0,36 \pm 0,02$

Die spätere Zugabe der Lipidvesikel zu dem Komplex hat die Rotationsdynamik von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  nicht verändert. Somit bindet  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  an K-Ras4B in Ab- und Anwesenheit von Membranen, unabhängig der Nukleotidbeladung. Außerdem wurde für den  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{K-Ras4B}$ -Komplex keine Membranbindung detektiert, da es sonst zu einer Erhöhung der Rotationskorrelationszeit kommen müsste, wie in früheren Messungen für K-Ras4B gezeigt wurde.[11] Der Komplex aus  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  und K-Ras4B erwies sich in Anwesenheit von anionischen Membranen als stabil, weil eine Dissoziation zu einem ähnlichen Wert wie für die Rotationskorrelationszeit von Dansyl-CaM in Puffer führen würde. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Daten von

PDE $\delta$ , welche eine Dissoziation des K-Ras4B/PDE $\delta$ -Komplexes nach der Membranbindung zur Folge hat.[11]

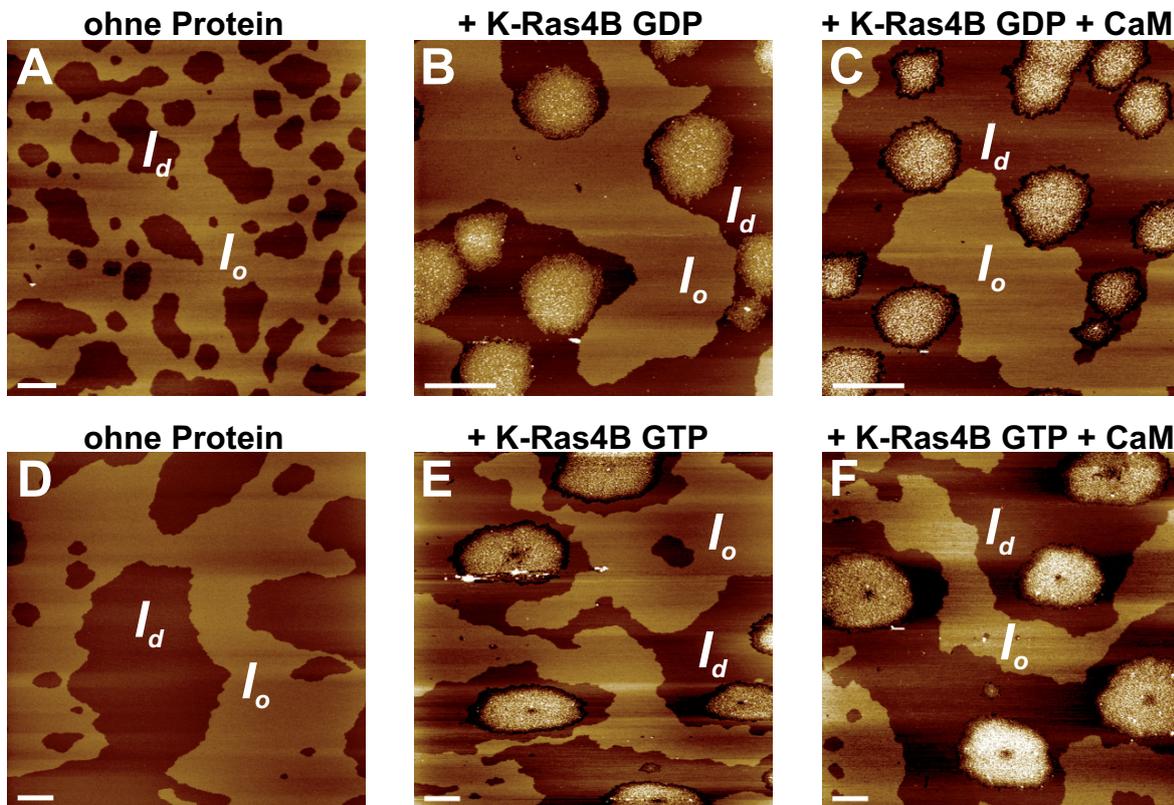
Um die direkte Freisetzung von Membran-gebundenem K-Ras4B durch Ca<sup>2+</sup>/CaM zu bestätigen, wurde K-Ras4B mit den Lipidvesikeln inkubiert und im Anschluss Ca<sup>2+</sup>/CaM hinzugegeben. Vorherige Ergebnisse haben eine stabile Membranbindung von K-Ras4B unter diesen Bedingungen bestätigt.[11, 270] Für das BODIPY-gelabelte K-Ras4B GDP und GTP konnte in Ab- und Anwesenheit von Membranen eine Rotationskorrelationszeit von 15 ns bzw. 25 ns ermittelt werden. Diese Änderung in der Rotationskorrelationszeit wurde durch die Bindung von K-Ras4B an *LUVs* durch die gleichen Experimente mit unlipidiertem K-Ras4B geprüft. Dabei ergab die Rotationskorrelationszeit einen Wert von 13 ns für die Nicht-Membran-Bindung.[11, 270] Es ist bekannt, dass K-Ras4B nach der Membranbindung stabil in der Membran lokalisiert ist.[192] Hierbei beträgt die Rotationskorrelationszeit  $\theta_{\text{Dansyl-CaM}}$  18,3 ns für K-Ras4B GDP und GTP. Dieser Wert zeigt deutlich, dass Ca<sup>2+</sup>/CaM in der Lage ist, Membran-gebundenes K-Ras4B zu binden und von der anionischen Membran zu extrahieren, unabhängig der Nukleotidbeladung des K-Ras4B.

Als letztes wurden zeitabhängige AFM-Messungen (Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8) durchgeführt, um ergänzende räumliche Information auf Molekülebene zu erhalten. Die von K-Ras4B bekannten Proteinzusammenlagerungen (*Cluster*) wurden in der *l<sub>d</sub>*-Phase für GDP- und GTP-gebundenes K-Ras4B (Abbildung 3.7B und D) beobachtet.



**Abbildung 3.6:** AFM-Bild der Lipidmembran DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol 20:5:45:5:25 (mol%) auf der Micaoberfläche vor der Proteininjektion in die Flüssig-AFM-Zelle. Der Maßstab ist 1  $\mu\text{m}$ . Das Histogramm des AFM-Bilds ist auf der rechten Seite abgebildet. Die Höhendifferenz zwischen der *l<sub>d</sub>*- und *l<sub>o</sub>*-Phase wurde aus dem AFM Histogramm mit 0,9 nm bestimmt. Vorherige Ergebnisse bestätigen die Differenz von  $\sim 1$  nm zwischen den beiden Phasen.[192]

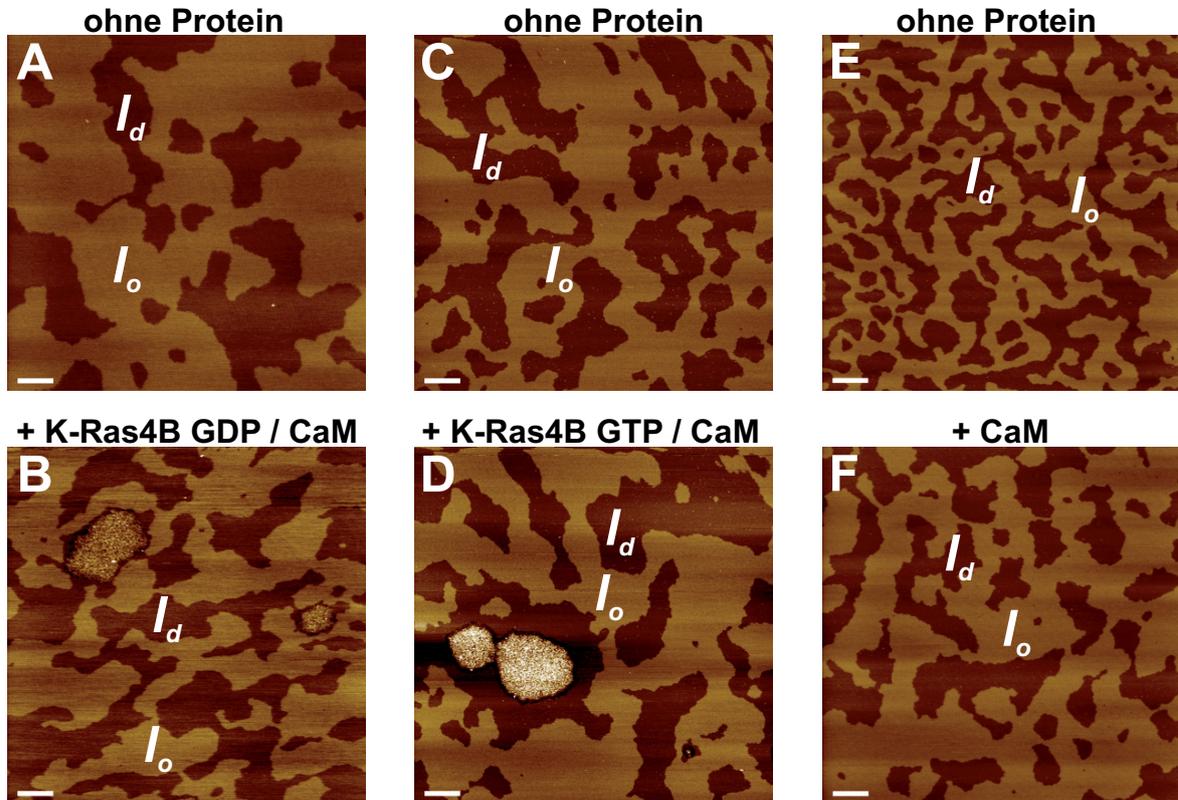
Diese Beobachtungen stehen in gutem Einklang mit vorherigen Untersuchungen zur Membranlokalisation von K-Ras4B.[11, 192]



**Abbildung 3.7:** AFM-Bilder der Interaktion von K-Ras4B GDP und K-Ras4B GTP mit der anionischen Lipid-*Raft*-Mischung und anschließender  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Zugabe. Dargestellt sind repräsentative AFM-Bilder (A und D) vor und nach (B und E) der Injektion von 800  $\mu\text{l}$  K-Ras4B ( $c_{\text{K-Ras4B}} = 0,2 \mu\text{l}$ ) in die Flüssig-AFM-Zelle. Nach der Bildung der K-Ras4B angereicherten Domänen (*Clustering*) in der  $l_d$ -Phase der zweiphasigen anionischen Membran wurde eine 0,3  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ /CaM Proteinlösung in die Flüssig-AFM-Zelle injiziert (C und F), um den Effekt von  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM auf Membran-gebundenes K-Ras4B GDP und GTP zu untersuchen. Die gesamte Höhe der vertikalen Farbskala von dunkelbraun bis weiß entspricht 8 nm für jedes Bild. Der Maßstab ist 1  $\mu\text{m}$ .

Die jeweiligen AFM-Bilder der anionischen *Raft*-Membran vor und nach der Zugabe von K-Ras4B sind in Abbildung 3.7A bzw. B und D bzw. E dargestellt. Aufgrund der elektrostatischen Repulsion zeigt  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM (Abbildung 3.8F) selbst keine Membranbindung. Allerdings wurden nach der Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM zu Membran-gebundenem K-Ras4B (Abbildung 3.7C und F) keine signifikanten Änderungen beobachtet. Ein Grund dafür könnten die großen dicht-gepackten K-Ras4B-*Cluster* sein, die die  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM Bindung zu Membran-gebundenen K-Ras4B erschweren und so ei-

ne K-Ras4B-Extraktion erschweren oder sogar verhindern. Ebenso können sterische Zwänge durch den geringen Abstand zwischen der Lipiddoppelschicht und dem festen Trägermaterial (Mica) auftreten, die die laterale Organisation der Proteine verändert.



**Abbildung 3.8:** AFM-Bilder der Interaktion von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  mit K-Ras4B GDP und K-Ras4B GTP mit der anionischen Lipid-Raft-Mischung. Die repräsentativen AFM-Bilder (B: inaktives K-Ras4B und D: aktives K-Ras4B) zeigen die Membraninteraktion nach der Zugabe von vorher gemischtem K-Ras4B/ $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Komplex nach  $\approx 1$  h. Das dazugehörige AFM-Bild vor der Proteininjektion ist in A und C zusehen. Die repräsentativen AFM-Bilder E und F zeigen die anionische Membran vor und nach der Injektion von  $800 \mu\text{l}$   $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  ( $c_{\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}} = 0,3 \mu\text{M}$ ). Die gesamte Höhe der vertikalen Farbskala von dunkelbraun bis weiß entspricht  $8 \text{ nm}$  für jedes Bild. Der Maßstab ist  $1 \mu\text{m}$ .

Bei dem vorher gemischten Komplex aus  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  und K-Ras4B konnte nach der Zugabe zu den anionischen Membranen in den AFM-Bildern eine wesentlich geringere Anzahl an K-Ras4B-Clustern (Abbildung 3.8B und D) beobachtet werden. Das deutet darauf hin, dass  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  in der Lage ist, an K-Ras4B in Lösung zu binden und eine Membranbindung von K-Ras4B zu hemmen, unabhängig der K-Ras4B-Nukleotidbeladung. Im Gegensatz dazu haben frühere AFM-Untersuchungen gezeigt, dass die Zugabe des K-Ras4B/PDE $\delta$ -Komplexes zu anionischen Membranen zu AFM-

Bildern führt, die ähnlich wie die AFM-Bilder der Einzelkomponenten aussehen, nur dass der Komplex nach der Membranbildung komplett dissoziiert.[11]

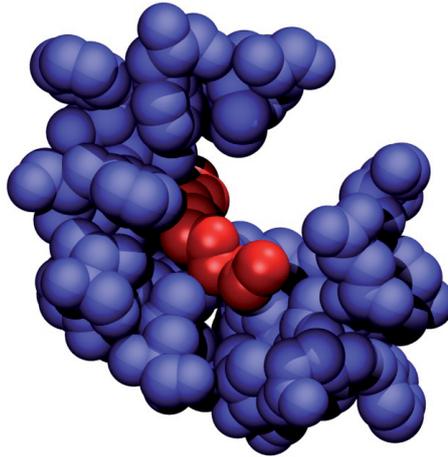
Zusammengefasst zeigen die IRRAS- und Fluoreszenzanisotropie-Messungen deutlich, dass  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  Membran-gebundenes K-Ras4B bindet und von der negativ geladenen Membran dissoziiert, unabhängig von der Nukleotidbindung. In Übereinstimmung mit dem elektrostatischen Repulsionsmodell führt die Bindung des stark negativ geladenen  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  an die polybasische Region von K-Ras4B zu einer Umkehrung der Ladung und es kommt zu einer Repulsion des Komplexes von der anionischen Lipidmembran. Ein Farnesylanker ist für eine effiziente und stabile Bindung von Ras-Proteinen in Membranen nicht ausreichend. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass der K-Ras4B/ $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Komplex nicht an anionische Membranen bindet, weil der Farnesylanker in der hydrophoben Bindetasche von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  lokalisiert ist und es zu elektrostatischen repulsiven Interaktionen kommt. Ein ähnlicher Mechanismus wie für die Interaktion zwischen  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  mit K-Ras4B wurde für die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  mit einem myristoylierten Alanin-reichen C-Kinase Substrat (MARKS = *myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*) detektiert. Wie oben für den Farnesylanker beschrieben, genügt auch ein Myristoylanker nicht, um das Protein stabil an die Membran zubinden, so dass die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  an die zentrale Region von MARCKS zu einer erwartenden Abstoßung des Komplexes von der Membran führt. Dieser Vorgang führt zu einer Translokation von MARCKS von der Plasmamembran hin zum Cytoplasma.[271, 272]

Eine Plasmamembranbindung des K-Ras4B/ $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Komplexes ist somit nicht mehr möglich und dies deutet auf eine Inhibierungsfunktion von Ras-Effektoren hin. Als Beispiele sind hier die Raf-Kinase und auch die ERK1/2-Aktivierung zu nennen, die beide eine Membranassoziation für ihre korrekte Funktion benötigen. *In vivo* kann  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  als negativer Regulator für die K-Ras4B-Signalkaskade angesehen werden, der K-Ras4B von der negativ geladenen Membran löst und so die Plasmamembranlokalisation verhindert. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit früheren Resultaten, die gezeigt haben, dass  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  eine essentielle Rolle in der *Downstream*-Regulierung des ERK-Signaltransduktionswegs in Fibroblasten spielt.[273] Diese Inaktivierung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  ermöglicht die Aktivierung von K-Ras4B. [274]  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  scheint ein wich-

tiger Regulator für die spezifische K-Ras4B-Interaktion zu sein, weil  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  nur K-Ras4B und nicht N-Ras, K-Ras4A oder H-Ras bindet. Der polybasische Bereich von K-Ras4B scheint ein reversibler durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  regulierter molekularer Schalter zu sein, der K-Ras4B von der Membran löst und so für eine partielle Neusortierung in den Neuronen sorgt. [275] Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung zeigt, dass die Bindung von K-Ras4B an  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  zu einer nachhaltigen Unterdrückung des Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signals führt, was zu einer erhöhten Kanzerogenität führt. Die Autoren schlagen das Blockieren dieser Ras-Isoform spezifischen  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Interaktion als möglichen neuen Ansatz für ein selektives K-Ras *Targeting* vor. [276]

Es gibt Hinweise darauf, dass  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  an K-Ras4B binden kann und es dann von der Membran dissoziiert, unabhängig von der Nukleotidbeladung des K-Ras4B. [275, 277] Im Gegensatz zu diesen Studien zeigt eine aktuelle Studie, dass eine Inhibierung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  die Dissoziationsrate von aktivem K-Ras4B von der Plasmamembran reduziert. [278] In Lösung konnte eine äquimolare Bindung zwischen K-Ras4B GTP und  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  mit mikromolarer Affinität nachgewiesen werden. [274, 279, 280] Die genaue Interaktion zwischen  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  und K-Ras4B ist bis heute nicht komplett verstanden. Aufgrund dessen wird im nächsten Abschnitt die zentrale Fragestellung bezüglich der Art und Weise der Interaktion zwischen  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  und K-Ras4B diskutiert. Vorherige Studien haben drei verschiedene Regionen von K-Ras4B als mögliche Bindungsstellen für eine  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Interaktion aufgezählt. Die Hypervariable Bindungsstelle (HVR = *Hypervariable Region*) mit dem Farnesylrest und der polybasischen Region ist essentiell für die Bindung. Die amphipathische  $\alpha 5$ -Helix und die *Switch* II-Region sind weitere mögliche Bindestellen. [275, 279–281] Die Relevanz der Farnesylierung für die K-Ras4B Bindung mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  konnte durch verschiedene Untersuchungen gezeigt werden. [275, 281] Die Studien deuten darauf hin, dass  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  in der Lage ist, farnesylierte Proteine zubinden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen in dieser Arbeit. Bisher gibt es allerdings noch keine Kristallstruktur oder NMR-Untersuchungen, die diese Bindung zeigen. Die Kristallstruktur eines Komplexes aus  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  und einem myristoylierten Peptid mit einem polybasischen Bereich aus Lysin (myr-GGKLSK) zeigt eine ellipsenförmige Struktur für Calmodulin. Die hydrophoben Bereiche stehen mit dem Myristoylmotiv in Kontakt. [282] Die

Autoren zeigen, dass die Calmodulinreste innerhalb von 5 Å in der Myristoylgruppe hauptsächlich hydrophob sind und dass mehrere hydrophobe Interaktionen für die Bindung verantwortlich sind. Abbildung 3.9 zeigt die Bindung zwischen den beteiligten Calmodulinresten und der Myristoylgruppe im hydrophoben Tunnel, der sich durch die Komplexbildung bildet.

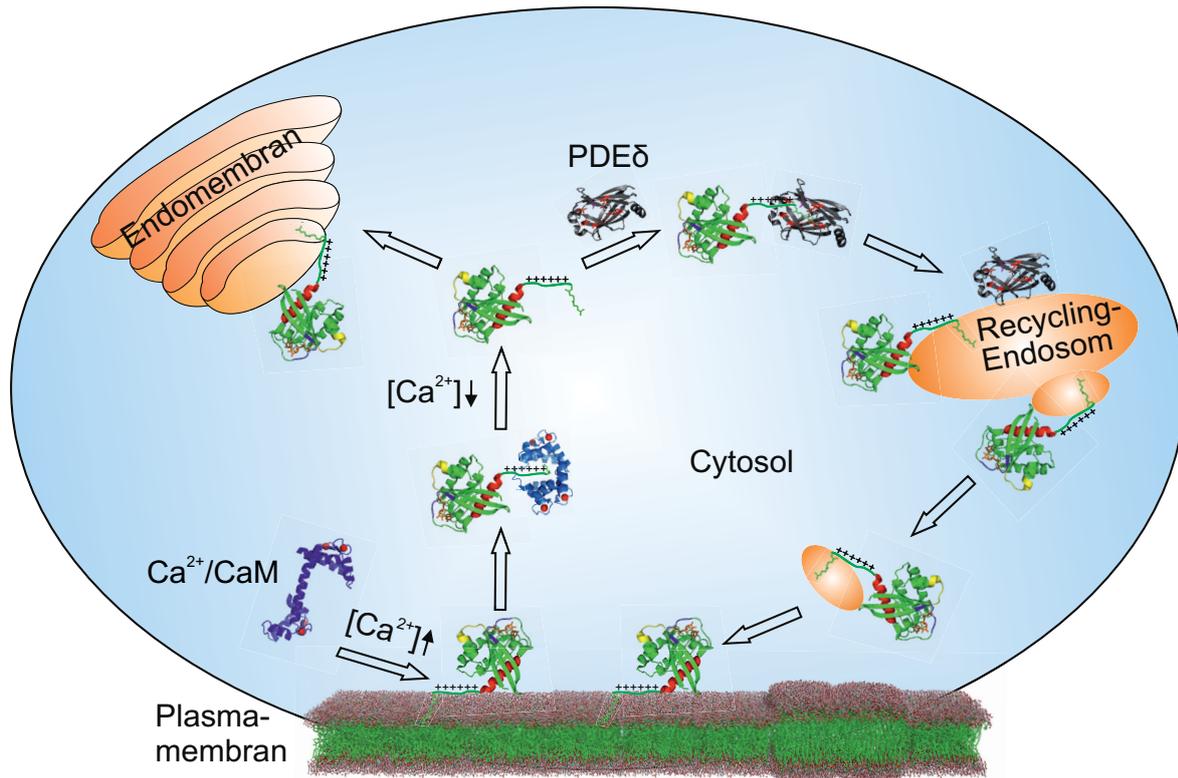


**Abbildung 3.9:** Schematische Darstellung der Bindung zwischen der Myristoylgruppe und dem hydrophoben Tunnel von Calmodulin (1L7Z). Die an der Bindung beteiligten Calmodulinatome sind in blau mit ihrem van-der-Waals-Radius dargestellt. Die Myristoylgruppe ist in rot dargestellt. Die räumliche Darstellung erfolgte mit 7 Å. Erstellt mit VMD (*Visual Molecular Dynamics* [283]) von Prof. Dr. Kast und Florian Mrugalla.

