

Biophysikalische Einblicke in die Wechselwirkungen von lipidierten Signalproteinen mit Membranen und Regulatorproteinen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

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

vorgelegt von

Nelli Erwin

geboren am 12.02.1990 in Besch-Terek (Kirgisistan)

Dortmund

März 2018

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2014 bis Dezember 2017 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I (Biophysikalische Chemie) der Technischen Universität Dortmund unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Roland Winter angefertigt.

Eingereicht am 20. März 2018

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Juni 2018

Prüfungskommission:

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Winter

Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Rehage

Vorsitzende: Prof. Dr. S. Brakmann

Für meine geliebten Eltern und Patrick

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Zuallererst gilt mein ganz besonderer Dank **Prof. Dr. Roland Winter**, der mich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir die Möglichkeit gab, diese interdisziplinäre Arbeit anzufertigen. Durch seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und hilfreichen Anregungen hat er zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Seine Faszination und sein Enthusiasmus für die Forschung haben mich immer wieder motiviert, inspiriert und mir geholfen meine Ziele im Rahmen dieser Doktorarbeit zu erreichen. Darüber hinaus möchte ich mich für die zahlreichen Möglichkeiten bedanken, meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Konferenzen präsentieren zu dürfen.

Darüber hinaus gebührt mein besonderer Dank **Prof. Dr. Heinz Rehage** für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei den Mitgliedern meines *Thesis Advisory Committees* **Prof. Dr. Roger S. Goody** und **Dr. Yaowen Wu** bedanken, die nicht nur den Fortschritt meiner Doktorarbeit begutachtet haben, sondern auch bei Fragen immer mit Ihrem Wissen und Ihren Erfahrungen in der Synthese von Lipoproteinen zur Verfügung standen.

Als weiteres möchte ich mich bei der *International Max Planck Research School in Chemical and Molecular Biology* (IMPRS-CMB) für die Organisation vielfältiger Vorträge und Workshops sowie für die finanzielle Unterstützung bei internationalen Konferenzen bedanken. Dadurch konnte ich mich nicht nur auf wissenschaftlicher, sondern auch auf persönlicher Ebene weiterbilden. Ganz besonders möchte ich meinen Dank der Koordinatorin der IMPRS **Christa Hornemann** für ihre außergewöhnliche Unterstützung in jeglicher Hinsicht äußern.

Außerdem bin ich **Prof. Dr. Herbert Waldmann** und seiner Gruppe, vor allem **Dr. Tom Mejuch** und **Dr. Guillaume Garivet**, sehr dankbar für die fruchtbare Zusammenarbeit und großzügige Bereitstellung der lipidierten Peptide, Proteine und Inhibitoren, die einen sehr wichtigen Teil dieser Arbeit darstellen. Ich danke auch **Jens Warmers** für die Hilfestellung und Unterstützung bei den massenspektrometrischen Messungen. Bei **Prof. Dr. Thomas Schrader** und **Prof. Dr. Jan Münch** möchte ich mich außerdem für die interessante Zusammenarbeit an den molekularen Pinzetten bedanken. **Dr. Nick Brooks** bin ich sehr dankbar für die detaillierten

Pläne seiner Mikroskopie-Hochdruckzelle, den herzlichen Aufenthalt in seiner Arbeitsgruppe am Imperial College sowie die Beantwortung zahlreicher Fragen. Außerdem möchte ich mich herzlich bei Herrn **Holger Konopka** und den **Mitarbeitern der mechanischen Werkstatt** bedanken. Ohne die ergebnisreiche Zusammenarbeit wäre der Bau der Hochdruckzelle nicht möglich gewesen.

Für die gute Atmosphäre und Zusammenarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe möchte ich mich bei allen **ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern** des Lehrstuhls Physikalische Chemie I bedanken. Meiner Bürokollegin **Dr. Mimi Gao