Die Abbildung 3.9 wurde mit dem Programm VMD (*Visual Molecular Dynamics*) erstellt. Das Raummodell zeigt, dass obwohl der Farnesylrest im Vergleich zum Myristoylrest, ungesättigt und verzweigt ist, dass die Bindetasche groß genug ist, um auch den sperrigeren Farnesylanker binden zu können.

Der Grund für die scheinbare Diskrepanz zwischen den SPR-Ergebnissen, die zeigen, dass nur eine Extraktion von K-Ras4B GDP durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  durchgeführt wird, und den restlichen Ergebnissen, die keine signifikante Nukleotidabhängigkeit festgestellt haben, liegt wahrscheinlich an den unterschiedlichen Anteilen des *Clustering* für K-Ras4B GDP bzw. GTP in den immobilisierten Membranen. Das Proteinclustering ist für die aktive Proteinform in Lipiddoppelschichten mehr ausgeprägt, als die AFM-Experimente für K-Ras und N-Ras zeigen.[76, 192] Daher sind die sterischen Zwänge durch das starke *Clustering* ein wahrscheinlicher Grund für die beobachtete Nukleotid-

abhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  Bindung an Membran-gebundenes K-Ras4B bei den SPR-Messungen. Bei den IRRAS- und den Fluoreszenzanisotropie-Experimenten ist ein festes Trägermaterial für die Membranimmobilisierung (entsprechend zu der höheren lateralen Beweglichkeit der Lipide an der Luft/ $\text{D}_2\text{O}$ -Grenzfläche bei den IRRAS-Messungen und den freien Lipidvesikeln bei den Anisotropie-Messungen) nicht nötig. Das Fehlen der signifikanten Extraktion von Membran-gebundenem K-Ras4B durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  bei den AFM-Messungen, kann durch die große K-Ras4B-Clustergröße erklärt werden, die die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  an K-Ras4B, welches an der Membran gebunden ist, die wiederum an eine feste Trägeroberfläche gekoppelt ist, einschränkt. Die sterischen Zwänge können zusätzlich durch den geringen Abstand der immobilisierten Lipiddoppelschicht an der festen Trägeroberfläche (ca. 0,5 bis 2,0 nm in wässriger Lösung) induziert werden, die eine Verschiebung der Proteine behindern können. Da die Clustergröße *in vivo* [284] wesentlich kleiner ist als die bei den *Clustern* in den Mikrodomänen, die in den Experimenten für die immobilisierte Membran benutzt wurden, wird angenommen, dass die Membranextraktion durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  unabhängig der GTP-Beladung ist, wie in den IRRAS- und den Fluoreszenzanisotropie-Messungen deutlich zu sehen ist. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen an PDE $\delta$ , ist der  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{K-Ras4B}$ -Komplex in der Anwesenheit von anionischen Membranen stabil. In der Studie zu PDE $\delta$  konnte gezeigt werden, dass PDE $\delta$  K-Ras4B nicht von der heterogenen Modellmembran extrahieren kann, unabhängig der Nukleotidbeladung. Die erhöhte Affinität des K-Ras4B/PDE $\delta$ -Komplex an die anionische Membran und die Beobachtung, dass es nach Membranbindung zu einer Freisetzung von K-Ras4B und PDE $\delta$  kommt, führt zu einem Vorschlag für einen effektiven Transportmechanismus von PDE $\delta$  solubiliertem K-Ras4B zur Plasmamembran.[11] Dies steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Bastiaens *et al.*, die zeigen, dass die Bindung von K-Ras4B an PDE $\delta$  eine passive Sequestration im Cytoplasma von Membranen-dissoziiertem K-Ras4B ist.[285]



**Abbildung 3.10:** Schematische Abbildung des durch PDE $\delta$  und Ca $^{2+}$ /CaM modulierten K-Ras4B-Lokalisationszyklus. Ca $^{2+}$ /CaM extrahiert K-Ras4B von der Plasmamembran bei einem erhöhten Level an intrazellulären freien Calciumionen. Dieser Prozess kann durch eine Reduzierung der meist negativen Oberflächenladung der Plasmamembran nach dem Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration gefördert werden. Nach der Zellstimulation sinkt die freie Calciumkonzentration [Ca $^{2+}$ ], was zu einer Dissoziation des Ca $^{2+}$ /CaM/K-Ras4B-Komplexes führt. Im Cytosol kann K-Ras4B an Endomembranen oder an PDE $\delta$  binden, wobei die PDE $\delta$ -Bindung zu einer Solubilisierung von K-Ras4B führt und die cytoplasmatische Diffusion erleichtert. Wenn der PDE $\delta$ /K-Ras4B-Komplex die negativen Recycling-Endosomen erreicht, wird K-Ras4B freigesetzt, und der Farnesylanker kann an die Membran binden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Bastiaens *et al.* kann ein direkter vesikulärer Transport von K-Ras4B zurück zur Plasmamembran, wo es wiederum *Cluster* in der  $l_d$ -Phase bildet, vorgeschlagen werden.[286]

Berücksichtigt man nun die aktuellen Ergebnisse, erhält man einen Einblick in den dynamischen räumlichen Organisationszyklus von Ras.[286] Dieser Zyklus zeigt, dass PDE $\delta$  und Ca $^{2+}$ /CaM beide an der Steuerung der Plasmamembranlokalisierung von K-Ras4B beteiligt sind. Dabei spielt Ca $^{2+}$ /CaM bei der Regulation der Membranbindung von K-Ras4B eine andere Rolle als PDE $\delta$ . Da die Signalaktivität von K-Ras4B intrinsisch an das Niveau der Anreicherung an der Plasmamembran gebunden ist, kön-

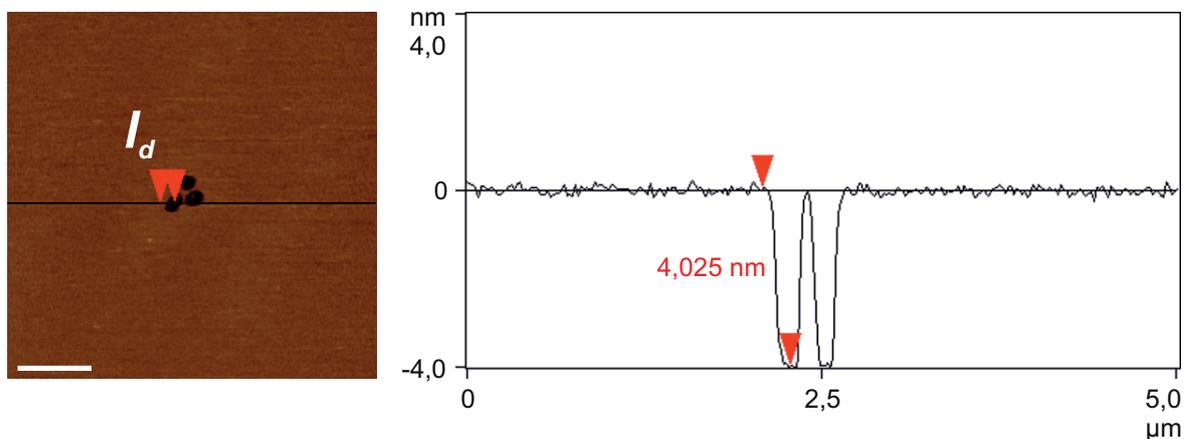
---

nen Störungen der K-Ras4B-Lokalisation an der Plasmamembran zu einer Möglichkeit führen, das Zellwachstum zu beeinflussen und dem onkogenen K-Ras4B-Signalweg entgegen zu wirken.

## 3.2 Rasterkraftmikroskopische-Untersuchungen von K-Ras4B an Membransystemen mit verschiedenen Anteilen an Phosphatidylserin

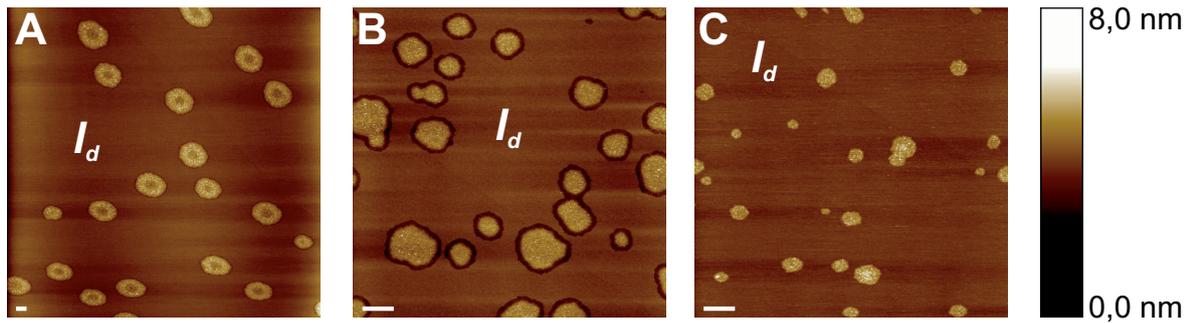
Vorherige Untersuchungen haben sich auf die Membraninteraktion von N-Ras und K-Ras4B mit neutralen dreifachen (DOPC/DPPC/Chol, POPC/DPPC/Chol, POPC/PSM/Chol) und anionischen fünffachen (DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol) Lipidmischungen konzentriert.[76, 192, 258, 259, 261, 266, 287, 288] Die oben genannten heterogenen Modellmembranen sind fest etabliert und gut untersucht. Sie bilden ein Zwei-Phasen-System mit einer *liquid-ordered* ( $l_o$ ) und *liquid-disordered* ( $l_d$ ) Phase aus, welches eine heterogene Plasmamembran mit unterschiedlichen Membranbereichen nachbildet.[257] Blosser *et al.* haben gezeigt, dass monovalente saure Lipide nur einen geringen Effekt auf die Mischbarkeit und das Phasenverhalten in den fünffachen Membransystemen haben.[289] Die Berücksichtigung von negativ geladenen Lipiden ist für K-Ras4B relevant, da die positiv geladenen Lysinreste des Proteinankers mit den negativen Lipiden der Membran interagieren. Frühere Studien haben gezeigt, dass die polybasische Domäne von K-Ras4B keine spezifische Bindung mit mono- und polyanionischen Phospholipiden der inneren Plasmamembran eingeht.[290] Phosphatidylglycerol (PG) wird oft als einfaches Modell für negativ geladene Phospholipide verwendet, das elektrostatische Effekte von monovalenten sauren Lipiden in Säugtiermembranen nachahmt. Für Phosphatidylserin (PS) werden spezifische Interaktionen mit K-Ras4B vermutet.[291, 292]. Im nächsten Abschnitt werden die Ergebnisse der Veröffentlichung *Lipoprotein insertion into membranes of various complexity* diskutiert.[293] Für die Untersuchungen wurde Phosphatidylserin in homogenen zweifachen und heterogenen fünffachen Lipidmembransystemen hinzugefügt. Dabei wurde der Einfluss auf die laterale Membranorganisation und das *Clustering* von K-Ras4B untersucht.[293] Für N-Ras HD/Far-Proteine ist bekannt, dass diese bevorzugt in der  $l_d$ -Phase von heterogenen Modellmembranen lokalisiert sind. Eine zeitabhängige Diffusion und anschließendes *Clustering* in der Grenzfläche der  $l_o/l_d$ -Phase konnten unabhängig der Nukleotidbeladung beobachtet werden.[76, 258, 259] Um den Effekt von

Phosphatidylserin auf die laterale Organisation von K-Ras4B zu untersuchen, wurde die Verteilung von K-Ras4B in einer homogenen fluiden DOPC-Phase und in einer DOPC/DOPS-Lipiddoppelschicht ( $l_d$ -Phase) mit räumlich hochauflösenden AFM-Experimenten untersucht (Abbildung 3.12, Abbildung 3.13, Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15). Für den Interaktionsprozess zwischen dem Protein und der Membran wurde die gleiche Membranregion zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Als erstes wurde überprüft, ob eine komplette Lipidspreitung vorliegt und sich eine gleichmäßige Lipiddoppelschicht ausgebildet hat. Die Höhendifferenz zwischen der Micaoberfläche und der DOPC-Doppelschicht beträgt ca. 4.1 nm (Abbildung 3.11) und wird auch durch Literaturwerte bestätigt.[11, 192]



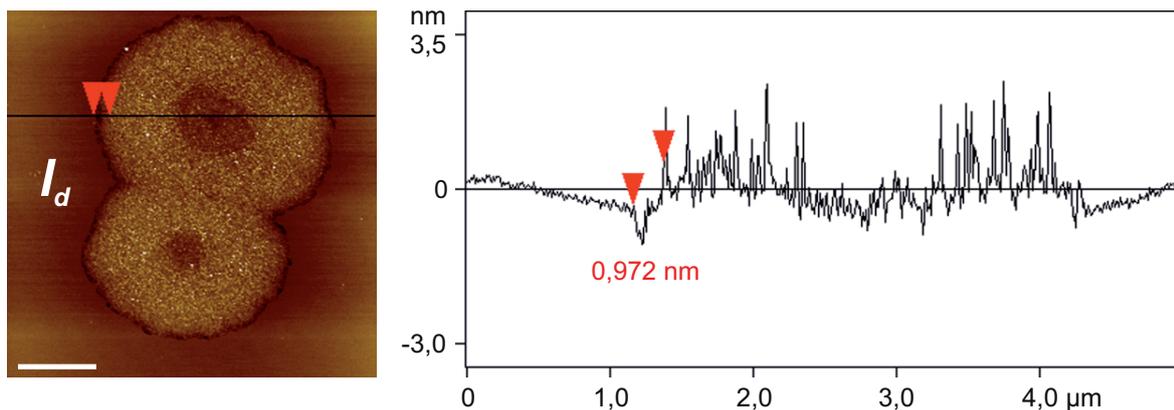
**Abbildung 3.11:** AFM-Bild einer fluiden Doppelschicht aus DOPC/DOPS 90:10 mol% vor Proteinzugabe. Das AFM-Bild wurde zur Überprüfung der kompletten Lipidspreitung und einer Ausbildung einer homogenen Lipidfläche mit einer theoretischen Dicke von 4 nm aufgenommen. Der Maßstab beträgt 1  $\mu\text{m}$ .

Nach der K-Ras4B-Aufteilung in der DOPC-Membran konnte das bekannte *Clustering* von K-Ras4B beobachtet werden. Die Proteincluster haben eine Größe im Mikrometerbereich und eine ringförmige Struktur (Abbildung 3.12). Die Bildung der K-Ras4B-*Cluster* sorgt für eine schwache Störung der umgebenden Lipiddoppelschicht, welche als dunklere Umrandung um die *Cluster* zu erkennen ist (Abbildung 3.12 Bild B und Abbildung 3.14). Um den Effekt von Phosphatidylserin auf den Proteinbildungsprozess zu untersuchen, wurde die Verteilung von K-Ras4B in homogenen anionischen Lipiddoppelschichten von DOPC mit unterschiedlichen Anteilen an DOPS untersucht (Abbildung 3.12 Bild B und C, Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15).



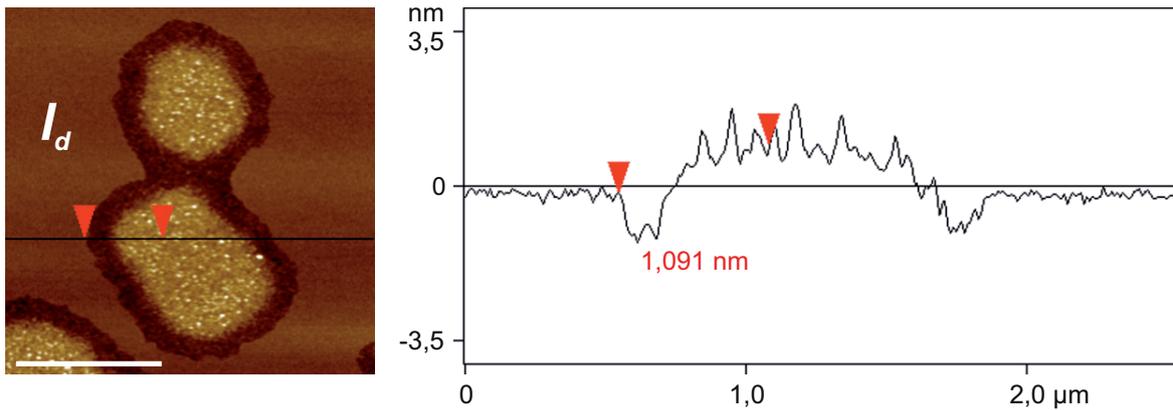
**Abbildung 3.12:** AFM-Bilder der K-Ras4B GDP-Verteilung in der fluiden Doppelschicht aus reinem DOPC (A), DOPC/DOPS 95:5 mol% (B) und DOPC/DOPS 90:10 mol% (C). Die AFM-Bilder wurden eine Stunde nach der Injektion von 800 µl von K-Ras4B in 20 mM Tris, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4 ( $c_{\text{K-Ras4B}} = 0,2 \mu\text{M}$ ) in die Flüssig-AFM-Zelle aufgenommen. Die gesamte Höhe der vertikalen Farbskala von dunkelbraun bis weiß entspricht 8 nm für jedes Bild. Der Maßstab beträgt 1 µm.

Die Höhe der Proteincluster liegt bei  $1.0 \pm 0.3 \text{ nm}$  ( $n = 273$ ) (Abbildung 3.13).

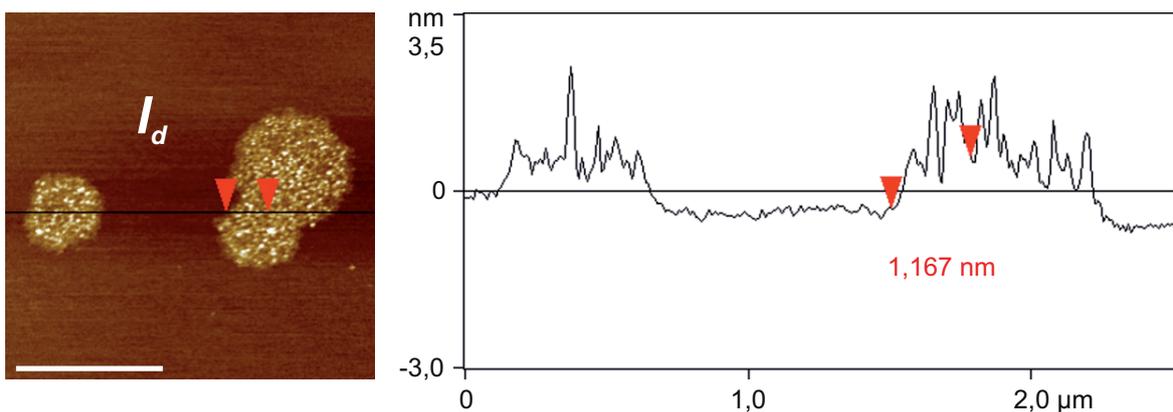


**Abbildung 3.13:** AFM-Bild der K-Ras4B-Verteilung in der fluiden Doppelschicht aus reinem DOPC. Das AFM-Bild wurde eine Stunde nach der Injektion von 800 µl von K-Ras4B in 20 mM Tris, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4 ( $c_{\text{K-Ras4B}} = 0,2 \mu\text{M}$ ) in die Flüssig-AFM-Zelle aufgenommen. Die horizontale schwarze Linie gibt die Lokalisation des zugehörigen Höhenprofils an. Rechts ist das passende Höhenprofil angegeben. Die vertikale Höhe ist durch die farbigen Pfeile gekennzeichnet. Der Maßstab beträgt 1 µm.

Wie die AFM-Bilder zeigen, kann eine Clusterbildung für 5 und 10 mol% DOPS beobachtet werden (Abbildung 3.12 Bild B und C, Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15). Dabei unterscheidet sich die Proteinclusterhöhe nicht signifikant von den Ergebnissen der reinen DOPC-Membran. Für K-Ras4B in DOPC/DOPS 95:5 mol% liegt die Höhe bei  $1.0 \pm 0.2 \text{ nm}$  und für die Verteilung von DOPC/DOPS 90:10 mol% liegt die Clusterhöhe bei  $1.1 \pm 0.2 \text{ nm}$  (Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.14:** AFM-Bild der K-Ras4B-Verteilung in der fluiden Doppelschicht aus DOPC/DOPS 95:5 mol%. Das AFM-Bild wurde eine Stunde nach der Injektion von 800  $\mu\text{l}$  von K-Ras4B in 20 mM Tris, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4 ( $c_{\text{K-Ras4B}} = 0,2 \mu\text{M}$ ) in die Flüssig-AFM-Zelle aufgenommen. Die horizontale schwarze Linie gibt die Lokalisation des zugehörigen Höhenprofils an. Rechts ist das passende Höhenprofil angegeben. Die vertikale Höhe ist durch die farbigen Pfeile gekennzeichnet. Der Maßstab beträgt 1  $\mu\text{m}$ .

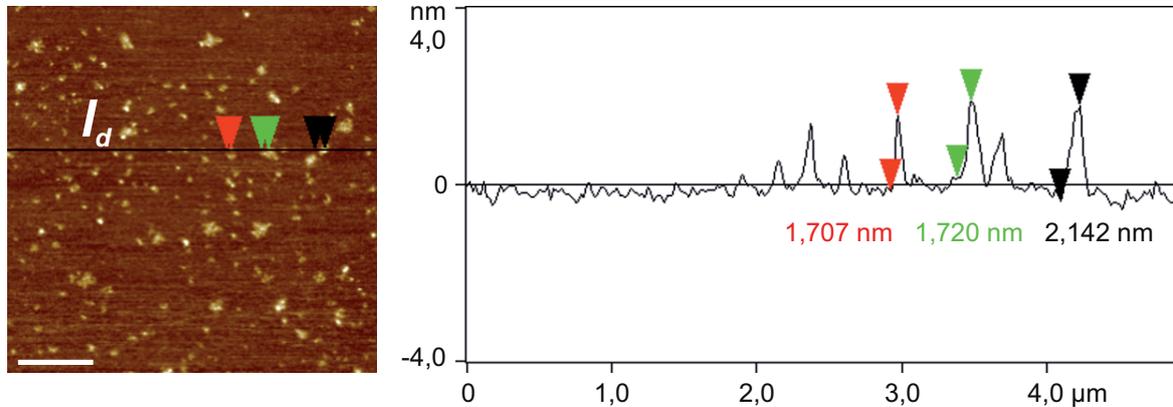


**Abbildung 3.15:** AFM-Bild der K-Ras4B-Verteilung in der fluiden Doppelschicht aus DOPC/DOPS 90:10 mol%. Das AFM-Bild wurde eine Stunde nach der Injektion von 800  $\mu\text{l}$  von K-Ras4B in 20 mM Tris, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4 ( $c_{\text{K-Ras4B}} = 0,2 \mu\text{M}$ ) in die Flüssig-AFM-Zelle aufgenommen. Die horizontale schwarze Linie gibt die Lokalisation des zugehörigen Höhenprofils an. Rechts ist das passende Höhenprofil angegeben. Die vertikale Höhe ist durch die farbigen Pfeile gekennzeichnet. Der Maßstab beträgt 1  $\mu\text{m}$ .

Ebenfalls kann die Störung der Membran durch die dunklere Umrandung der Clusterbereiche beobachtet werden (Abbildung 3.14). Das *Clustering* von inaktivem K-Ras4B in den homogenen fluiden DOPC/DOPS-Lipidmembranen ist vergleichbar mit vorherigen Studien mit heterogenen zwitterionischen und anionischen Lipidmodellmembranen (DOPC/DPPC/Chol und DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol).[192] Die Ergebnisse zeigen, dass K-Ras4B GDP bevorzugt in den  $l_d$ -Domänen von Phasen-separierten

Membranen lokalisiert ist, und proteinreiche Domänen mit einer Höhe von  $0.7 \pm 0,1$  nm und  $0,9 \pm 0,1$  nm in der zwitter-ionischen bzw. anionischen Membranen bildet. Die laterale Dimension der K-Ras4B-*Cluster* ist Nukleotid-unabhängig, wohingegen die Domänenhöhe und der Anteil vom *Clustering* für das aktive K-Ras4B mehr ausgeprägt ist.[192] Die Zunahme der Domänenhöhe kann durch eine engere Packung der Ras-Moleküle durch unterschiedliche Orientierungen erklärt werden. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Untersuchungen (durchgeführt von Nelli Erwin) bestätigten die Lokalisation von BODIPY-gelabelten K-Ras4B in N-Rh-DHPE markierten  $l_d$ -Domänen von heterogenen anionischen Membranen. Um einen eventuellen Effekt von anionischen Lipiden auf das Membranverhalten von lipidierten Proteinen mit polykationischen Domänen zu erhalten, wurden analog zu den vorherigen Experimenten Fluoreszenzmikroskopie-Untersuchungen durchgeführt, bei denen das Phosphatidylglycerol durch Phosphatidylserin in den fünffachen Membransystemen ersetzt wurde. Sowohl inaktives als auch aktives K-Ras zeigen das oben erwähnte Verhalten auch in Phosphatidylserin-reichen Membranen. Die Kombination der beiden Untersuchungen zeigt, dass die laterale Organisation und das *Clustering* von K-Ras4B unabhängig von der Membranzusammensetzung ist. Überraschenderweise scheinen die elektrostatischen Interaktionen zwischen der polybasischen Ankerregion und den anionischen Lipiden für die Bildung der K-Ras4B-reichen Domänen in fluiden Phasen der Membran nicht essentiell zu sein. Ein spezifisches monovalentes saures Lipid wie Phosphatidylserin, ist somit für das charakteristische Membranverhalten von K-Ras4B nicht notwendig. Somit sind die attraktiven hydrophoben Interaktionen zwischen dem Lipidanker von K-Ras4B und den Kohlenwasserstoffketten der Phospholipide der Membrandoppelschicht, die für das Einfügen des Farnesylankers in die Membran zuständig sind, und die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen der Aminogruppe der Lysinseitenkette mit der Phosphatkopfgruppe von Phosphatidylcholin ausreichend für das stabile *Clustering* von K-Ras4B.[294] Die Verteilung von inaktiven N-Ras HD/Far in einer heterogenen fluiden DOPC-Doppelschicht wurde ebenfalls mit hochauflösenden AFM-Experimenten an einer reinen  $l_d$ -Phase von DOPC-Lipiden untersucht. Für N-Ras konnte eine homogenere Verteilung der Proteinmoleküle in der Membran beobachtet werden. Die Ausbildung von kleinen Proteinclustern konnte anhand der lateralen Dimensionen der Proteindo-

mänen erkannt werden, die wesentlich größer sind als einzelne Proteinmoleküle. Die Höhe der Proteincluster ist  $2,1 \pm 0,4$  nm ( $n = 1137$ ), was ungefähr mit dem Durchmesser eines Ras-Proteins übereinstimmt (Abbildung 3.16).



**Abbildung 3.16:** AFM-Bild der N-Ras HD/Far GDP-Verteilung in der fluiden Doppelschicht aus reinem DOPC. Das AFM-Bild wurde zwei Stunden nach der Injektion von 200  $\mu\text{l}$  von N-Ras HD/Far GDP in 20 mM Tris, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4 ( $c_{\text{N-Ras}} = 4,5$   $\mu\text{M}$ ) in die Flüssig-AFM-Zelle aufgenommen. Die horizontale schwarze Linie gibt die Lokalisation des zugehörigen Höhenprofils an. Rechts ist das passende Höhenprofil angegeben. Die vertikale Höhe ist durch die farbigen Pfeile gekennzeichnet. Der Maßstab beträgt 1  $\mu\text{m}$ .

N-Ras-Dimere wurden in fluiden POPC-Membranen (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) durch FRET-Untersuchungen beobachtet.[295] Um den Effekt der Heterogenität der N-Ras-Cluster zu beurteilen, wurden die Ergebnisse der DOPC-Membranen mit früheren Untersuchungen der heterogenen zwitterionischen Membranen verglichen.[76, 258, 259] In der Phasen-separierten Membran von DOPC/DPPE/Chol findet die N-Ras-Verteilung in der  $l_d$ -Phase statt, gefolgt von der Diffusion in die Grenzfläche der beiden Phasen. Die Lokalisation in der Grenzfläche, führt zu einem Absinken der ungünstigen Grenzlinienspannung zwischen den Domänen. Die Entstehung und Selbstassoziation von länglichen Clustern an der Domänengrenze wird dadurch begünstigt.[76, 258, 259] Um die Ergebnisse der Modellmembranen zu bestätigen, wurden konfokale Laser Scanning Fluoreszenzmikroskopie-Untersuchungen (durchgeführt von Nelli Erwin) mit natürlichen Giant plasma membrane Vesikeln aus RBL-2H3 Zellen durchgeführt. Die Vesikel haben eine Größe von ca. 10  $\mu\text{m}$ , sind unilamellar und bestehen aus einem Komplex aus nativen Lipiden und Membranproteinen. Sie besitzen allerdings keine zellulären oder Zytoskelettkomponenten. Für weiterführende Details

wird auf die Veröffentlichung von Seeliger *et al.* verwiesen.[296] Mit der Fluoreszenzmikroskopie konnte ebenfalls die laterale Verteilung von K-Ras4B und N-Ras HD/Far in An- und Abwesenheit von natürlichen Proteinen beobachtet werden. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie bestätigen die AFM-Ergebnisse, dass sowohl K-Ras4B als auch N-Ras bevorzugt in der fluiden Lipidphase lokalisiert sind. Der verzweigte Farnesylinker behindert die Insertion der Ras-Proteine in die geordnete Lipidphase bei diesem komplexen Multi-Komponenten-System. Es wird eher die Verteilung von Ras in der  $l_d$ -Phase gefördert, ähnlich wie bei den einfachen Drei- und Fünf-Komponenten-Modellsystemen. Das für N-Ras typische Verhalten in der  $l_d$ -Phase ist ebenfalls sichtbar, allerdings kann die Akkumulation in der Grenzfläche zwischen  $l_d$ - und  $l_o$ -Phase nicht beobachtet werden. Die Inkorporation des Proteins in die Domänengrenze hat eine Reduzierung der energetisch ungünstigen Grenzlinienspannung zwischen den Domänen zur Folge.[76, 258, 259] Die Grenzlinienspannung in den komplexen Membransystemen wird kleiner geschätzt. Dies könnte auch der Grund sein, warum die Lokalisation der N-Ras-Proteine in der Grenzfläche der *GPMVs* (*giant plasma membrane vesicle*) nicht bevorzugt wird. Ebenso ist es denkbar, dass diese Domänen kleiner sind, und somit optisch nicht aufgelöst werden können. Der Vergleich der Messungen mit N-Ras und K-Ras4B an den komplexen Membransystemen und den vorherigen Messungen mit den einfachen Membransystemen bestätigen die Nukleotid-unabhängige Proteinbindung.[76, 192, 258, 259] Um einen Einfluss der Membranproteine der *GMPVs* auszuschließen, wurden diese extrahiert und die Messungen mit den reinen Lipidvesikeln (*GUVs = giant unilamellar vesicles*) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen aber keinen signifikanten Unterschied von der Verteilung der Ras-Proteine zwischen den beiden Membransystemen.

Vor kurzem sind die Nanocluster von Ras-Proteinen in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Ras-Proteine lagern sich in Nanoclustern in der Plasmamembran zusammen, und bilden so eine Möglichkeit für die Bildung und Aktivierung von verschiedenen Effektoren, die essentiell für die Signalweiterleitung sind.[297] Die Verteilung der lipidierten Signalproteine in der Membran ist abhängig von der molekularen Struktur des Proteins und des jeweiligen Ankersystems. Außerdem spielen die physiko-chemischen Eigenschaften der Lipidmembran eine wichtige Rolle. Als physiko-chemische Eigenschaften

sind die Oberflächenladung, strukturelle Defekte, Phasenseparation, Krümmung, Dicke und Fluidität der Membran, sowie die Dichte der Lipidpackung zu nennen. Eine haupttreibende Kraft für die Membranbindung von lipidierten Proteinen ist der hydrophobe Effekt.[298, 299] Jede Methylgruppe in der hydrophoben Lipidkette erniedrigt die Gibbs-Energie um  $-3,45 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Wenn das lipidierte Protein den Rotations- und Translationsfreiheitsgrad nach Membraninsertion verliert, führt dies zu einem Entropieverlust und damit zu einer geringeren Bindungs-Gibbs-Energie. Studien mit acetylierten Peptiden haben einen Entropienachteil von  $-T\Delta S$  zu  $\Delta G$  von ca.  $14 \text{ kJ mol}^{-1}$  gezeigt.[300, 301] Dies hat zur Folge, dass ein einzelner Lipidanker nicht ausreicht, um das Protein in die Membran fest zu binden, was zu einer kurzen Halbwertszeit der Membranassoziation im Bereich von Sekunden oder weniger führt.[300–304] Ein kleiner negativer Wert für  $\Delta G^{\circ}_{\text{hydroph}}$  ist jedoch notwendig für die Bewegung des lipidierten Proteins zwischen den verschiedenen Membranorganellen.[69] Für eine stabile Membranassoziation benötigt das Protein ein zusätzliches Membranbindungsmotiv, wie zum Beispiel eine Palmitoylkette bei N-Ras oder eine polykationische Domäne im Fall von K-Ras4B. Die Erhöhung der durchschnittlichen Halbwertszeit der Lokalisation beträgt dann mehrere Stunden, was eine Untersuchung des Verteilungsgleichgewichts unter Gleichgewichtsbedingungen ergab.[300, 304] Die gesamte Gibbs-Energie des Systems, wird durch hydrophobes *Matching* reduziert. Hydrophobes *Matching* liegt vor, wenn der hydrophobe Bereich eines lipidierten Proteins zu der hydrophoben Dichte der Lipiddoppelschicht passt. Um einen möglichen Unterschied zu kompensieren, werden die zum Protein benachbarten Lipide gestaucht oder gestreckt, um den hydrophoben Bereich des eingebauten Proteins abzudecken. Dieser Vorgang hat eine Membranstörung zu Folge, die als dunkler Bereich um die Proteindomänen in den AFM-Bilder zu sehen ist. Die Störungen, die durch den Einbau des Lipidankers in die Membran verursacht werden, sind nur gering. Vogel *et al.* haben die Lipidkettenanpassung in Anhängigkeit eines zweifach hexadecylierten N-Ras Peptids im Vergleich zu einem lipidierten N-Ras HD/Far mit NMR-Methoden untersucht. Sie haben herausgefunden, dass die Lipidkettenmodifikation des N-Ras eine außergewöhnliche Anpassung in Bezug auf die hydrophobe Dichte der Membran erlaubt. Die Änderung der Gibbs-Energie ist unwesentlich. Die Bildung von kleinen Proteinclustern wird jedoch auch bei fast

verschwindenden hydrophoben *Mismatch* erwartet, wie es am Beispiel von N-Ras im fluiden Ein-Komponenten-Lipidsystem DOPC, wo eine homogene Verteilung der Proteine und nur ein geringes *Clustering* vorkommt, zu erkennen ist. Die Komplexität der Proteinbindung an die Membran ist für Proteine, die nur eine Lipidkette und eine polybasische Domäne als Bindungsmotiv haben, erhöht. In diesem Fall spielen die elektrostatischen Interaktionen eine Rolle. Scheidt *et al.* haben eine durch Hydrophobizität geleitete Membraninsertion des Myristoylmotivs der Tyrosinkinase Src mit Coulomb-Anziehungskräften zwischen dem polybasischen Bereich und den sauren Lipidkopfgruppen untersucht.[305] Für K-Ras4B konnte auf eine Bindung an die Oberfläche der Lipiddoppelschicht durch spezifische Coulomb-Wechselwirkungen zwischen Lysin und den negativ geladenen POPG-Phosphaten und den nicht-spezifischen Farnesyl-Phospholipid van-der-Waals-Interaktionen geschlossen werden.[294] In heterogenen Phasen-separierten Membranen haben die starken elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Lipoprotein und der Lipidoberfläche zusätzliche Auswirkungen. Die Membranbindungsenergie des lipidierten Proteins kann sich deutlich durch basische Aminosäurereste in der Proteinsequenz, wie zum Beispiel beim K-Ras4B erhöhen.[306–309] In Anwesenheit von zum Beispiel 30 % anionischen Lipiden und einem Oberflächenpotential  $\psi_0$  im Bereich von -50 mV führen die sechs benachbarten Lysine in dem polybasischen Motiv von K-Ras4B zu einem  $\Delta G_{\text{elektro}}^{\circ}$ -Wert von  $-24 \text{ kJ mol}^{-1}$  ( $\sim -4 \text{ kJ mol}^{-1}$  pro Lysinrest). Solche starken Interaktionen ermöglichen eine Einlagerung der sauren Phospholipide durch einen Lipid-Sortierungsmechanismus und führen zu einer lokalen Anreicherung von diesen anionischen Phospholipiden. Aufgrund der starken Störung der Lipiddoppelschicht kommt es zur Ausbildung großer *Clustern* von K-Ras4B-Molekülen in der fluiden Phase. Allerdings wurden solche *Cluster* auch bei zwitterionischen heterogenen Membranen beobachtet. Die Kombination von mehrfach geladenen Dipol-Interaktionen der Lysinreste mit den zwitterionischen Cholinkopfgruppen und das durch Entropiegewinn induzierte Membran-vermittelte *Clustering* führt zu einer ähnlich starken Tendenz zur Clusterbildung. Die Bildung der K-Ras4B-*Cluster* innerhalb der fluiden Phase ist ebenfalls in den Multi-Komponenten-GPMV-Membransystemen zu beobachten. Dieses Phänomen scheint unabhängig von der genauen Membranzusammensetzung zu sein. Heterogene Lipiddoppelschichten mit

Lipiddomänen verschiedener Größe, physikalischen und chemischen Eigenschaften und Domänengrenzen mit ungünstiger Grenzlinienspannung ermöglichen einen zusätzlichen Mechanismus für die Proteinverteilung, die nicht in einfachen homogenen Membranen möglich ist.[76, 192, 310–317] Die Grenzlinienspannung an der Grenzfläche zwischen den beiden *liquid-ordered* ( $l_o$ , *Raft*-ähnlich) und *liquid-disordered* ( $l_d$ ) Phasen spielt eine wichtige Rolle für das Phasenverhalten von Lipoproteinen. Die Grenzlinienspannung  $\gamma$  erhöht sich quadratisch in Abhängigkeit des Phasenhöhen-*Mismatches*. [311] Für eine typische fluide Doppelschicht konnte mit Hilfe von AFM-Messungen eine Phasenhöhe von ca. 4 nm und eine maximale Differenz der beiden Phasenhöhen zwischen der  $l_o$ - und  $l_d$ -Phase von ca. 1 nm bestimmt werden. Daraus folgt für  $\gamma$  ein Wert von  $\sim 1 k_B T$ . Daher binden lipidierte Proteine spezifisch an die Phasengrenze der Domänen und erniedrigen so die Grenzlinienspannung der Grenzfläche. In Abwesenheit eines polybasischen Motivs, aber mit wenigstens einem Farnesylrest (wie bei N-Ras HD/Far), kommt es zu einer Akkumulation an der Grenzfläche durch die ungesättigte und voluminöse Kohlenwasserstoffkette.[76] Diese an den Grenzflächen akkumulierten Moleküle werden auch als *Lineactants* bezeichnet, und die kegelförmigen Moleküle zwischen den verschiedenen Lipiddomänen in den Membranen haben ein hohes Potential, an diesen Grenzflächen *Cluster* auszubilden. Das *Clustering* und die Anordnung in der Grenzfläche geht direkt einher mit einer Reduzierung der Grenzlinienspannung.[317] Nur wenn die Grenzlinienspannung ausreichend klein ist, wie zum Beispiel in Multi-Komponenten-Membranen, kann durch Lipidsortierung der akkumulierten Lipide mit den richtigen Packungsparametern an der Phasengrenze solch eine Wirkung weitestgehend unterdrückt werden, wie in dem Beispiel von N-Ras in *GPMVs* zusehen ist. In diesem Fall wird eine wesentlich homogenere Verteilung des Proteins in der fluiden Phase der *GPMVs* beobachtet.

Die Ergebnisse für die Proteinverteilung von N-Ras und K-Ras4B in verschiedenen Membransystemen, wie fluide Ein-Komponenten-Doppelschichtmembranen, fluide Zwei-Komponenten-Membransysteme, heterogene *Raft*-Modellmembransysteme bis hin zu natürlichen Lipidzusammensetzungen (*GPMVs*) mit oder ohne Membranproteinen zeigen einen Isoform-spezifischen Unterschied bezüglich der lateralen Organisation und der Bildung von proteinreichen Membrandomänen (*Cluster*). Das Nanoclustering wur-

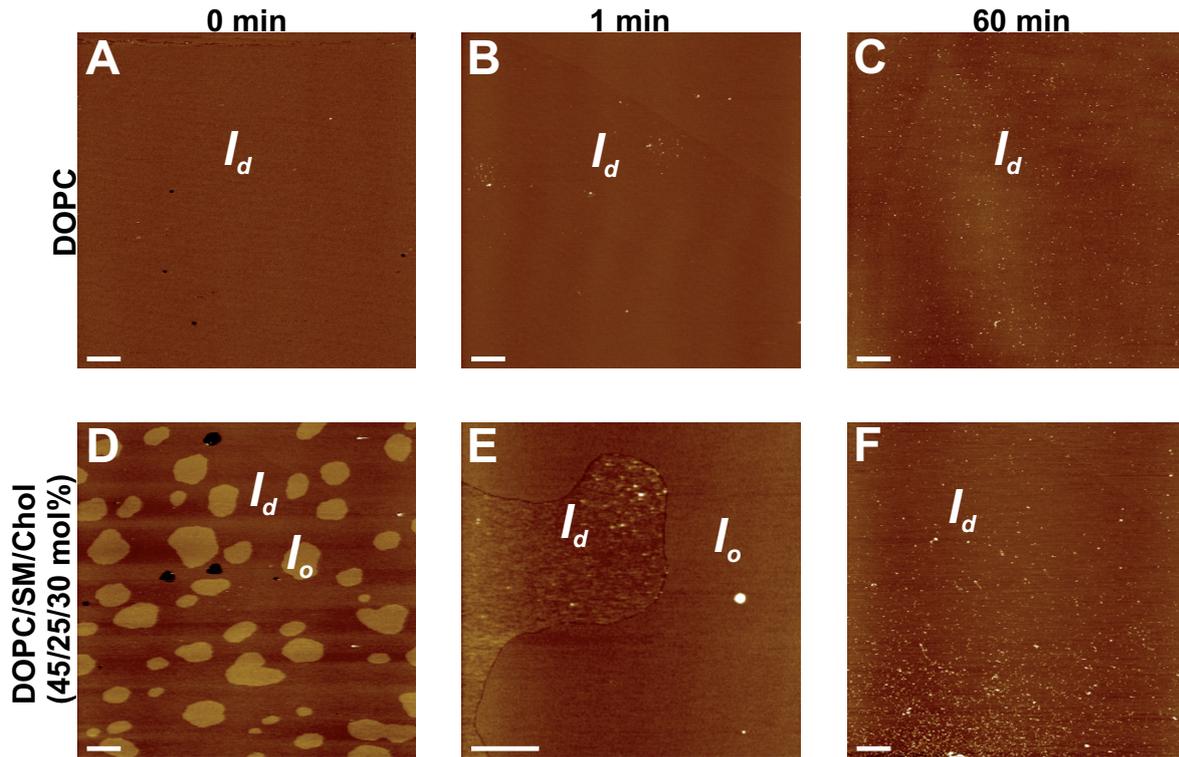
de auch in *in vivo*-Experimenten beobachtet. Dabei kann es kritische Auswirkungen auf die Zelle haben, weil diese auf einen geringen Signalimpuls mit einer verstärkten festgelegten zellulären Antwort reagiert.[291, 318, 319] Im Allgemeinen sind die Proteindomänen für eine funktionelle Zellmembran und deren wichtige biologischen Funktionen mitverantwortlich.[320] Die Grenzlinienspannung scheint ein wichtiger Kontrollparameter zu sein, der nicht nur die Größe und die dynamischen Eigenschaften der Lipiddomänen, sondern auch den Verteilungsprozess der lipidierten Proteine wie N-Ras kontrolliert, wohingegen für K-Ras4B die selektive Lokalisation und das *Clustering* durch elektrostatische Kräfte des polybasischen C-terminalen Farnesylankers vermittelt wird. Die elektrostatischen Interaktionen der benachbarten Lysinreste der hypervariablen Region von K-Ras4B und den anionischen Phospholipiden führen zu einem hohen elektrostatischen Beitrag der Bindungs-Gibbs-Energie. Aufgrund der starken Störung der Doppellipidschicht erfolgt ein verstärktes *Clustering* von K-Ras4B. Das *Clustering* sorgt wahrscheinlich für eine effektive Verstärkung der Assoziationsraten mit weiteren regulatorischen Proteinen. Spezifische Bindungsprozesse werden oftmals in Bezug auf die Bildung dieser Proteincluster diskutiert. Die oben erwähnten Ergebnisse zeigen deutlich, dass unspezifische, durch Membran vermittelte Interaktionen, eine wichtige Rolle bei diesen Bindungsprozessen spielen können. Dies deutet auf eine Abschwächung der vielen fein abgestimmten Interaktionen hin. Ein solches Szenario scheint in Anbetracht der hohen dynamischen Natur von natürlichen Membranen sinnvoll zu sein. Schlussendlich stellen wir fest, dass selbst mit relativ einfachen heterogenen Biomodellmembranen eine Vielzahl an Eigenschaften und Funktionen komplexer natürlicher Membranen untersucht werden können.

### 3.3 Wechselwirkung zwischen dem molekularen *Tweezer* CLR01 und einem Membransystem

Die hier durchgeführten Rasterkraftmikroskopischen-Untersuchungen der *Tweezer*-Interaktion mit einem Membransystem sind ein Teil der veröffentlichten Kooperationsstudie *A molecular tweezer antagonizes seminal amyloids and HIV infection* von Lump *et al.*[321] Im nächsten Abschnitt werden die AFM-Ergebnisse präsentiert; für eine Übersicht der weiteren Ergebnisse wird an dieser Stelle auf die Veröffentlichung hingewiesen.[321]

Mit Hilfe von rasterkraftmikroskopischen Experimenten wurde die Hypothese, dass der *Tweezer* CLR01 selektiv *Raft*-Membranen zerstört, untersucht. Als ein *Raft*-ähnliches Membransystem wurde eine Lipidmischung aus DOPC, Sphingomyelin und Cholesterol (DOPS/SM/Chol 45/25/30 mol%) verwendet. Als Kontrolle für ein Membransystem, das keine *Raft*-Domänen ausbildet, wurde eine Lipiddoppelschicht aus reinem DOPC verwendet. Als erstes wurden 800  $\mu\text{l}$  CLR01 ( $c_{\text{CLR01}} = 150 \mu\text{M}$ ) in  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer in die Flüssigzelle des AFM injiziert, um einen möglichen Einfluss des *Tweezers* auf die reine DOPC-Membran zu erhalten. Die Zugabe des *Tweezers* CLR01 zu der reinen DOPC-Lipiddoppelschicht, welche auf der Micaoberfläche immobilisiert wurde, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Anordnung und Stabilität der Lipiddoppelschicht. Die absorbierten *Tweezer*-Moleküle verteilten sich homogen über die gesamte Lipidoberfläche und sind als kleine weiß-gelbliche Punkte in dem AFM-Bild zu erkennen (Abbildung 3.17 Bild A bis C). Diese durchgeführte Messung diente als Kontroll-Experiment für die folgende Messung mit einer Lipid-*Raft*-Mischung.

Nach der Zugabe des *Tweezers* zu der Lipid-*Raft*-Mischung aus DOPC/SM/Chol, die eine Phasenkoexistenz aus *liquid-disordered* ( $l_d$ ) und *liquid-ordered* ( $l_o$ ) Phase zeigt, reduzierte sich die Höhendifferenz zwischen den beiden Phasen. Nach 60 min waren die sonst dominanten  $l_d$ - und  $l_o$ -Phasen nicht mehr sichtbar, und der *Tweezer* hatte sich über die gesamte fluide Phase homogen verteilt.



**Abbildung 3.17:** Obere Bildreihe: AFM-Bilder der reinen DOPC-Membran vor der Injektion (0 min) und 1 min und 60 min nach der Injektion von 800  $\mu\text{l}$  *Tweezer* CLR01 ( $c_{\text{CLR01}} = 150 \mu\text{M}$  in 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,6) in die Flüssig-AFM-Zelle. Die gesamte Höhe der vertikalen Farbskala von dunkelbraun bis weiß entspricht 8 nm für jedes Bild. Die Dicke der hydratisierten Membran beträgt 3,7 nm. Untere Bildreihe: AFM-Bilder der DOPC/SM/Chol-Lipidmembran (45/25/30 mol%) vor der Proteininjektion (0 min) und 1 min und 60 min nach Proteinzugabe von 800  $\mu\text{l}$  von CLR01 ( $c_{\text{CLR01}} = 150 \mu\text{M}$  in 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,6) in die Flüssig-AFM-Zelle. Die gesamte Höhe der vertikalen Farbskala von dunkelbraun bis weiß entspricht 8 nm für jedes Bild und deutet auf eine homogene Lipiddoppelschicht mit Phasenkoexistenz der *liquid-disordered* ( $l_d$ ) und *liquid-ordered* ( $l_o$ ) Phasen hin. Die Höhendifferenz zwischen den beiden Domänen beträgt 1 nm und die Schichtdicke der  $l_d$ -Phase beträgt 4 nm. Der Maßstab beträgt 1  $\mu\text{m}$ .

Die aufgestellte Hypothese konnte durch Messungen von Fluoreszenz-gelabelten *GUVs* (*giant unilamellar vesicles*) und durch die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen der *Tweezer*-Interaktion auf verschiedene Membransysteme bestätigt werden. Der *Tweezer* CLR01 zerstört vornehmlich Membranen, die eine *Raft*-ähnliche Zusammensetzung (erhöhter Anteil an Sphingomyelin und Cholesterol) haben, und zeigt keinen Einfluss auf Membranen mit nur einer fluiden Phase. Mögliche Ursache für die Membranzerstörung ist die Interaktion des molekularen *Tweezers* mit der Grenzschicht der beiden Membranphasen ( $l_d$ - und  $l_o$ -Phase). An den beiden Membranphasen kommt

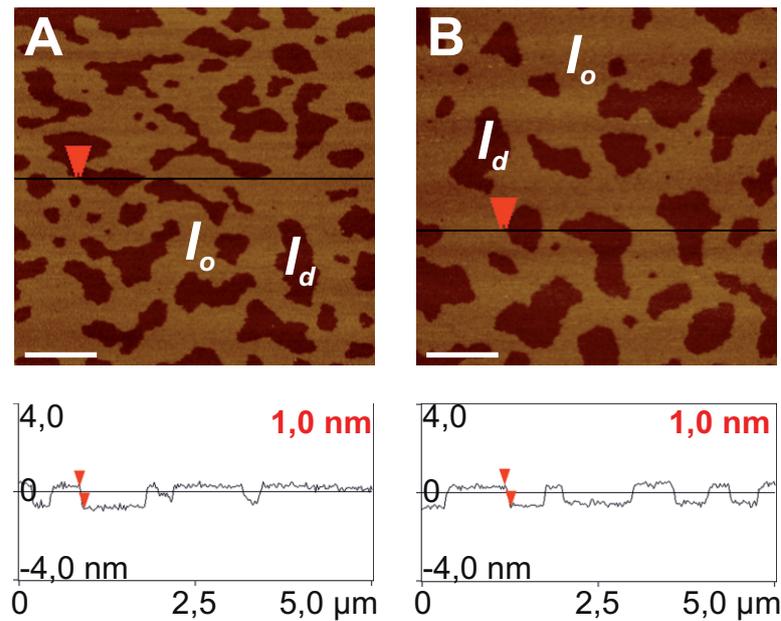
es zu einer ungünstigen Grenzlinienspannung. Durch die Interaktion wird die ungünstige Grenzlinienspannung erniedrigt. Ein ähnlicher Mechanismus wurde in dieser Arbeit auch für N-Ras-Proteine beschrieben (Kapitel 3.2 Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen von K-Ras4B an Membransystemen mit verschiedenen Anteilen an Phosphatidylserin).

### 3.4 Rasterkraftmikroskopische-Untersuchungen von Phospholipase A2 mit einem Membransystem

Die rasterkraftmikroskopischen Experimente der Phospholipase A2 an einem Membransystem sind ein Teil der durchgeführten Untersuchungen der Veröffentlichung *Pressure Modulation of the Enzymatic Activity of Phospholipase A2, A Putative Membrane-Associated Pressure Sensor*. [322] In diesem Abschnitt wird auf die durchgeführten AFM-Messungen eingegangen. Für die weiteren Ergebnisse wird an dieser Stelle auf die Veröffentlichung von Suladze *et al.* verwiesen. [322]

Wie in den anderen Untersuchungen dieser Arbeit auch, wurden für die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen der Phospholipase A2 das heterogene Modellmembransystem aus DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol 20:5:45:5:25 mol% verwendet, um detaillierte Informationen über die Membran-Protein-Interaktionen zu erhalten. Das oben beschriebene anionische Fünf-Komponenten-Membransystem bildet ein Zwei-Phasen-System mit einer *liquid-disordered* ( $l_d$ ) und eine *liquid-ordered* ( $l_o$ ) Phase aus, und kann dadurch die Heterogenität einer biologischen Membran nachahmen. Um das Verhalten der Phospholipase nach der Membranbindung auf einem Nanometer kleinen Größenbereich zu untersuchen, wurde eine bildgebende Technik, die zeitabhängige Rasterkraftmikroskopie, durchgeführt. Die Interaktion zwischen dem Protein und der Membran wurde über die Zeit verfolgt, indem zu verschiedenen Zeitpunkten der gleiche Membranbereich gescannt wurde. Die Differenz zwischen den beiden Lipidschichten der  $l_o$ - und  $l_d$ -Phase betrug ca. 1 nm, was in guter Übereinstimmung mit vorherigen Studien steht. [11, 34]

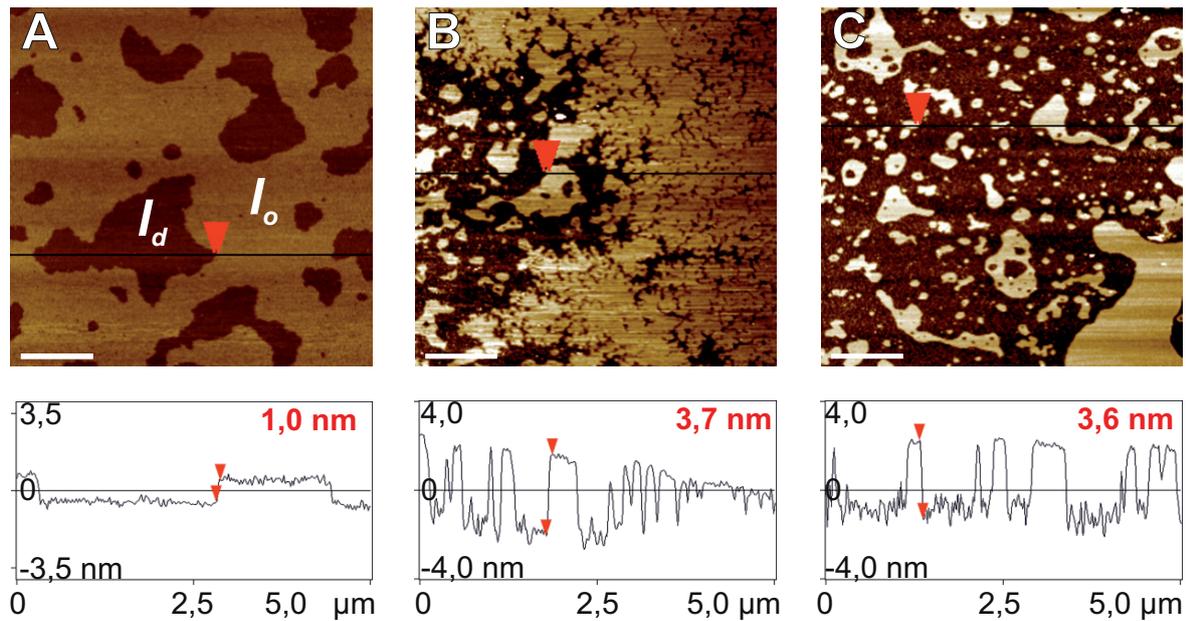
Als erstes wurden zeitabhängige AFM-Messungen unter nicht katalytischen Bedingungen durchgeführt. Dafür wurden 250  $\mu$ l einer 0,35  $\mu$ M PLA2-Lösung mit 0,5 mM EGTA in die Flüssig-AFM-Zelle injiziert, um eventuelle Veränderungen der Topologie der Lipiddoppelschicht zu detektieren (Abbildung 3.18).



**Abbildung 3.18:** AFM-Bilder der Lipiddoppelschicht mit  $l_d$ - und  $l_o$ -Phasen der heterogenen Modellmembran aus DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol 20:5:45:5:25 mol% bei 25 °C. (A) Membran vor der Proteininjektion, (B) Membran 10 min nach der Injektion von bvPLA2 in Anwesenheit von EGTA. Die entsprechenden Höhenprofile sind unterhalb der AFM-Bilder abgebildet. Die roten Pfeile zeigen die Höhendifferenz zwischen den  $l_d$ - und  $l_o$ -Phasen (A+B).

Wie zu erwarten, konnten keine signifikanten Veränderungen der lateralen Membranorganisation nach der Injektion von bvPLA2 beobachtet werden. Das zusätzliche EGTA im Puffer sorgt für eine Bindung der zweiwertigen Ionen, insbesondere der Calciumionen, die für die Hydrolysereaktion von bvPLA2 (Abbildung 1.13) nötig sind. Die aufgenommenen AFM-Bilder (Abbildung 3.18) mit EGTA dienten als Kontroll-Experiment.

Die Membranhydrolyse konnte dann durch den Zusatz von 2 mM  $\text{CaCl}_2$  beobachtet werden. Innerhalb von 10 min nach der Zugabe der bvPLA2-Lösung mit  $\text{CaCl}_2$  konnte eine Hydrolyse des Großteils der Membran beobachtet werden (Abbildung 3.19B).



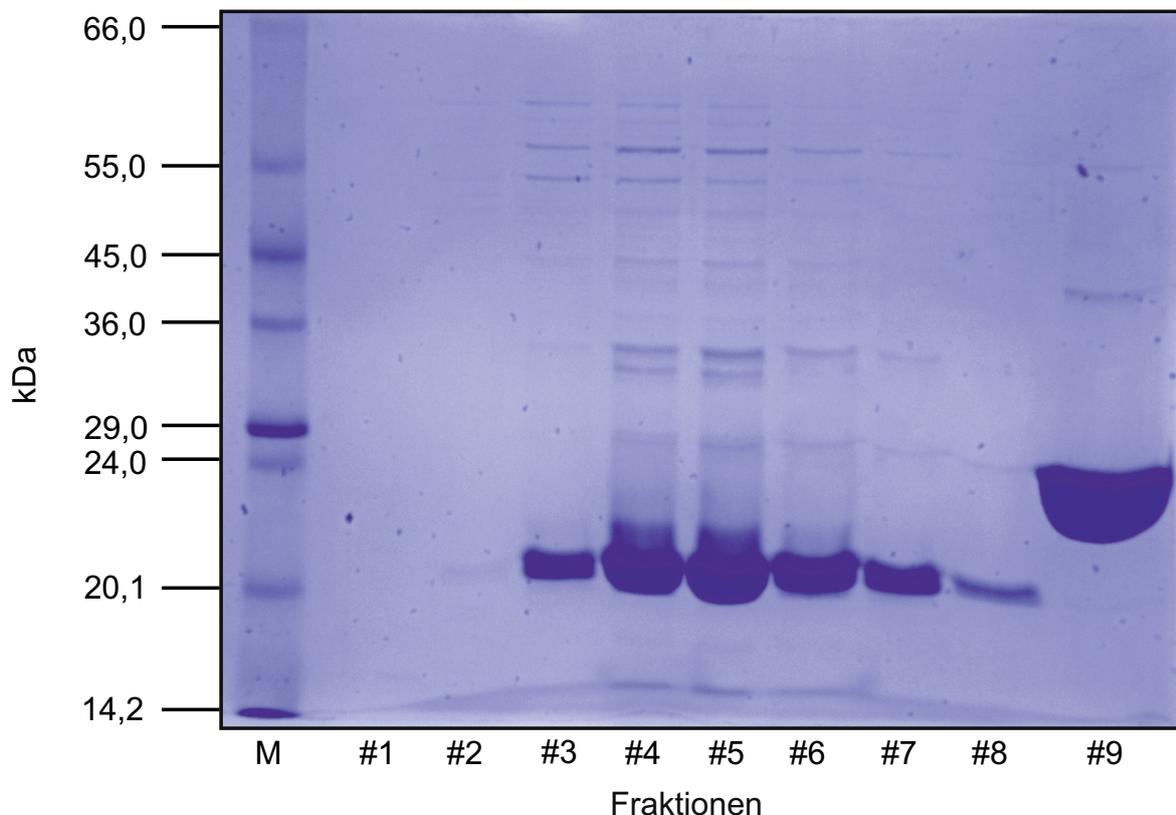
**Abbildung 3.19:** AFM-Bilder der Lipiddoppelschicht mit  $l_d$ - und  $l_o$ -Phasen der heterogenen Modellmembran aus DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol 20:5:45:5:25 mol% bei 25 °C. (A) Membran vor der Proteininjektion, (B) Membran 10 min nach der Injektion von bvPLA2 (Hydrolyse), (C) Membran 24 h nach der Injektion von bvPLA2 (Hydrolyse). Die entsprechenden Höhenprofile sind unterhalb der AFM-Bilder abgebildet. Die roten Pfeile zeigen die Höhendifferenz zwischen den  $l_d$ - und  $l_o$ -Phasen (A) bzw. die Höhe der Löcher innerhalb der Doppelschicht als Konsequenz der Hydrolysereaktion (B+C).

Der signifikante Höhenunterschied der beiden Lipidphasen von 1 nm konnte nicht mehr detektiert werden, was auf die Zerstörung der Phasenkoexistenz zurückzuführen ist. Nach einer Inkubationszeit von 24 h (Abbildung 3.19C) ist der Hydrolyseeffekt der Membran durch bvPLA2 noch deutlicher sichtbar. Die Höhendifferenz von ca. 3,7 nm deutet auf das Auftreten einer dünneren  $l_d$ -Phase hin, die nicht mehr homogen auf der Micaträgeroberfläche verteilt ist, was durch das Auftreten von Löchern in der Membran deutlich wird. Simonsen *et al.* haben für den Fall der Phasenkoexistenz gezeigt, dass die Hydrolyseaktivität bevorzugt in der  $l_d$ -Phase auftritt. Allerdings kann ein hoher Anteil von Cholesterol die Lipiddoppelschicht vor der kompletten Zerstörung durch die Hydrolyse schützen.[323] Um einen direkten Nachweis über die Heterogenität der *Raft*-Membran vor und nach der Zugabe von bvPLA2 zu bekommen, wurden rasterkraftmikroskopische Experimente durchgeführt. Wie aus der Literatur [189, 323] bekannt ist, konnte der Einfluss der Hydrolyse von PLA2 auf die laterale Organisation der Lipiddoppelschicht bestätigt werden. Schlussendlich führt die Hydrolyse zu einem

kompletten Verlust der Phasenkoexistenz und zur Bildung von Löchern innerhalb der Lipiddoppelschicht durch die Desorption der Moleküle.

### 3.5 Proteinexpression und *in vitro* Farnesylierung von Rheb

In diesem Abschnitt wird die Etablierung des *E. coli* Expressionssystems für Rheb und die Proteinaufreinigung über ein ÄKTAprime-System beschrieben. Die rekombinante Proteinexpression erfolgte mit dem *E. coli* Stamm BL21. Prokaryotische Zellen wie *E. coli* sind nicht in der Lage, posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel die Proteinfarnesylierung, durchzuführen. Wie auch Ras, besitzt funktionelles Rheb einen Farnesylrest (Abbildung 1.9). In der Literatur ist bekannt, dass die Rheb-Farnesylierung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchgeführt werden kann. Das Anfügen des Farnesylrests erfolgte in dieser Arbeit über eine *in vitro* Farnesylierung. Die Ausbeute für das unfarnesylierte Rheb betrug ca. 80 mg pro *E. coli* Expressionsansatz. Über den N-terminalen GST-Tag konnte das unfarnesylierte Rheb reversibel an eine GSTrap-Säule gebunden werden.



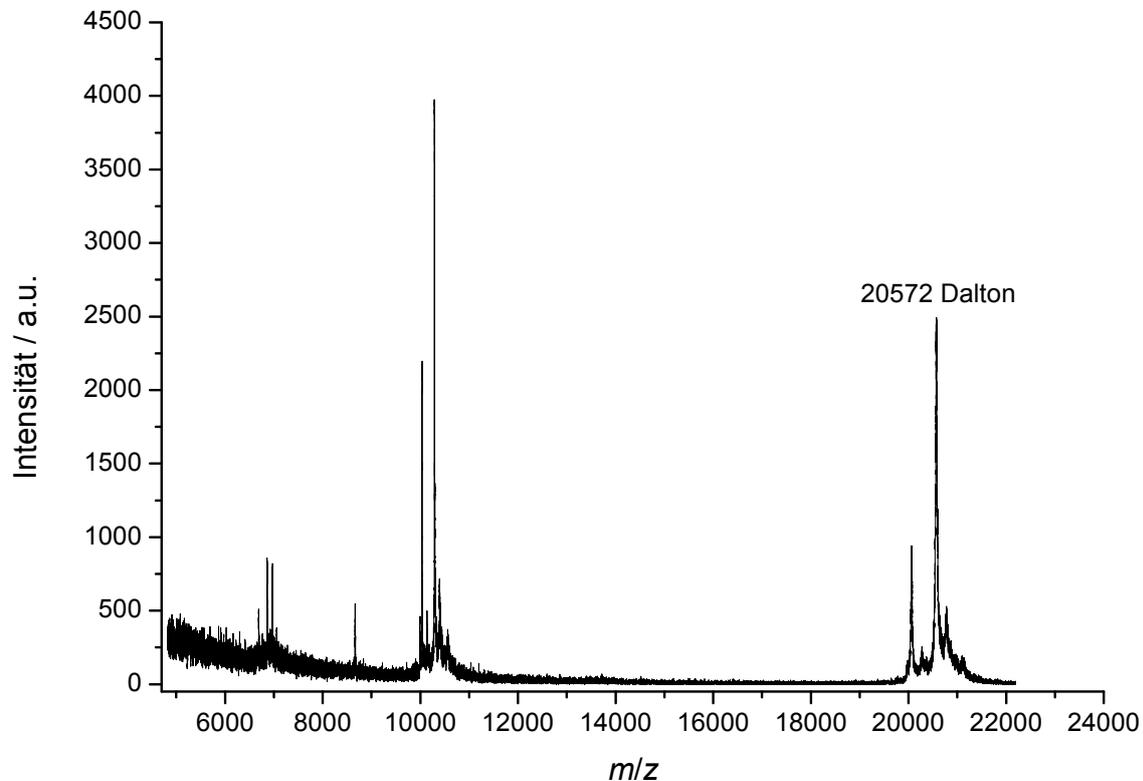
**Abbildung 3.20:** 15%iges SDS-Gel von einzelnen Proteinfractionen nach der Aufreinigung mit einer GSTrap-Säule. M: Marker, #1-8: Fraktionen von unfarnesylierten Rheb ohne GST-Tag, #9: abgeschnittener GST-Tag.

Dabei bindet das Protein an den Glutathionliganden, der über hochvernetzte 4 %ige Agarose verknüpft ist. Die milden und nicht denaturierenden Bedingungen sorgen für eine Trennung des Zielproteins von den restlichen *E. coli*-Proteinen im Zellysate. Die Abbildung 3.20 zeigt ein 15%iges SDS-Gel mit einzelnen Fraktionen (#2 bis #8) nach der Aufreinigung mit der GSTrap-Säule. Fraktion #1 ist der Durchfluss (Puffer) nach dem Proteinauftrag auf die GSTrap-Säule. Die Fraktion #9 ist der an die GSTrap-Säule gebundene GST-Tag. In den Fraktionen #2 bis #8 ist etwas oberhalb der Markerbande von 20,1 kDa eine intensive Proteinbande zu erkennen. Bei dieser Bande handelt es sich um das unfarnesylierte Rheb ohne GST-Tag. Allerdings zeigt das Gel noch weitere Proteinbanden oberhalb der eigentlich Rheb-Bande bei ca. 20,5 kDa. Bei den Proteinbanden handelt es sich um Verunreinigung durch *E. coli*-Proteine, die ebenfalls eine positive Interaktion mit der GSTrap-Säule zeigen. Das für das enzymatische Abschneiden des GST-Tags vom unfarnesylierten Rheb verwendete Thrombin hat eine Größe von ca. 37 kDa.[193] Die Proteinbande von Thrombin ist ebenfalls zu erkennen.

Rheb hat laut Literatur ein zu erwartendes Molekulargewicht von ca. 20,5 kDa.[197] Diese Angabe wurde über die Massenbestimmung mit MALDI-TOF-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry*) bestätigt. Die MALDI-TOF-MS-Messungen wurden am MPI Dortmund mit Jens Warmers (Arbeitsgruppe: Prof. Dr. H. Waldmann) durchgeführt. Bei der Massenspektrometrie mit MALDI-TOF werden die Ionen durch eine matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation erzeugt. Die Proteinfragmente werden dann entsprechend ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) in einem magnetischen oder elektrischen Feld aufgetrennt. Die entstandenen Ionen haben normalerweise alle die Ladung 1, und erfahren somit alle die gleiche Kraft im elektrischen Feld.[324] Allerdings erzeugen manche Matrices auch zwei- oder mehrwertige Ionen. Im vorliegenden Fall werden auch zweiwertige Ionen detektiert, die aufgrund ihrer doppelt so hohen Ladung aufgetrennt und detektiert werden.

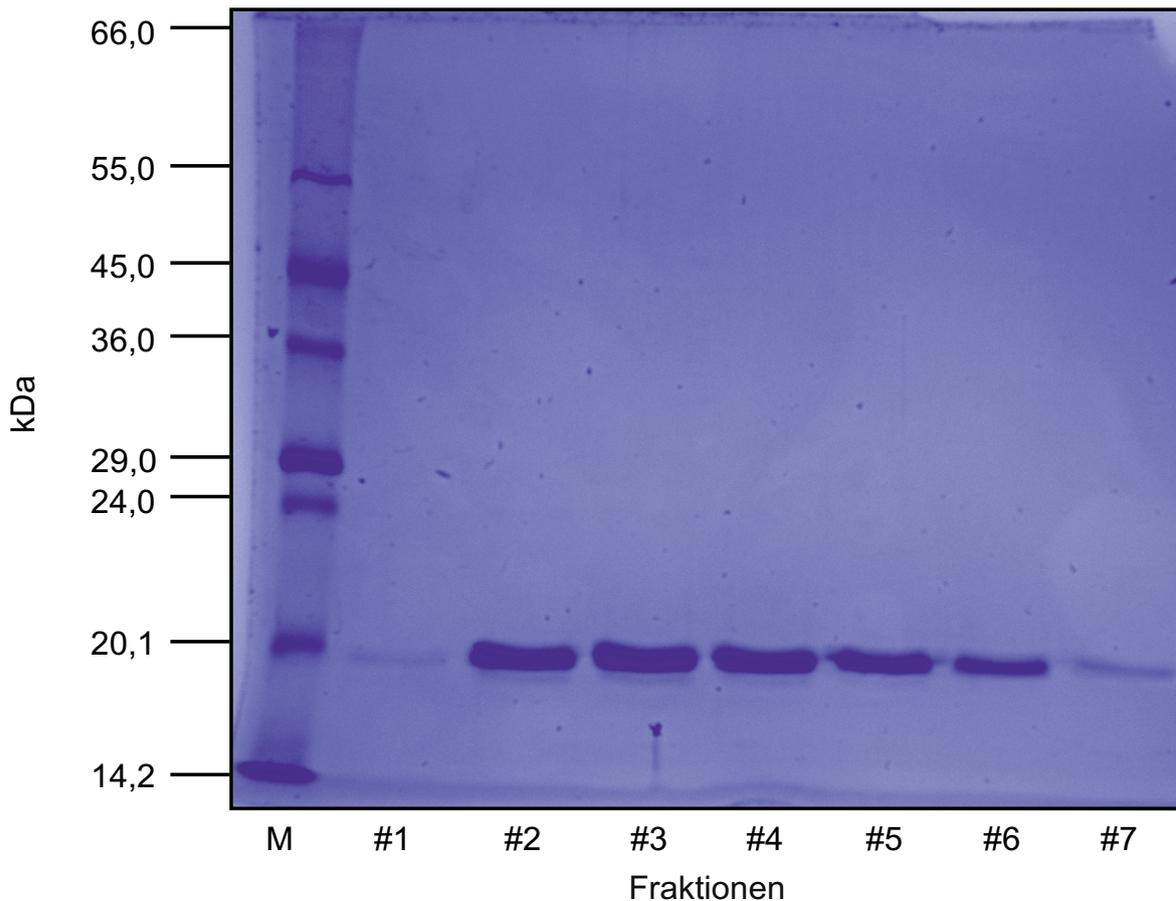
Die Abbildung 3.21 zeigt einen Proteinmassenpeak bei 20572 Dalton. Dieser Peak ist das einfach geladene Protein, das bei dem erwarteten Molekulargewicht erscheint. Der große Peak bei etwas mehr als 10000 Dalton ist das zweifach geladene Rheb, das aufgrund seiner Ladung doppelt so schnell im MALDI-TOF fliegt und somit früher

detektiert wird. Die kleineren Peaks sind auf andere Moleküle (z.B. Verunreinigungen, Proteinrückstände, Proteinfragmente) zurückzuführen.



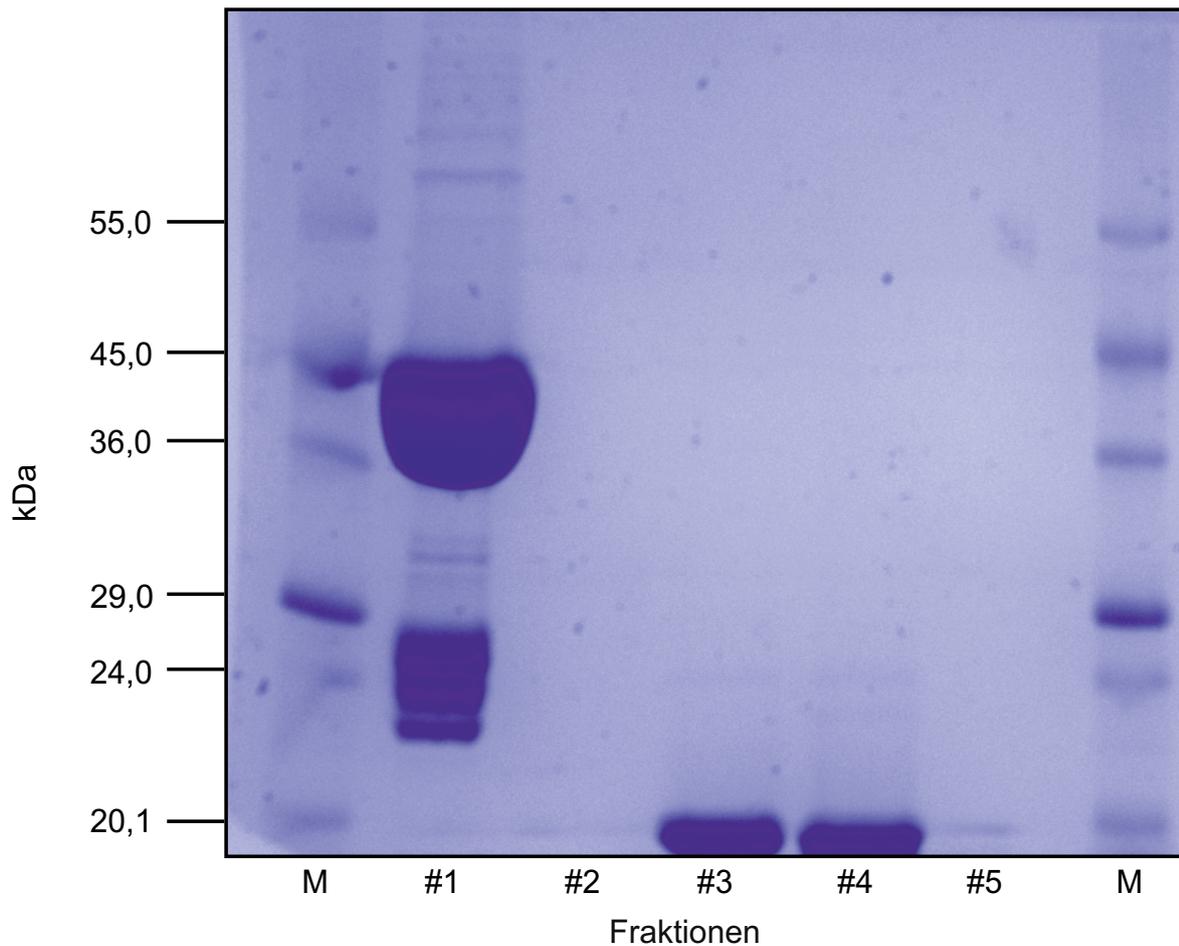
**Abbildung 3.21:** Massenbestimmung von unfarnesyliertem Rheb mittels MALDI-TOF. Aufgetragen ist die Signalintensität gegen das  $m/z$ -Verhältnis.

Der verwendete Plasmidvektor pGEX2ThsRheb besitzt zwischen dem N-terminalen GST-Tag und der Sequenz für das Rheb-Protein eine spezifische Schnittstelle für Thrombin. Über diese enzymatische Schnittstelle wurde erfolgreich der GST-Tag vom Rheb-Protein getrennt. Das ca. 37 kDa große Thrombin und die oben erwähnten Verunreinigungen wurden mit einer zweiten Reinigungssäule (Benzamidin-Säule) entfernt. Neben dem Thrombin haben auch weitere Proteinverunreinigungen an die Benzamidin-Säule gebunden, was ein Vergleich der beiden SDS-Gele (Abbildung 3.20 und Abbildung 3.22) verdeutlicht. Dabei stieg, wie man auf dem SDS-Gel (Abbildung 3.22) sehen kann, der Reinigungseffekt drastisch an. Das SDS-Gel (Abbildung 3.22) zeigt nur noch die gewünschte Proteinbande von Rheb bei ca. 20,5 kDa.



**Abbildung 3.22:** 15%iges SDS-Gel von einzelnen Proteinfractionen nach dem zweiten Aufreinigungsschritt mit einer Benzamidin-Säule. M: SigmaMarker *Low Range* M3913, #1-7: Fractionen von unfarnesylierten Rheb ohne GST-Tag.

Nach der *in vitro* Farnesylierung mit anschließender Triton X-114-Extraktion und dem enzymatischen Abschneiden des GST-Tags auf der GSTrap-Säule wurden die einzelnen Fractionen auf ein SDS-Gel (Abbildung 3.23) aufgetragen, um den Erfolg der *in vitro* Farnesylierung zu untersuchen. Abbildung 3.23 zeigt ein 15%iges SDS-Gel von zwei Fractionen des unfarnesylierten Rheb (#3 und #4) und einer kleineren Fraction von *in vitro* farnesylierten Rheb (#5). Zusätzlich wurde unfarnesyliertes Rheb mit GST-Tag (#1) als Kontrolle aufgetragen.

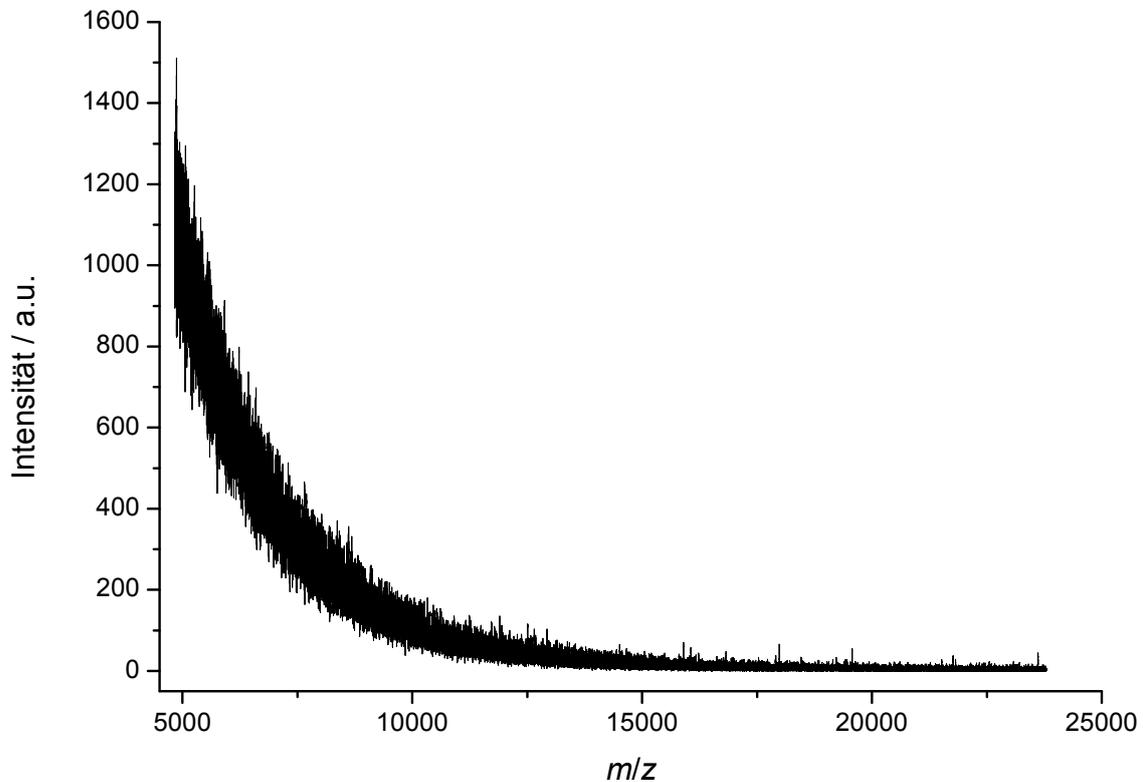


**Abbildung 3.23:** 15 %iges SDS-Gel. M: SigmaMarker *Low Range* M3913, #1: unfarnesyliertes Rheb mit GST-*Tag*, #2: Leer, #3: unfarnesyliertes Rheb-Aliquot 1, #4: unfarnesyliertes Rheb-Aliquot 2, #5: *in vitro* farnesyliertes Rheb.

Die eingesetzte Menge an unfarnesylierten Rheb bei einem Ansatz der *in vitro* Farnesylierung betrug 10 mg. UV-Spektroskopisch konnte mit dem Extinktionskoeffizienten von Rheb und dem Lambert-Beerschen Gesetz (Gleichung 2.1) die Konzentration des *in vitro* farnesylierten Rhebs bestimmt werden.[194–197] Die Ausbeute lag bei etwa 1:17 der eingesetzten Anfangsmenge. Dies entspricht einer Proteinmenge von *in vitro* farnesyliertem Rheb von 0,6 mg.

Analog zu dem unfarnesylierten Rheb wurde auch das *in vitro* farnesylierte Rheb massenspektroskopisch untersucht. Zu erwarten wäre eine Zunahme des Molekulargewichts von ca. 300 bis 400 Daltons (Farnesylpyrophosphat:  $382 \text{ g mol}^{-1}$ ) auf ca. 20900 Daltons. Allerdings lässt die Abbildung 3.24 vermuten, dass die *in vitro* Farnesylierung nicht funktioniert hat. Über MALDI-TOF konnte kein Proteinpeak detektiert werden.

Die Abbildung 3.24 zeigt nur ein Signal, das als Grundrauschen dargestellt ist. Somit steht der Proteinnachweis über das SDS-Gel (Abbildung 3.23) in Kontroverse mit der massenspektroskopischen Untersuchung (Abbildung 3.24).



**Abbildung 3.24:** Massenbestimmung von *in vitro* farnesyliertem Rheb mittels MALDI-TOF. Aufgetragen ist die Signalintensität gegen das  $m/z$ -Verhältnis.

Mögliche Ursachen könnten sein, dass die Proteinbande (Abbildung 3.23 Fraktion #5) nicht farnesylierten Rheb entspricht, sondern unfarnesyliertes Rheb ist, welches sich in der Triton X-114-Phase angereichert hat. Allerdings müsste in beiden Fällen ein Proteinpeak bei der massenspektroskopischen Untersuchung detektiert werden. Bei der MALDI-TOF treten verschiedenen Ionenspezies auf (einfach-, zweifach-geladenen usw.). Allerdings müssen nicht immer alle Species für jede Messung auftreten. Denkbar wäre ebenfalls, dass durch das Anfügen des hydrophoben Farnesylrest das *in vitro* farnesylierte Rheb mit den gewählten Parametern nicht mehr ionisierbar ist. Allerdings zeigen massenspektroskopische Untersuchungen für K-Ras4B, dass auch farnesylierte Proteine detektiert werden können. Um einen negativen Effekt der Matrix auszuschließen, können unterschiedliche Matrices ausprobiert werden. In der Literatur werden

verschiedene Parameter diskutiert, die für eine erfolgreiche Detektion nötig sind. Unter anderem wird beschrieben, dass die richtige Verdünnung zwischen Matrix und Probe essentiell für die Detektion sein kann.[325] Dies könnte ein plausibler Grund für die Detektion des Rauschens in der Probe des *in vitro* farnesylierten Rhebs sein. Die Literatur empfiehlt eine Verdünnung von mehr als 1:1000 als Optimum.[325] In dieser Arbeit wurden aber nur Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 verwendet. Oftmals ist eine MALDI-TOF-Messung mit einer *Trial-and-Error* Methode verknüpft, bis die für die jeweilige Probe passenden Reaktionsbedingungen gefunden sind.

Die nach der *in vitro* Farnesylierung notwendige Triton X-114-Extraktion wird kontrovers in der Literatur diskutiert. Triton X-100 und seine verwandten Tritonanaloga, wie Triton X-114, sind Detergenzgemische aus p-t-Octylphenylpolyoxyethylen. Die Länge der Polyoxyethylenkette schwankt dabei um einen Mittelwert. Eine kurze Polyoxyethylenkette sorgt für eine festere Bindung an hydrophoben Flächen. Die durch die Phenylgruppe erzeugte Absorption bei 280 nm macht man sich bei der Aufreinigung zu nutzen.[326] Die temperaturabhängige Mizellenausbildung von Triton hat sich C. Bordier 1981 zu Nutzen gemacht, um hydrophile und hydrophobe Proteine voneinander zu trennen.[199] Die Theorie hinter dieser Methode ist, dass die Membranen bei 4 °C in Triton X-114 aufgelöst werden und anschließend die Triton-Lösung auf 25 bis 30 °C erwärmt wird. Triton X-114 bildet bei 4 °C eine klare Lösung und bildet die Mizellen erst oberhalb von 25 °C. Durch einen Zentrifugationsschritt erhält man zwei Phasen, die obere wässrige Phase und die angereicherte untere Triton-Phase. Durch den angefügten Farnesylrest wird Rheb hydrophober, und lässt sich somit von unfarnesylierten Rheb abtrennen.[326] Theoretische Untersuchungen von prenylierten Cysteinen bestätigen diese Aussage. Dabei konnte gezeigt werden, dass prenylierte Cysteine hydrophober als palmitoylierte Cysteine sind, insbesondere nach einer Carboxymethylierung. S. D. Black konnten mit einer semiempirischen Hydrophobizitätskonstante für Fragmente die Polarität der einzelnen Seiten bzw. der terminalen chemischen Modifikation quantifizieren. Das Ergebnis ist der Logarithmus des Faktors für den Transfer von der polaren zu der unpolaren Phase. Dieses Maß ist äquivalent zu der Hydrophobizität und direkt proportional zu der freien Energie des Phasentransfers [327]:

$$\log(P) = \sum_{n=1}^N a_n f_n \quad . \quad (3.1)$$

Die Hydrophobizitätskonstante ist  $f_n$  für das Atom oder Molekülfragment der jeweiligen Proteinmodifikation. Die Anzahl der Motive wird durch  $a_n$  des Typs  $n$  in der Struktur beschrieben. Dabei ergab sich für palmitoylierte und farnesylierte Cysteine eine ähnlich hohe Hydrophobizität ( $\log(P) = 7,993$  bzw.  $7,606$ ). Geranylgeranylmodifiziertes Cystein ist um fast zwei  $\log(P)$ -Werte hydrophober ( $\log(P) = 9,924$ ). Die Ergebnisse von S. D. Black zeigen, dass durch eine Inhibierung der Prenylierung (bei *ras*-Onkogenen durch einen Effekt von Lovastatin) die Membranbindung und die pathologische Funktion unterdrückt werden. Zusätzlich hat S. D. Black eine Beziehung zwischen der freien Energie und der jeweiligen chemischen Modifikation aufgestellt. Über den Zusammenhang

$$\Delta G = -2,303 \cdot R \cdot T \cdot (\log(P)) \quad (3.2)$$

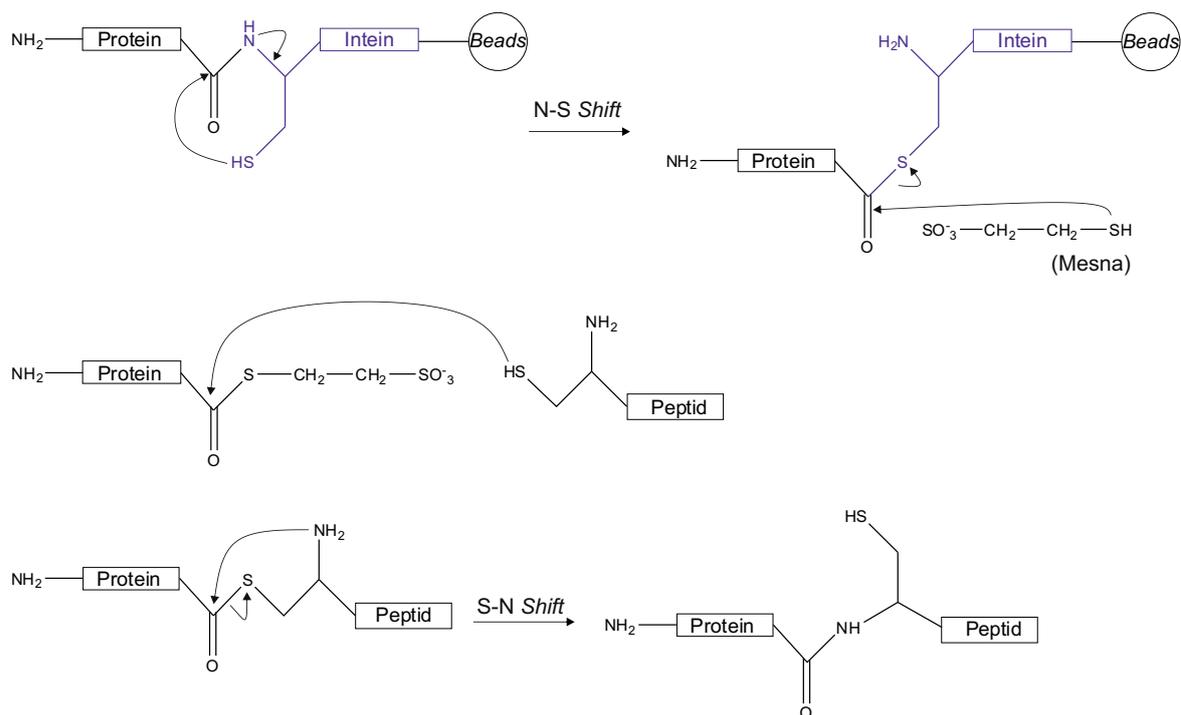
kann die freie Energie einer Proteinsequenz in An- und Abwesenheit von Proteolyse, Prenylierung oder Methylierung bestimmt werden, um die Neigung für die Membraninteraktion in jedem Stadium vorauszusagen.[327]

Das Prinzip der Triton-Extraktion hat C. Bordier in dem *Abstract Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution* veröffentlicht.[199] Diese Publikation lässt die Vermutung zu, dass man mit diesem Prinzip lösliche Proteine von Membranproteinen trennen kann. Es konnte aber für zwei integrale Membranproteine,  $\beta$ -Bungarotoxin-Bindungsprotein (spannungsabhängiger  $K^+$ -Kanal) und Synaptophysin gezeigt werden, dass das durch C. Bordier beschriebene Verfahren nicht prinzipiell auf alle Proteine angewendet werden kann. Selbst das Synaptophysin mit den vier Transmembrandomänen und einem Molekulargewicht von 38 kDa ist nicht ausschließlich in der Triton-Phase lokalisiert. H. Rehm vermutete, dass die Proteine aufgrund ihrer hydrophilen Glykanketten zwischen den beiden Phasen lokalisiert sind. Dementsprechend ist der Reinigungseffekt gering.[326] Eine notwendige Modifikation für das vorliegende Grundprinzip von C. Bordier wurde 2009 von G. de la Vara präsentiert.[328] Wie auch H. Rehm hat G. de la Vara festgestellt, dass sich Proteine nicht ausschließlich

in einer der beiden Phasen aufhalten. Die Verteilung wird durch den Verteilungskoeffizienten  $K_i$  beschrieben. Der Koeffizient ist definiert als das Verhältnis der Konzentrationen des Stoffes  $i$  in der oberen wässrigen Phase zu der Konzentration in der unteren Triton-Phase. Somit besitzen hydrophobe Proteine einen  $K_i < 1$  und hydrophile Proteine einen  $K_i > 1$ . Das durch G. de la Vara modifizierte Prinzip beruht auf mehrmaligen Kühlungs- und Erwärmungsschritten der Proteinlösung im Gegenstromverfahren. Trotz alledem liegen die Proteine in der Zwischenphase vor, und die Methode liefert nur ein Maß der Hydrophobizität des jeweiligen Proteins. Ein großer Nachteil ist, dass viele Proteine das mehrmalige Erhitzen und Abkühlen mit Triton X-114 nicht unbeschadet überstehen. G. de la Vara berichtet für die  $H^+$ -ATPase, dass ihre Aktivität verloren geht.[326, 328] Einen ähnlichen Effekt konnte man für Rheb beobachten. Dabei deuten die Kontroll-Experimente der CD-Spektroskopischen-Untersuchungen (Daten nicht gezeigt) darauf hin, dass das *in vitro* farnesylierte Rheb nicht richtig gefaltet vorliegt. Das Spektrum zeigt eine deutliche Zufallsknäuel-Anordnung. Dies kann aber nur eine der möglichen Ursachen sein. Bei der *in vitro* Farnesylierung konnte nach der zusätzlichen Zugabe von Farnesylpyrophosphat eine Proteinausfällung beobachtet werden. Ob diese Ausfällung durch die Zugabe des Farnesylrests oder durch die erhöhte Temperatur von 30 °C zustande kam, lässt sich nicht zweifelsfrei klären. Sowohl bei der *in vitro* Farnesylierung, als auch bei der anschließenden Triton X-114-Extraktion ist das Rheb einem chemischen und durch Temperatur induziertem Stress ausgesetzt. Das mehrfache Abkühlen und erneute Erhitzen auf 37 °C während der Triton X-114-Extraktion sind mit Sicherheit keine förderlichen Proteinbedingungen. Eine mögliche Proteinfaltung während dieser beiden Prozesse, die mehrere Stunden dauerten, ist nicht auszuschließen. In der lebenden Zelle wird eine korrekte Proteinfaltung unter extremen Bedingungen durch Hitzeschockproteine reguliert. Dabei sollen die Proteine vor möglicher Denaturierung geschützt werden. Aber auch unter physiologischen Bedingungen sind die Hitzeschockproteine als Chaperone an der Proteinfaltung beteiligt.[329] In einer Vielzahl von Publikation wird diese Stresssituation für die Proteinfaltung und die dadurch entstehenden Krankheiten diskutiert. Eine kleine Auswahl ist hier gegeben.[330–342] Die einzelnen Schritte der *in vitro* Farnesylierung und der Triton X-114-Extraktion sind fehleranfällig. Auftretende Fehler bzw. Probleme können aufgrund der Komple-

xität und der Vielzahl an verschiedenen Faktoren (z. B. Temperatur, Reaktionsdauer, eingesetzte Chemikalien) nicht direkt untersucht werden. Somit ist es auch schwierig mögliche plausible Gründe dafür zu finden, warum die Massenspektrometrie (Abbildung 3.24) kein *in vitro* farnesyliertes Protein detektiert hat, aber die Gelelektrophorese (Abbildung 3.23) und die Kontroll-Experimente der CD-Spektroskopie auf ein Protein hindeuten. Aufgrund dieser Problematik wurde beschlossen die Farnesylierung mit einem gekürzten Rheb-Protein und anschließender Ligation mit einem farnesylierten Peptid durchzuführen (analog zu früheren Ligationen von K-Ras4B [261]).

Für einen detaillierten Einblick in die EPL-Ligation (*Expressed Protein Ligation*) von K-Ras4B und Rheb wird an dieser Stelle auf die Veröffentlichung von Y.-X. Chen *et al.* verwiesen.[261] Die Methode der *Expressed Protein Ligation* (Abbildung 3.25) beruht auf der Eigenschaft, dass Proteindomänen wie Intein beim Proteinspleißen Thioester ausbilden können.[343, 344]



**Abbildung 3.25:** Schematische Darstellung der EPL-Ligation. Dargestellt ist die C-terminale Fusion zwischen dem Protein (schwarz) und dem Intein (blau) mit dem Peptid über eine Thioester-Bindung. Erstellt nach [345] mit ChemBioDraw Ultra 12.0.

Der autokatalytische Prozess des Proteinspleißens entspricht dem RNA-Spleißen auf Proteinebene, benötigt aber keine weiteren Reaktionspartner.[346] Beim Vorgang des

Proteinspleißens werden durch eine autokatalytische Reaktion die internen Polypeptidsequenzen (Inteine) aus der Vorstufe des Proteins entfernt. Die Inteine katalysieren und vermitteln die Peptidbindungsspaltung an der N- oder C-terminalen Spleißstelle.[347, 348] Dabei entsteht eine neue Peptidbindung zwischen den Polypeptiden, die auch Ex-teine genannt werden.[349] Die *Expressed Protein Ligation* ist eine weit verbreitete Methode für die Modifikation von semisynthetischen Proteinen.[350] Die Methode ermöglicht große Modifikationsmöglichkeiten, zum Beispiel durch Einfügen von Fluorophoren, Isotopen oder auch anderen Aminosäuren, so dass das Protein nach Belieben modifiziert werden kann.[351, 352] Die Expression eines gekürzten Rheb-Proteins und die anschließende Ligation mit einem kommerziell synthetisierten Peptid ist Gegenstand aktueller Experimente.

## 4 Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurde der Einfluss von verschiedenen biologischen Proteinen (Ras, Calmodulin, Rheb, Phospholipase A2) und Molekülen (*Tweezer* CLR01) auf Lipidmembranen untersucht. Im Detail wurde dabei die Interaktion zwischen Calmodulin und K-Ras4B in Gegenwart eines anionischen Membransystems (DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol 20:5:45:5:25 mol%) untersucht. Ein weiterer Teil dieser Arbeit hat sich mit dem Einfluss verschiedener DOPS-Konzentrationen auf die Lokalisation und das Phasenverhalten von Ras konzentriert. Für die Untersuchungen wurden verschiedene biophysikalische Methoden, wie die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, die Fluoreszenzanisotropie und die Rasterkraftmikroskopie verwendet. Zusätzlich zu den biophysikalischen Methoden wurde auch die Proteinexpression, die säulenchromatografische Aufreinigung und die Farnesylierung des humanen Rheb-Proteins durchgeführt. Die Proteinexpression wurde rekombinant in *E. coli* mit dem humanen *full-length* Rheb-Plasmid durchgeführt. Die anschließende Proteinaufreinigung erfolgte über eine GSTrap- und Benzamidin-Säule. Für die Farnesylierung wurde die Möglichkeit der *in vitro* Farnesylierung gewählt, und mittels Triton X-114-Extraktion wurde das *in vitro* farnesylierte Protein abgetrennt. Das enzymatische Schneiden des GST-Tags erfolgte mit dem Enzym Thrombin bei Raumtemperatur auf der GSTrap-Säule. Zusätzlich wurde der Einfluss des molekularen *Tweezers* CLR01 und der Phospholipase A2 auf Membransysteme rasterkraftmikroskopisch untersucht.

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Dissertation ermöglichen einen weiteren Einblick in die komplexen biologischen Prozesse einer Zelle. Nach einer früheren Studie [11] über die Interaktion von K-Ras4B mit PDE $\delta$  konnte für einen weiteren Interaktionspartner ein Zusammenspiel gezeigt werden. Sobald das Calcium-bindende Protein Calmodulin K-Ras4B gebunden hat und einen Komplex mit ihm eingeht, ist K-Ras4B nicht mehr in

der Lage, an die anionische Lipidmembran zu binden. Dieser Aspekt dient vermutlich als Regulationsparameter, da somit K-Ras4B quasi inaktiv vorliegt und nicht mehr in die Signaltransduktionskaskade eingreifen kann.

Der vorhergesagte Effekt der Membranzerstörung durch Phospholipase A2 konnte mit rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen bestätigt werden. Innerhalb kürzester Zeit setzte die enzymatische Aktivität der Phospholipase ein und zerstörte die Topologie der anionischen Membran. Desweiteren konnte mit rasterkraftmikroskopischen Experimenten der Einfluss des molekularen *Tweezers* CLR01 auf verschiedene Membransysteme untersucht werden. Eine Membranzerstörung durch den *Tweezer* konnte in diesem Zusammenhang nur für *Raft*-ähnliche Membranen (DOPC/SM/Chol 45:25:30 mol%) und nicht für fluide Membransysteme (DOPC) beobachtet werden.

Die rekombinante Rheb-Expression in *E. coli*, und die anschließende Proteinaufreinigung über ein *Äktaprime*-System war erfolgreich. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung über den GST-*Tag* an eine GSTrap Säule mit den gewählten Parametern für dieses Protein optimal ist. Die vorherigen Bedenken bezüglich der Größe des GST-*Tags* (der GST-*Tag* ist etwas größer als das Zielprotein Rheb (~25,5 kDa gegenüber ~20,5 kDa)) in Bezug auf eventuelle sterische Behinderungen wurden nicht bestätigt. Der GST-*Tag* konnte über eine enzymatische Thrombinschnittstelle entfernt werden. Einzig die *in vitro* Farnesylierung bzw. die Triton X-114-Extraktion ergaben ein Problem. Das Problem bestand unter anderem darin, dass es keinen direkten Nachweis für das Gelingen der *in vitro* Farnesylierung bzw. der Triton X-114-Extraktion gibt. Aufgrund der schwierigen *in vitro* Farnesylierung und der sehr geringen Proteinausbeute wurde vorgeschlagen, ein gekürztes Protein mit einem lipidierten Peptid zu koppeln. Eine weitere Möglichkeit für die Farnesylierung von Rheb ist die Ligation eines gekürzten Rheb-Proteins (Sequenz 1-173) mit einem farnesylierten Peptid. Diese Art der Kopplung ist für Ras eine etablierte und effizient handhabbare Methode. Über die *Expressed Protein Ligation* (EPL-Ligation) wird das gekürzte Protein mit einem synthetisierten Peptid über eine Thioester-Bindung lipidiert.[261, 353] Bei der MIC-Ligation (MIC = Maleimidocaproyl) wird das in *E. coli* exprimierte verkürzte Ras-Protein mit einem synthetisierten Maleinimidocaproyl-aktivierten Ras-Peptid gekoppelt.[47, 354]

## 5 Summary

In this thesis, the influence of different biological proteins (Ras, Calmodulin, Rheb, Phospholipase A2) and molecules (Tweezer CLR01) on membranes was examined. In detail, the interaction between calmodulin and K-Ras4B in the presence of an anionic membrane system (DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol 20:5:45:5:25 mol%) was studied. Another part of this work dealt with the influence of various DOPS concentrations on the localization of Ras. For these studies, different biophysical methods were used, such as the surface plasmon resonance spectroscopy, fluorescence anisotropy and atomic force microscopy. In addition to the biophysical methods, protein expression, column chromatography purification and farnesylation of the human Rheb protein was carried out. The recombinant protein expression was performed in *E. coli* with the full-length human Rheb plasmid. Subsequently, the protein purification was carried out with a GSTrap and Benzamidin column. The farnesylation was performed *in vitro*, and the farnesylated protein was separated with a Triton X-114 extraction. The enzymatic cutting of the GST tag was achieved with the enzyme thrombin at room temperature directly on the purification GSTrap column. In addition, the influence of the molecular tweezer CLR01 and of phospholipase A2 on membrane systems was examined using atomic force microscopy.

The presented results of this thesis provide a deeper insights into the complex biological processes of a living cell. According to a previous study [11] about the interaction of K-Ras4B with PDE $\delta$ , the interplay for another interaction partner of K-Ras4B could be demonstrated. Once the calcium binding protein calmodulin has bound K-Ras4B and formed a complex with it, K-Ras4B cannot bind anymore to an anionic membrane. Probably, such complexation serves as a regulatory parameter. In this state, K-Ras4B is inactive and cannot activate the signal transduction cascade.

The predicted effect of membrane destruction by the phospholipase A2 was confirmed by atomic force microscopy experiments. Within a very short time, the enzymatic activity of phospholipase A2 started, and leading to disruption of the topology and lateral organization of the system. Furthermore, the effect of the molecular tweezer CLR01 on different membrane systems could be investigated by atomic force microscopy. In this context, membrane disruption through the tweezer could only be detected for raft-like membranes (DOPC/SM/Chol 45:20:30 mol%), but not for fluid lipid bilayer systems (DOPC).

The recombinant protein expression of the human Rheb protein in *E. coli* and the subsequent protein purification with a Äktaprime system was successful. It could be shown that the binding via the GST tag to the GSTrap column with the selected purification parameters is optimal for this protein. The previous concern regarding the size of the GST tag (the GST tag is slightly larger than the target protein Rheb (~25.5 kDa vs. ~20.5 kDa)) and potential steric constraints was not confirmed. The GST tag was removed via the enzymatic thrombin cleavage. Only the *in vitro* farnesylation and the Triton X-114 extraction generated a problem. The problem was, among others, that no direct evidence for the success of the *in vitro* farnesylation and Triton X-114 extraction exists. Based on the difficulty *in vitro* farnesylation and the very low protein yield, a different way of farnesylation was proposed. Farnesylation of Rheb is also possible by ligation of a truncated protein (truncated Rheb sequence 1-173) with a lipidated peptide. This type of coupling is well established and is an efficient by used method for Ras. The *Expressed Protein Ligation* (EPL ligation) enables a coupling between the truncated Rheb protein with a synthesized peptide by a thioester bond.[261, 353] The Ras-like protein Rheb could also be ligated using a synthesized peptide via the MIC ligation (MIC = maleimidocaproyl). The MIC ligation is based on two different steps. In the first step, the truncated Ras protein is expressed in *E. coli* and, in the second step, the coupling with a synthesized maleimidocaproyl activated Ras peptide is realized.[47]

---

# Literaturverzeichnis

- [1] A. C. von Eschenbach, *J. Natl. Med. Assoc.* **2003**, 95(7), 637–639.
- [2] M. Malumbres, M. Barbacid, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3(6), 459–465.
- [3] V. T. DeVita, *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2004**, 1(2), 55.
- [4] The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1989, *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014, [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1989/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1989/), **04.08.2015**.
- [5] E. Marshall, *Science* **2011**, 331(6024), 1540–1544.
- [6] The top 10 causes of death, World Health Organization, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>, **06.08.2015**.
- [7] *Statistisches Jahrbuch Deutschland 2014*, 1. Aufl., Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, **2014**.
- [8] J. L. Bos, *Cancer Res.* **1989**, 49(17), 4682–4689.
- [9] N. Berndt, A. D. Hamilton, S. M. Sebti, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, 11(11), 775–791.
- [10] J. de Castro Carpeño, C. Belda-Iniesta, *Transl. Lung Cancer Res.* **2013**, 2(2), 142–151.
- [11] K. Weise, S. Kapoor, A. Werkmüller, S. Möbitz, G. Zimmermann, G. Triola, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134(28), 11503–11510.
- [12] A. Shevchenko, K. Simons, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, 11(8), 593–598.

- [13] G. van Meer, A. I. P. M. de Kroon, *J. Cell. Sci.* **2011**, *124*(1), 5–8.
- [14] W. Dowhan, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*(1), 199–232.
- [15] G. van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*(2), 112–124.
- [16] M. Edidin, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*(5), 414–418.
- [17] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **1972**, *175*(4023), 720–731.
- [18] E. D. Korn, *Annu. Rev. Biochem.* **1969**, *38*(1), 263–288.
- [19] J. Seeliger, Dissertation, Technische Universität Dortmund, Dortmund, **2013**.
- [20] D. Marsh, *Biophys. J.* **2007**, *93*(11), 3884–3899.
- [21] J. Lessig, B. Fuchs, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*(16), 2021–2041.
- [22] M. Sud, E. Fahy, D. Cotter, A. Brown, E. A. Dennis, C. K. Glass, A. H. Merrill, R. C. Murphy, C. R. H. Raetz, D. W. Russell, S. Subramaniam, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*(Database), D527–D532.
- [23] D. J. Recktenwald, H. M. McConnell, *Biochemistry* **1981**, *20*(15), 4505–4510.
- [24] G. W. Feigenson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2007**, *36*(1), 63–77.
- [25] T.-Y. Wang, J. R. Silvius, *Biophys. J.* **2001**, *81*(5), 2762–2773.
- [26] V. Kiessling, J. M. Crane, L. K. Tamm, *Biophys. J.* **2006**, *91*(9), 3313–3326.
- [27] T. C. Anglin, J. Liu, J. C. Conboy, *Biophys. J.* **2007**, *92*(1), L01–L03.
- [28] A. Papadopoulos, S. Vehring, I. Lopez-Montero, L. Kutschenko, M. Stockl, P. F. Devaux, M. Kozlov, T. Pomorski, A. Herrmann, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*(21), 15559–15568.
- [29] I. López-Montero, N. Rodriguez, S. Cribier, A. Pohl, M. Vélez, P. F. Devaux, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*(27), 25811–25819.
- [30] B. R. Ganong, R. M. Bell, *Biochemistry* **1984**, *23*(21), 4977–4983.

- 
- [31] J. Bai, R. E. Pagano, *Biochemistry* **1997**, *36*(29), 8840–8848.
- [32] T. L. Steck, J. Ye, Y. Lange, *Biophys. J.* **2002**, *83*(4), 2118–2125.
- [33] P. R. Cullis, M. J. Hope, M. B. Bally, T. D. Madden, L. D. Mayer, D. B. Fenske, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1331*(2), 187–211.
- [34] S. Kapoor, A. Werkmüller, C. Denter, Y. Zhai, J. Markgraf, K. Weise, N. Opitz, R. Winter, *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*(4), 1187–1195.
- [35] C. Nicolini, J. Kraineva, M. Khurana, N. Periasamy, S. S. Funari, R. Winter, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*(2), 248–258.
- [36] C. Nicolini, A. Celli, E. Gratton, R. Winter, *Biophys. J.* **2006**, *91*(8), 2936–2942.
- [37] H.-J. Kaiser, D. Lingwood, I. Levental, J. L. Sampaio, L. Kalvodova, L. Rajendran, K. Simons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*(39), 16645–16650.
- [38] I. Levental, M. Grzybek, K. Simons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*(28), 11411–11416.
- [39] A. Pralle, P. Keller, E. L. Florin, K. Simons, J. K. Horber, *J. Cell Biol.* **2000**, *148*(5), 997–1008.
- [40] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, *387*(6633), 569–572.
- [41] S. Munro, *Cell* **2003**, *115*(4), 377–388.
- [42] D. Lingwood, K. Simons, *Science* **2009**, *327*(5961), 46–50.
- [43] J. F. Hancock, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*(6), 456–462.
- [44] H. Shogomori, A. T. Hammond, A. G. Ostermeyer-Fay, D. J. Barr, G. W. Feigenson, E. London, D. A. Brown, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*(19), 18931–18942.
- [45] D. A. Brown, *Physiology* **2006**, *21*(6), 430–439.
- [46] R. M. Epand, *Prog. Lipid Res.* **2006**, *45*(4), 279–294.
- [47] B. Popkirova, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Bochum, **2004**.

- [48] J. J. Harvey, *Nature* **1964**, 204(4963), 1104–1105.
- [49] W. H. Kirsten, L. A. Mayer, *J. Natl. Cancer Inst.* **1967**, 39(2), 311–335.
- [50] K. Shimizu, M. Goldfarb, Y. Suard, M. Perucho, Y. Li, T. Kamata, J. Feramisco, E. Stavnezer, J. Fogh, M. H. Wigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, 80(8), 2112–2116.
- [51] Y. Takai, T. Sasaki, T. Matozaki, *Physiol. Rev.* **2001**, 81(1), 153–208.
- [52] I. R. Vetter, A. Wittinghofer, *Science* **2001**, 294(5545), 1299–1304.
- [53] D. D. Leipe, Y. I. Wolf, E. V. Koonin, L. Aravind, *J. Mol. Biol.* **2002**, 317(1), 41–72.
- [54] K. Jockers, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Bochum, **2012**.
- [55] J. Feuerstein, H. R. Kalbitzer, J. John, R. S. Goody, A. Wittinghofer, *Eur. J. Biochem.* **1987**, 162(1), 49–55.
- [56] G. W. Reuther, C. J. Der, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, 12(2), 157–165.
- [57] L. Johnson, D. Greenbaum, K. Cichowski, K. Mercer, E. Murphy, E. Schmitt, R. T. Bronson, H. Umanoff, W. Edelmann, R. Kucherlapati, T. Jacks, *Genes Dev.* **1997**, 11(19), 2468–2481.
- [58] H. Umanoff, W. Edelmann, A. Pellicer, R. Kucherlapati, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92(5), 1709–1713.
- [59] A. D. Cox, C. J. Der, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **1997**, 1333(1), F51–F71.
- [60] A. Oliff, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **1999**, 1423(3), C19–C30.
- [61] Q. Dai, E. Choy, V. Chiu, J. Romano, S. R. Slivka, S. A. Steitz, S. Michaelis, M. R. Philips, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273(24), 15030–15034.
- [62] J. D. Romano, W. K. Schmidt, S. Michaelis, *Mol. Biol. Cell* **1998**, 9(8), 2231–2247.

- 
- [63] W. K. Schmidt, A. Tam, K. Fujimura-Kamada, S. Michaelis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*(19), 11175–11180.
- [64] J. F. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, *Cell* **1990**, *63*(1), 133–139.
- [65] G. Triola, H. Waldmann, C. Hedberg, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*(1), 87–99.
- [66] J. H. Jackson, C. G. Cochrane, J. R. Bourne, P. A. Solski, J. E. Buss, C. J. Der, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*(8), 3042–3046.
- [67] P. J. Casey, *J. Lipid Res.* **1992**, *33*(12), 1731–1740.
- [68] P. A. Edwards, J. Ericsson, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 157–185.
- [69] O. Rocks, A. Peyker, M. Kahms, P. J. Verveer, C. Koerner, M. Lumbierres, J. Kuhlmann, H. Waldmann, A. Wittinghofer, P. I. H. Bastiaens, *Science* **2005**, *307*(5716), 1746–1752.
- [70] J. F. Hancock, A. I. Magee, J. E. Childs, C. J. Marshall, *Cell* **1989**, *57*(7), 1167–1177.
- [71] A. I. Magee, L. Gutierrez, I. A. McKay, C. J. Marshall, A. Hall, *EMBO J.* **1987**, *6*(11), 3353–3357.
- [72] I. A. Prior, J. F. Hancock, *J. Cell. Sci.* **2001**, *114*(Pt 9), 1603–1608.
- [73] J. F. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, *Cell* **1990**, *63*(1), 133–139.
- [74] S. Roy, R. Luetterforst, A. Harding, A. Apolloni, M. Etheridge, E. Stang, B. Rolls, J. F. Hancock, R. G. Parton, *Nat. Cell Biol.* **1999**, *1*(2), 98–105.
- [75] J. Scheel, J. Srinivasan, U. Honnert, A. Henske, T. V. Kurzchalia, *Nat. Cell Biol.* **1999**, *1*(2), 127–129.
- [76] K. Weise, G. Triola, L. Brunsveld, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*(4), 1557–1564.
- [77] J. Yan, S. Roy, A. Apolloni, A. Lane, J. F. Hancock, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*(37), 24052–24056.

- [78] A. Ehrkamp, C. Herrmann, R. Stoll, R. Heumann, *Cancers* **2013**, *5*(2), 639–661.
- [79] C. Lenzen, R. H. Cool, H. Prinz, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, *Biochemistry* **1998**, *37*(20), 7420–7430.
- [80] J. P. Hutchinson, J. F. Eccleston, *Biochemistry* **2000**, *39*(37), 11348–11359.
- [81] C. Klebe, H. Prinz, A. Wittinghofer, R. S. Goody, *Biochemistry* **1995**, *34*(39), 12543–12552.
- [82] D. Vigil, J. Cherfils, K. L. Rossman, C. J. Der, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*(12), 842–857.
- [83] K. Scheffzek, M. R. Ahmadian, A. Wittinghofer, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*(7), 257–262.
- [84] P. Gideon, J. John, M. Frech, A. Lautwein, R. Clark, J. E. Scheffler, A. Wittinghofer, *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*(5), 2050–2056.
- [85] K. Scheffzek, M. R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Wiesmuller, A. Lautwein, F. Schmitz, A. Wittinghofer, *Science* **1997**, *277*(5324), 333–338.
- [86] J. L. Bos, H. Rehmann, A. Wittinghofer, *Cell* **2007**, *129*(5), 865–877.
- [87] Y. S. Babu, J. S. Sack, T. J. Greenhough, C. E. Bugg, A. R. Means, W. J. Cook, *Nature* **1985**, *315*(6014), 37–40.
- [88] M. Zhang, C. Abrams, L. Wang, A. Gizzi, L. He, R. Lin, Y. Chen, P. J. Loll, J. M. Pascal, J.-f. Zhang, *Structure* **2012**, *20*(5), 911–923.
- [89] H. Tidow, P. Nissen, *FEBS J.* **2013**, *280*(21), 5551–5565.
- [90] C. B. Klee, T. C. Vanaman, *Adv. Protein Chem.* **1982**, *35*, 213–321.
- [91] K. T. O’Neil, W. F. DeGrado, *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*(2), 59–64.
- [92] W. F. DeGrado, F. G. Prendergast, Wolfe Jr., H. R., J. A. Cox, *J. Cell. Biochem.* **1985**, *29*(2), 83–93.

- 
- [93] J. A. Cox, M. Comte, J. E. Fitton, W. F. DeGrado, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*(4), 2527–2534.
- [94] N. J. Anthis, G. M. Clore, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*(26), 9648–9651.
- [95] P. Kukic, C. Camilloni, A. Cavalli, M. Vendruscolo, *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*(8), 1826–1838.
- [96] M. Walsh, F. C. Stevens, *Biochemistry* **1978**, *17*(19), 3924–3928.
- [97] R. E. Klevit, D. K. Blumenthal, D. E. Wemmer, E. G. Krebs, *Biochemistry* **1985**, *24*(27), 8152–8157.
- [98] M. Ikura, N. Hasegawa, S. Aimoto, M. Yazawa, K. Yagi, K. Hikichi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *161*(3), 1233–1238.
- [99] D. Chin, A. R. Means, *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*(8), 322–328.
- [100] K. Yamagata, L. K. Sanders, W. E. Kaufmann, W. Yee, C. A. Barnes, D. Nathans, P. F. Worley, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*(23), 16333–16339.
- [101] S. Karassek, C. Berghaus, M. Schwarten, C. G. Goemans, N. Ohse, G. Kock, K. Jockers, S. Neumann, S. Gottfried, C. Herrmann, R. Heumann, R. Stoll, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*(44), 33979–33991.
- [102] P.-J. Aspúria, F. Tamanoi, *Cell. Signal.* **2004**, *16*(10), 1105–1112.
- [103] Y. Yu, Y. Chang, S. Li, H. Hu, Q. Huang, J. Ding, *Acta Cryst. D* **2004**, *60*(Pt 10), 1883–1887.
- [104] Y. Yu, S. Li, X. Xu, Y. Li, K. Guan, E. Arnold, J. Ding, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*(17), 17093–17100.
- [105] G. J. Clark, M. S. Kinch, K. Rogers-Graham, S. M. Sebt, A. D. Hamilton, C. J. Der, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*(16), 10608–10615.
- [106] E. Choy, V. K. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I. E. Ivanov, M. R. Philips, *Cell* **1999**, *98*(1), 69–80.

- [107] C. Herrmann, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*(1), 122–129.
- [108] P. J. Kraulis, P. J. Domaille, S. L. Campbell-Burk, T. van Aken, E. D. Laue, *Biochemistry* **1994**, *33*(12), 3515–3531.
- [109] A. Wittinghofer, N. Nassar, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*(12), 488–491.
- [110] Y. Ito, K. Yamasaki, J. Iwahara, T. Terada, A. Kamiya, M. Shirouzu, Y. Muto, G. Kawai, S. Yokoyama, E. D. Laue, M. Walchli, T. Shibata, S. Nishimura, T. Miyazawa, *Biochemistry* **1997**, *36*(30), 9109–9119.
- [111] M. Spoerner, C. Herrmann, I. R. Vetter, H. R. Kalbitzer, A. Wittinghofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*(9), 4944–4949.
- [112] B. Manning, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*(11), 573–576.
- [113] C. Nardella, Z. Chen, L. Salmena, A. Carracedo, A. Alimonti, A. Egia, B. Carver, W. Gerald, C. Cordon-Cardo, P. P. Pandolfi, *Genes Dev.* **2008**, *22*(16), 2172–2177.
- [114] Y.-H. Li, H. Werner, A. W. Puschel, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*(48), 33784–33792.
- [115] X. Zhou, T. Ikenoue, X. Chen, L. Li, K. Inoki, K.-L. Guan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*(22), 8923–8928.
- [116] J. Kim, K.-L. Guan, *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*(1), 1001–1032.
- [117] R. V. Durán, M. N. Hall, *EMBO Rep.* **2012**, *13*(2), 121–128.
- [118] S. Karassek, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Bochum, **2010**.
- [119] X. Long, Y. Lin, S. Ortiz-Vega, K. Yonezawa, J. Avruch, *Curr. Biol.* **2005**, *15*(8), 702–713.
- [120] Y.-C. Hsu, J. J. Chern, Y. Cai, M. Liu, K.-W. Choi, *Nature* **2007**, *445*(7129), 785–788.
- [121] H. Rehmann, M. Brüning, C. Berghaus, M. Schwarten, K. Köhler, H. Stocker, R. Stoll, F. J. Zwartkruis, A. Wittinghofer, *FEBS Lett.* **2008**, *582*(20), 3005–3010.

- 
- [122] X. Wang, B. D. Fonseca, H. Tang, R. Liu, A. Elia, M. J. Clemens, U.-A. Bommer, C. G. Proud, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283(45), 30482–30492.
- [123] X. Dong, B. Yang, Y. Li, C. Zhong, J. Ding, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284(35), 23754–23764.
- [124] E. Im, F. C. von Lintig, J. Chen, S. Zhuang, W. Qui, S. Chowdhury, P. F. Worley, G. R. Boss, R. B. Pilz, *Oncogene* **2002**, 21(41), 6356–6365.
- [125] M. Karbowiczek, T. Cash, M. Cheung, G. P. Robertson, A. Astrinidis, E. P. Henske, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279(29), 29930–29937.
- [126] Y.-J. Choi, A. Di Nardo, I. Kramvis, L. Meikle, D. J. Kwiatkowski, M. Sahin, X. He, *Genes Dev.* **2008**, 22(18), 2485–2495.
- [127] S. Codeluppi, C. I. Svensson, M. P. Hefferan, F. Valencia, M. D. Silldorff, M. Oshiro, M. Marsala, E. B. Pasquale, *J. Neurosci.* **2009**, 29(4), 1093–1104.
- [128] A. Di Nardo, I. Kramvis, N. Cho, A. Sadowski, L. Meikle, D. J. Kwiatkowski, M. Sahin, *J. Neurosci.* **2009**, 29(18), 5926–5937.
- [129] C. Malagelada, E. J. Ryu, S. C. Biswas, V. Jackson-Lewis, L. A. Greene, *J. Neurosci.* **2006**, 26(39), 9996–10005.
- [130] C. Malagelada, Z. H. Jin, L. A. Greene, *J. Neurosci.* **2008**, 28(53), 14363–14371.
- [131] D. Nie, A. Di Nardo, J. M. Han, H. Baharanyi, I. Kramvis, T. Huynh, S. Dabora, S. Codeluppi, P. P. Pandolfi, E. B. Pasquale, M. Sahin, *Nat. Neurosci.* **2010**, 13(2), 163–172.
- [132] K. K. Park, K. Liu, Y. Hu, P. D. Smith, C. Wang, B. Cai, B. Xu, L. Connolly, I. Kramvis, M. Sahin, Z. He, *Science* **2008**, 322(5903), 963–966.
- [133] Y. Sekine, K. Takeda, H. Ichijo, *Curr. Mol. Med.* **2006**, 6(1), 87–97.
- [134] A. T. Baines, D. Xu, C. J. Der, *Future Med. Chem.* **2011**, 3(14), 1787–1808.
- [135] K. J. Mavrakis, H. Zhu, R. L. Silva, J. R. Mills, J. Teruya-Feldstein, S. W. Lowe, W. Tam, J. Pelletier, H.-G. Wendel, *Genes Dev.* **2008**, 22(16), 2178–2188.

- [136] M. D. Vos, C. A. Ellis, A. Bell, M. J. Birrer, G. J. Clark, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275(46), 35669–35672.
- [137] A. B. Vojtek, C. J. Der, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273(32), 19925–19928.
- [138] M. E. Katz, F. McCormick, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1997**, 7(1), 75–79.
- [139] D. Bano, P. Nicotera, *Stroke* **2007**, 38(2), 674–676.
- [140] W. Scheper, J. J. M. Hoozemans, *Curr. Med. Chem.* **2009**, 16(5), 615–626.
- [141] M. W. Ronellenfitsch, D. P. Brucker, M. C. Burger, S. Wolking, F. Tritschler, J. Rieger, W. Wick, M. Weller, J. P. Steinbach, *Brain* **2009**, 132(6), 1509–1522.
- [142] P. Spilman, N. Podlutskaya, M. J. Hart, J. Debnath, O. Gorostiza, D. Bredesen, A. Richardson, R. Strong, V. Galvan, P. F. Ferrari, *PLoS ONE* **2010**, 5(4), e9979.
- [143] D. E. Harrison, R. Strong, Z. D. Sharp, J. F. Nelson, C. M. Astle, K. Flurkey, N. L. Nadon, J. E. Wilkinson, K. Frenkel, C. S. Carter, M. Pahor, M. A. Javors, E. Fernandez, R. A. Miller, *Nature* **2009**, 460(7253), 392–395.
- [144] C. Buerger, B. DeVries, V. Stambolic, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 344(3), 869–880.
- [145] A. B. Hanker, N. Mitin, R. S. Wilder, E. P. Henske, F. Tamanoi, A. D. Cox, C. J. Der, *Oncogene* **2009**, 29(3), 380–391.
- [146] J. Urano, A. P. Tabancay, W. Yang, F. Tamanoi, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275(15), 11198–11206.
- [147] W. Yang, A. P. Tabancay, J. Urano, F. Tamanoi, *Mol. Microbiol.* **2001**, 41(6), 1339–1347.
- [148] A. R. Tee, B. D. Manning, P. P. Roux, L. C. Cantley, J. Blenis, *Curr. Biol.* **2003**, 13(15), 1259–1268.
- [149] A. F. Castro, J. F. Rebhun, G. J. Clark, L. A. Quilliam, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278(35), 32493–32496.

- 
- [150] B. K. Law, P. Norgaard, L. Gnudi, B. B. Kahn, H. S. Poulson, H. L. Moses, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274(8), 4743–4748.
- [151] M. Fokkens, T. Schrader, F.-G. Klärner, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(41), 14415–14421.
- [152] A. Attar, W.-T. C. Chan, F.-G. Klärner, T. Schrader, G. Bitan, *BMC Pharmacol. Toxicol.* **2014**, 15, 23.
- [153] S. Sinha, D. H. J. Lopes, G. Bitan, *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, 3(6), 473–481.
- [154] A. Attar, G. Bitan, *Curr. Pharm. Des.* **2014**, 20(15), 2469–2483.
- [155] A. Attar, C. Ripoli, E. Riccardi, P. Maiti, Li Puma, D. D., T. Liu, J. Hayes, M. R. Jones, K. Lichti-Kaiser, F. Yang, G. D. Gale, C.-H. Tseng, M. Tan, C.-W. Xie, J. L. Straudinger, F.-G. Klarner, T. Schrader, S. A. Frautschy, C. Grassi, G. Bitan, *Brain* **2012**, 135(Pt 12), 3735–3748.
- [156] S. Prabhudesai, S. Sinha, A. Attar, A. Kotagiri, A. G. Fitzmaurice, R. Lakshmanan, R. Lakshmanan, M. I. Ivanova, J. A. Loo, F.-G. Klärner, T. Schrader, M. Stahl, G. Bitan, J. M. Bronstein, *Neurotherapeutics* **2012**, 9(2), 464–476.
- [157] G. Lambeau, M. H. Gelb, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, 77, 495–520.
- [158] D. Scott, Z. Otwinowski, M. Gelb, P. Sigler, *Science* **1990**, 250(4987), 1563–1566.
- [159] J. P. Nicolas, Y. Lin, G. Lambeau, F. Ghomashchi, M. Lazdunski, M. H. Gelb, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272(11), 7173–7181.
- [160] G. Lambeau, M. Lazdunski, *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, 20(4), 162–170.
- [161] S. A. Tatulian, *Biophys. J.* **2001**, 80(2), 789–800.
- [162] W. Burack, R. L. Biltonen, *Chem. Phys. Lipids* **1994**, 73(1-2), 209–222.
- [163] E. A. Dennis, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269(18), 13057–13060.
- [164] D. A. Six, E. A. Dennis, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids* **2000**, 1488(1-2), 1–19.

- [165] E. A. Dennis, S. G. Rhee, M. M. Billah, Y. A. Hannun, *FASEB J.* **1991**, *5*(7), 2068–2077.
- [166] Y. Zhang, J. Lemasters, B. Herman, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*(39), 27726–27733.
- [167] X. D. Qu, R. I. Lehrer, *Infect. Immun.* **1998**, *66*(6), 2791–2797.
- [168] A. N. Fonteh, D. A. Bass, L. A. Marshall, M. Seeds, J. M. Samet, F. H. Chilton, *J. Immunol.* **1994**, *152*(11), 5438–5446.
- [169] H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, Zipursky, L. Darnell, J., *Molecular Cell Biology*, 5. Aufl., W. H. Freeman & Co Ltd, New York, NY, **2003**.
- [170] G. S. Belinsky, T. V. Rajan, E. A. Saria, C. Giardina, D. W. Rosenberg, *Mol. Carcinog.* **2007**, *46*(2), 106–116.
- [171] Z. Dong, Y. Liu, K. F. Scott, L. Levin, K. Gaitonde, R. B. Bracken, B. Burke, Q. J. Zhai, J. Wang, L. Oleksowicz, S. Lu, *Carcinogenesis* **2010**, *31*(11), 1948–1955.
- [172] E. Kupert, M. Anderson, Y. Liu, P. Succop, L. Levin, J. Wang, K. Wikenheiser-brokamp, P. Chen, S. M. Pinney, T. Macdonald, Z. Dong, S. Starnes, S. Lu, *BMC Cancer* **2011**, *11*(1), 513.
- [173] E. A. Dennis, J. Cao, Y.-H. Hsu, V. Magrioti, G. Kokotos, *Chem. Rev.* **2011**, *111*(10), 6130–6185.
- [174] J. A. Jackman, N.-J. Cho, R. S. Duran, C. W. Frank, *Langmuir* **2010**, *26*(6), 4103–4112.
- [175] J. E. Burke, E. A. Dennis, *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2009**, *23*(1), 49–59.
- [176] M. H. Gelb, M. K. Jain, A. M. Hanel, O. G. Berg, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 653–688.

- 
- [177] O. G. Mouritsen, T. L. Andresen, A. Halperin, P. L. Hansen, A. F. Jakobsen, U. B. Jensen, M. Ø. Jensen, K. Jørgensen, T. Kaasgaard, C. Leidy, A. C. Simonsen, G. H. Peters, M. Weiss, *J. Phys. Condens. Matter* **2006**, *18*(28), S1293–S1304.
- [178] F. Zhou, K. Schulten, *Proteins* **1996**, *25*(1), 12–27.
- [179] S. A. Tatulian, R. L. Biltonen, L. K. Tamm, *J. Mol. Biol.* **1997**, *268*(5), 809–815.
- [180] M. H. Gelb, W. Cho, D. C. Wilton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*(4), 428–432.
- [181] R. K. Arni, R. J. Ward, *Toxicon* **1996**, *34*(8), 827–841.
- [182] J. G. Bollinger, K. Diraviyam, F. Ghomashchi, D. Murray, M. H. Gelb, *Biochemistry* **2004**, *43*(42), 13293–13304.
- [183] O. G. Berg, M. H. Gelb, M. D. Tsai, M. K. Jain, *Chem. Rev.* **2001**, *101*(9), 2613–2654.
- [184] F. Ghomashchi, Y. Lin, M. S. Hixon, B. Z. Yu, R. Annand, M. K. Jain, M. H. Gelb, *Biochemistry* **1998**, *37*(19), 6697–6710.
- [185] A. H. Pande, S. Qin, K. N. Nemec, X. He, S. A. Tatulian, *Biochemistry* **2006**, *45*(41), 12436–12447.
- [186] O. G. Berg, B. Z. Yu, J. Rogers, M. K. Jain, *Biochemistry* **1991**, *30*(29), 7283–7297.
- [187] M. K. Jain, J. Rogers, D. V. Jahagirdar, J. F. Marecek, F. Ramirez, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1986**, *860*(3), 435–447.
- [188] F. Ghomashchi, B. Z. Yu, O. Berg, M. K. Jain, M. H. Gelb, *Biochemistry* **1991**, *30*(29), 7318–7329.
- [189] D. L. Scott, S. P. White, Z. Otwinowski, W. Yuan, M. H. Gelb, P. B. Sigler, *Science* **1990**, *250*(4987), 1541–1546.
- [190] J. Rogers, B. Z. Yu, S. V. Serves, G. M. Tsivgoulis, D. N. Sotiropoulos, P. V. Ioannou, M. K. Jain, *Biochemistry* **1996**, *35*(29), 9375–9384.

- [191] S. H. Edwards, D. Thompson, S. F. Baker, S. P. Wood, D. C. Wilton, *Biochemistry* **2002**, *41*(52), 15468–15476.
- [192] K. Weise, S. Kapoor, C. Denter, J. Nikolaus, N. Opitz, S. Koch, G. Triola, A. Herrmann, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*(4), 880–887.
- [193] Instructions 71-5016-96 AM GSTrap™ FF 1 ml and 5 ml, [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc71501696\\_20140515224403.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc71501696_20140515224403.pdf), **27.05.2016**.
- [194] P. Bouguer, *Essai d'optique, Sur la gradation de la lumière*, 1. Aufl., Claude Jombert, Paris, **1729**.
- [195] J. H. Lambert, *Photometria sive De mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae*, 1. Aufl., E. Klett, Augustae Vindelicorum (Augsburg), **1760**.
- [196] A. Beer, *Ann. Phys.* **1852**, *162*(5), 78–88.
- [197] GTP-binding protein Rheb, <http://www.signaling-gateway.org/molecule/query?afcsid=A007526>, **05.06.2016**.
- [198] A. I. Magee, T. Wileman, *Protein targeting: a practical approach*, spi (september 1992) Aufl., IRL Press at Oxford University Press, Oxford, NY, **1992**.
- [199] C. Bordier, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*(4), 1604–1607.
- [200] M. Kahms, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Bochum, **2004**.
- [201] M. Wagner, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Bochum, **2003**.
- [202] Markos Pechlivanis, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Bochum, **2007**.
- [203] Dr. K. Weise, persönliche Labormitschriften, Physikalische Chemie I, Technische Universität Dortmund, **2016**.
- [204] Instructions 71-5017-50 AH HiTrap™ Benzamidine FF (high sub) 1 ml and 5 ml, [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc71501750\\_20140515224403.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc71501750_20140515224403.pdf), **27.05.2016**.

---

20Content/Files/1314723116657/litdoc71501750\_20140515224212.pdf,  
**27.05.2016.**

- [205] U. K. Laemmler, *Nature* **1970**, 227(5259), 680–685.
- [206] GE Healthcare, *Biacore 3000 Instrument Handbook*, version ag Aufl., **2003**.
- [207] S. Löfås, *Assay Drug Dev. Technol.* **2004**, 2(4), 407–416.
- [208] R. Rich, D. Myszka, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, 11(1), 54–61.
- [209] Biacore Technology Note BR-9001-15 **2001**.
- [210] J. A. Marquart, SPRpages home, <http://www.sprpages.nl/>, **22.02.2016**.
- [211] K. L. Späte, Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen, Göttingen, **2007**.
- [212] F. M. Mirabella, N. J. Harrick, *Internal reflection spectroscopy: Review and supplement*, 1. Aufl., Harrick Scientific Corp, Ossining, NY, **1985**.
- [213] J. Davies, *Surface analytical techniques for probing biomaterial processes*, 1. Aufl., CRC series in chemistry and physics of surfaces and interfaces, CRC Press, Boca Raton, FL, **1996**.
- [214] A. Gohlke, Dissertation, Technische Universität Dortmund, Dortmund, **2010**.
- [215] R. B. M. Schasfoort, A. J. Tudos, *Handbook of surface plasmon resonance*, 1. Aufl., Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2008**.
- [216] D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.* **1999**, 12(5), 279–284.
- [217] R. P. Feynman, *Eng. Sci.* **1960**, 23(5), 22–36.
- [218] R. Jansen, Dissertation, Technische Universität Dortmund, Dortmund, **2005**.
- [219] G. Binnig, H. Rohrer, *Helv. Phys. Acta* **1982**, 55(6), 726–735.
- [220] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel, *Phys. Rev. Lett.* **1982**, 49(1), 57–61.

- [221] The Nobel Prize in Physics 1989, *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014, [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/1986/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1986/), **07.02.2016**.
- [222] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*(9), 930–933.
- [223] D. L. Worcester, R. G. Miller, P. J. Bryant, *J. Microsc.* **1988**, *152*(Pt 3), 817–821.
- [224] D. J. Müller, F. A. Schabert, G. Büldt, A. Engel, *Biophys. J.* **1995**, *68*(5), 1681–1686.
- [225] S. Singh, D. J. Keller, *Biophys. J.* **1991**, *60*(6), 1401–1410.
- [226] A. L. Weisenhorn, P. K. Hansma, T. R. Albrecht, C. F. Quate, *Appl. Phys. Lett.* **1989**, *54*(26), 2651–2653.
- [227] H.-J. Butt, *Biophys. J.* **1991**, *60*(6), 1438–1444.
- [228] S. M. Lindsay, L. A. Nagahara, T. Thundat, U. Knipping, R. L. Rill, B. Drake, C. B. Prater, A. L. Weisenhorn, S. A. Gould, P. K. Hansma, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989**, *7*(2), 279–287.
- [229] M. N. Murray, H. G. Hansma, M. Bezanilla, T. Sano, D. F. Ogletree, W. Kolbe, C. L. Smith, C. R. Cantor, S. Spengler, P. K. Hansma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*(9), 3811–3814.
- [230] H. G. Hansma, M. Bezanilla, F. Zenhausern, M. Adrian, R. L. Sinsheimer, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*(3), 505–512.
- [231] B. Drake, C. B. Prater, A. L. Weisenhorn, S. A. Gould, T. R. Albrecht, C. F. Quate, D. S. Cannell, H. G. Hansma, P. K. Hansma, *Science* **1989**, *243*(4898), 1586–1589.
- [232] D. M. Eigler, E. K. Schweizer, *Nature* **1990**, *344*(6266), 524–526.
- [233] E. Betzig, J. K. Trautman, R. Wolfe, E. M. Gyorgy, P. L. Finn, M. H. Kryder, C.-H. Chang, *Appl. Phys. Lett.* **1992**, *61*(2), 142–144.

- 
- [234] C. Richter, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, **2003**.
- [235] A. H. Ostadrahimi, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, **20002**.
- [236] R. Chelkowski, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Bochum, **2008**.
- [237] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden der biophysikalischen Chemie*, 2. überarb. und erw. Aufl., Vieweg + Teubner, Wiesbaden, **2011**.
- [238] J. M. Balthazar, A. M. Tusset, A. M. Bueno, B. R. de Pontes Junior, *On an Overview of Nonlinear and Chaotic Behavior and Their Controls of an Atomic Force Microscopy (AFM) Vibrating Problem*, INTECH Open Access Publisher, **2012**.
- [239] E. R. Schnell, Dissertation, Universität Regensburg, Regensburg, **2002**.
- [240] F. J. Espinoza-Beltrán, K. Geng, J. Muñoz Saldaña, U. Rabe, S. Hirsekorn, W. Arnold, *New J. Phys.* **2009**, *11*(8), 083034.
- [241] A. Hommes, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, **2010**.
- [242] D. Sarid, *Scanning force microscopy: With applications to electric, magnetic, and atomic forces*, 2. Aufl., Bd. 5 von *Oxford series in optical and imaging sciences*, Oxford University Press, New York, NY, **1994**.
- [243] S. N. Magonov, M.-H. Whangbo, *Surface analysis with STM and AFM: Experimental and theoretical aspects of image analysis*, 1. Aufl., VCH, Weinheim, **1996**.
- [244] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*, 3. Aufl., Academic Press, Burlington, MA, **2011**.
- [245] C. Czeslik, H. Seemann, R. Winter, *Basiswissen physikalische Chemie*, 4. aktualisierte Aufl., Vieweg + Teubner, Wiesbaden, **2010**.
- [246] D. Sarid, *J. Vac. Sci. Technol. B* **1991**, *9*(2), 431.

- [247] P. Müller, *Pure Appl. Chem.* **1994**, 66(5), 1077–1184.
- [248] H. C. Hamaker, *Physica* **1937**, 4(10), 1058–1072.
- [249] F. J. Giessibl, *Phys. Rev. B Condens. Matter* **1997**, 56(24), 16010–16015.
- [250] P. W. Hawkes, *Advances in Electronics and Electron Physics: Fundamentals and Special Applications of Noncontact Scanning Force Microscopy*, 1. Aufl., Bd. 87, Elsevier, Amsterdam, **1993**.
- [251] D. J. Müller, D. Fotiadis, S. Scheuring, S. A. Müller, A. Engel, *Biophys. J.* **1999**, 76(2), 1101–1111.
- [252] R. C. Barrett, C. F. Quate, *J. Appl. Phys.* **1991**, 70(5), 2725–2733.
- [253] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Aufl., Springer Science+Business Media, LLC, Boston, MA, **2006**.
- [254] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 1. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [255] S. Grabowski, Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Düsseldorf, **2013**.
- [256] C. Lumme, Dissertation, Technische Universität München, München, **2012**.
- [257] F. Evers, C. Jeworrek, K. Weise, M. Tolan, R. Winter, *Soft Matter* **2012**, 8(7), 2170–2175.
- [258] A. Vogel, J. Nikolaus, K. Weise, G. Triola, H. Waldmann, R. Winter, A. Herrmann, D. Huster, *Biol. Chem.* **2014**, 395(7-8), 779–789.
- [259] A. Vogel, G. Reuther, K. Weise, G. Triola, J. Nikolaus, K.-T. Tan, C. Nowak, A. Herrmann, H. Waldmann, R. Winter, D. Huster, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48(46), 8784–8787.
- [260] B. Sperlich, S. Kapoor, H. Waldmann, R. Winter, K. Weise, *Biophys. J.* **2016**, accepted.

- 
- [261] Y.-X. Chen, S. Koch, K. Uhlenbrock, K. Weise, D. Das, L. Gremer, L. Brunsveld, A. Wittinghofer, R. Winter, G. Triola, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*(35), 6090–6095.
- [262] R. J. Green, R. A. Frazier, K. M. Shakesheff, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J. Tendler, *Biomaterials* **2000**, *21*(18), 1823–1835.
- [263] H. Mozsolits, W. G. Thomas, M.-I. Aguilar, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*(2), 77–89.
- [264] M. Besenicar, P. Macek, J. H. Lakey, G. Anderluh, *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *141*(1-2), 169–178.
- [265] S. Kapoor, K. Weise, M. Ernkamp, G. Triola, H. Waldmann, R. Winter, *Eur. Biophys. J.* **2012**, *41*(10), 801–813.
- [266] S. Kapoor, G. Triola, I. R. Vetter, M. Ernkamp, H. Waldmann, R. Winter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*(2), 460–465.
- [267] R. L. Kincaid, M. Vaughan, J. C. J. Osborne, V. A. Tkachuk, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*(18), 10638–10643.
- [268] Y. Yao, C. Schoneich, T. C. Squier, *Biochemistry* **1994**, *33*(25), 7797–7810.
- [269] S. R. Anderson, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*(18), 11405–11408.
- [270] A. Werkmüller, G. Triola, H. Waldmann, R. Winter, *Chemphyschem* **2013**, *14*(16), 3698–3705.
- [271] J. Kim, T. Shishido, X. Jiang, A. Aderem, S. McLaughlin, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*(45), 28214–28219.
- [272] S. McLaughlin, D. Murray, *Nature* **2005**, *438*(7068), 605–611.
- [273] M. Bosch, J. Gil, O. Bachs, N. Agell, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*(34), 22145–22150.
- [274] P. Villalonga, C. Lopez-Alcala, M. Bosch, A. Chiloeches, N. Rocamora, J. Gil, R. Marais, C. J. Marshall, O. Bachs, N. Agell, *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*(21), 7345–7354.

- [275] M. Fivaz, T. Meyer, *J. Cell Biol.* **2005**, *170*(3), 429–441.
- [276] M.-T. Wang, M. Holderfield, J. Galeas, R. Delrosario, M. D. To, A. Balmain, F. McCormick, *Cell* **2015**, *163*(5), 1237–1251.
- [277] R. S. Sidhu, R. R. Clough, R. P. Bhullar, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *304*(4), 655–660.
- [278] P. Bhagatji, R. Leventis, R. Rich, C.-j. Lin, J. R. Silvius, *Biophys. J.* **2010**, *99*(10), 3327–3335.
- [279] S. J. Abraham, R. P. Nolet, R. J. Calvert, L. M. Anderson, V. Gaponenko, *Biochemistry* **2009**, *48*(32), 7575–7583.
- [280] L.-J. Wu, L.-R. Xu, J.-M. Liao, J. Chen, Y. Liang, P. Kursula, *PLoS ONE* **2011**, *6*(7), e21929.
- [281] C. Lopez-Alcala, B. Alvarez-Moya, P. Villalonga, M. Calvo, O. Bachs, N. Agell, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*(16), 10621–10631.
- [282] M. Matsubara, T. Nakatsu, H. Kato, H. Taniguchi, *EMBO J.* **2004**, *23*(4), 712–718.
- [283] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*(1), 33–38.
- [284] S. J. Plowman, C. Muncke, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*(43), 15500–15505.
- [285] M. Schmick, N. Vartak, B. Papke, M. Kovacevic, D. C. Truxius, L. Rossmannek, P. I. H. Bastiaens, *Cell* **2014**, *157*(2), 459–471.
- [286] M. Schmick, A. Kraemer, P. I. H. Bastiaens, *Trends Cell Biol.* **2015**, *25*(4), 190–197.
- [287] C. Nicolini, J. Baranski, S. Schlummer, J. Palomo, M. Lumbierres-Burgues, M. Kahms, J. Kuhlmann, S. Sanchez, E. Gratton, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*(1), 192–201.

- 
- [288] K. Weise, D. Huster, S. Kapoor, G. Triola, H. Waldmann, R. Winter, *Faraday Discuss.* **2013**, *161*, 549–561.
- [289] M. C. Blosser, J. B. Starr, C. W. Turtle, J. Ashcraft, S. L. Keller, *Biophys. J.* **2013**, *104*(12), 2629–2638.
- [290] R. Leventis, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1998**, *37*(20), 7640–7648.
- [291] Y. Zhou, H. Liang, T. Rodkey, N. Ariotti, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34*(5), 862–876.
- [292] T. Yeung, G. E. Gilbert, J. Shi, J. Silvius, A. Kapus, S. Grinstein, *Science* **2008**, *319*(5860), 210–213.
- [293] N. Erwin, B. Sperlich, G. Garivet, H. Waldmann, K. Weise, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*(13), 8954–8962.
- [294] L. Janosi, A. A. Gorfe, *Biophys. J.* **2010**, *99*(11), 3666–3674.
- [295] J. Güldenhaupt, T. Rudack, P. Bachler, D. Mann, G. Triola, H. Waldmann, C. Kötting, K. Gerwert, *Biophys. J.* **2012**, *103*(7), 1585–1593.
- [296] J. Seeliger, N. Erwin, C. Rosin, M. Kahse, K. Weise, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*(11), 7507–7513.
- [297] Y. Zhou, J. F. Hancock, *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1853*(4), 841–849.
- [298] C. Tanford, *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*, 2. Aufl., Wiley-Interscience, New York, NY, **1991**.
- [299] M. O. Jensen, O. G. Mouritsen, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1666*(1-2), 205–226.
- [300] C. T. Pool, T. E. Thompson, *Biochemistry* **1998**, *37*(28), 10246–10255.
- [301] A. Penk, M. Muller, H. A. Scheidt, D. Langosch, D. Huster, *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*(3), 784–791.
- [302] J. R. Silvius, F. l’Heureux, *Biochemistry* **1994**, *33*(10), 3014–3022.

- [303] L. Brunsveld, H. Waldmann, D. Huster, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2009**, 1788(1), 273–288.
- [304] J. R. Silvius, *Curr. Top. Membr.* **2002**, 52, 371–395.
- [305] H. A. Scheidt, J. Klingler, D. Huster, S. Keller, *Biophys. J.* **2015**, 109(3), 586–594.
- [306] D. Marsh, *Biophys. J.* **2008**, 94(10), 3996–4013.
- [307] S. McLaughlin, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1989**, 18, 113–136.
- [308] M. Kosloff, E. Alexov, V. Y. Arshavsky, B. Honig, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283(45), 31197–31207.
- [309] J. Seelig, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1666(1-2), 40–50.
- [310] Z. Li, A. A. Gorfe, *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118(30), 9028–9036.
- [311] P. I. Kuzmin, S. A. Akimov, Y. A. Chizmadzhev, J. Zimmerberg, F. S. Cohen, *Biophys. J.* **2005**, 88(2), 1120–1133.
- [312] A. J. Garcia-Saez, S. Chiantia, P. Schwille, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282(46), 33537–33544.
- [313] T. Baumgart, A. T. Hammond, P. Sengupta, S. T. Hess, D. A. Holowka, B. A. Baird, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104(9), 3165–3170.
- [314] S. Semrau, T. Schmidt, *Soft Matter* **2009**, 5(17), 3174–3186.
- [315] L. V. Schäfer, S. J. Marrink, *Biophys. J.* **2010**, 99(12), L91–L93.
- [316] H. Li, A. A. Gorfe, *PLoS ONE* **2013**, 8(7), e71018.
- [317] A. Dehghan, K. A. Pastor, A.-C. Shi, *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **2015**, 91(2), 022713.
- [318] R. G. Parton, J. F. Hancock, *Trends Cell Biol.* **2004**, 14(3), 141–147.
- [319] K.-J. Cho, J. F. Hancock, *Small GTPases* **2013**, 4(1), 57–60.

- 
- [320] O. G. Mouritsen, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2010**, 1798(7), 1286–1288.
- [321] E. Lump, L. M. Castellano, C. Meier, J. Seeliger, N. Erwin, B. Sperlich, C. M. Stürzel, S. Usmani, R. M. Hammond, J. v. Einem, G. Gerold, F. Kreppel, K. Bravo-Rodriguez, T. Pietschmann, V. M. Holmes, D. Palesch, O. Zirafi, D. Weissman, A. Sowislok, B. Wettig, C. Heid, F. Kirchhoff, T. Weil, F.-G. Klärner, T. Schrader, G. Bitan, E. Sanchez-Garcia, R. Winter, J. Shorter, J. Münch, *Elife* **2015**, 4, 10727.
- [322] S. Suladze, S. Cinar, B. Sperlich, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137(39), 12588–12596.
- [323] A. C. Simonsen, *Biophys. J.* **2008**, 94(10), 3966–3975.
- [324] M. Bulmahn, R. Kickuth, *Alles Repetitio - oder was??? fragt der Bachelor die Laborantin*, Agentur und Verl. Rubikon, Gaiberg bei Heidelberg, **2005**.
- [325] S. L. Gantt, N. B. Valentine, A. J. Saenz, M. T. Kingsley, K. L. Wahl, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, 10(11), 1131–1137.
- [326] H. Rehm, T. Letzel, *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics*, 6. Aufl., Der Experimentator, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, **2010**.
- [327] S. D. Black, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 186(3), 1437–1442.
- [328] L. E. G. de la Vara, B. L. Alfaro, *Anal. Biochem.* **2009**, 387(2), 280–286.
- [329] B. Javid, P. A. MacAry, P. J. Lehner, *J. Immunol.* **2007**, 179(4), 2035–2040.
- [330] B. S. Bhatnagar, R. H. Bogner, M. J. Pikal, *Pharm. Dev. Technol.* **2008**, 12(5), 505–523.
- [331] J. D. Hasday, I. S. Singh, *Cell Stress Chaperones* **2000**, 5(5), 471–480.
- [332] H. R. Pelham, *Cell* **1986**, 46(7), 959–961.
- [333] U. Jakob, M. Gaestel, K. Engel, J. Buchner, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268(3), 1517–1520.

- [334] Y. Sun, T. H. MacRae, *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, 62(21), 2460–2476.
- [335] L. E. Hightower, *Cell* **1991**, 66(2), 191–197.
- [336] R. I. Morimoto, A. Tissières, C. Georgopoulos, *The Biology of heat shock proteins and molecular chaperones*, 1. Aufl., Bd. 26 von *Cold Spring Harbor monograph series*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, **1994**.
- [337] J. P. Hendrick, F. Hartl, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, 62(1), 349–384.
- [338] E. A. Craig, J. S. Weissman, A. L. Horwich, *Cell* **1994**, 78(3), 365–372.
- [339] C. M. Dobson, *Nature* **2003**, 426(6968), 884–890.
- [340] M. Stefani, C. M. Dobson, *J. Mol. Med.* **2003**, 81(11), 678–699.
- [341] M. J. Schlesinger, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265(21), 12111–12114.
- [342] F. Baneyx, M. Mujacic, *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22(11), 1399–1408.
- [343] P. M. Kane, C. T. Yamashiro, D. F. Wolczyk, N. Neff, M. Goebel, T. H. Stevens, *Science* **1990**, 250(4981), 651–657.
- [344] R. Hirata, Y. Ohsumi, A. Nakano, H. Kawasaki, K. Suzuki, Y. Anraku, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265(12), 6726–6733.
- [345] Impact-TWIN Manual E6950-708, <https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/4A37CBDBFD964EF9B6167DCE275D40F9/Datacards%20or%20Manuals/Impact-TWIN%20Manual%20E6950-708.pdf>, **27.05.2016**.
- [346] H. Paulus, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27(6), 375.
- [347] M. Kawasaki, Y. Satow, Y. Ohya, Y. Anraku, *FEBS Lett.* **1997**, 412(3), 518–520.
- [348] M. Q. Xu, M. W. Southworth, F. B. Mersha, L. J. Hornstra, F. B. Perler, *Cell* **1993**, 75(7), 1371–1377.
- [349] A. Watzke, Dissertation, TU Dortmund, Dortmund, **2005**.
- [350] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72(1), 249–289.

- 
- [351] G. J. Cotton, B. Ayers, R. Xu, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*(5), 1100–1101.
- [352] G. J. Cotton, T. W. Muir, *Chem. Biol.* **2000**, *7*(4), 253–261.
- [353] S. Chong, F. B. Mersha, D. G. Comb, M. E. Scott, D. Landry, L. M. Vence, F. B. Perler, J. Benner, R. B. Kucera, C. A. Hirvonen, J. J. Pelletier, H. Paulus, M. Q. Xu, *Gene* **1997**, *192*(2), 271–281.
- [354] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*(6766), 223–226.



# Veröffentlichungen

## Publikationen

- [1] **Sperlich, B.**, Kapoor, S., Waldmann, H., Winter, R. & Weise, K. (2016) *Regulation of K-Ras4B membrane binding by calmodulin*, Biophys. J., accepted.
- [2] Erwin, N., **Sperlich, B.**, Garivet, G., Waldmann, H., Weise, K. & Winter, R. (2016) *Lipoprotein insertion into membranes of various complexity*, Phys. Chem. Chem. Phys. 18, 8954–8962.
- [3] Suladze, S., Cinar, S., **Sperlich, B.** & Winter, R. (2015) *Pressure Modulation of the Enzymatic Activity of Phospholipase A2, A Putative Membrane-Associated Pressure Sensor*, J. Am. Chem. Soc. 137, 12588–12596.
- [4] Lump, E., Castellano, L. M., Meier, C., Seeliger, J., Erwin, N., **Sperlich, B.**, Stürzel, C. M., Usmani, S., Hammond, R. M., Einem, J. von, Gerold, G., Kreppel, F., Bravo-Rodriguez, K., Pietschmann, T., Holmes, V. M., Palesch, D., Zirafi, O., Weissman, D., Sowislok, A., Wettig, B., Heid, C., Kirchhoff, F., Weil, T., Klärner, F.-G., Schrader, T., Bitan, G., Sanchez-Garcia, E., Winter, R., Shorter, J. & Münch, J. (2015) *A molecular tweezer antagonizes seminal amyloids and HIV infection*, eLife 4, 10727.

## Konferenzbeiträge

- [1] Summer School des SFB 642 (30. September - 02. Oktober 2013), Münster, Deutschland - **Vortrag**
  
- [2] Tagung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie (14. - 16. Mai 2015), Bochum, Deutschland - **Poster**
  
- [3] Summer School des SFB 642 (11. - 13. Mai 2015), Velen, Deutschland - **Poster**
  
- [4] *Biophysical Society Meeting* (7. - 11. Februar 2015), Baltimore, Maryland, USA - **Poster**
  
- [5] Tagung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie (29. - 31. Mai 2014), Hamburg, Deutschland - **Poster (Posterpreis)**
  
- [6] Tag der Chemie der Technischen Universität Dortmund (07. Februar 2014) Dortmund, Deutschland - **Poster**

# Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Name, Vorname  
(Surname, first name)

Matrikel-Nr.  
(Enrolment number)

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Ort, Datum  
(Place, date)

Unterschrift  
(Signature)

Titel der Dissertation:  
(Title of the thesis):

---

---

---

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.\*

**\*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.**

Ort, Datum  
(Place, date)

Unterschrift  
(Signature)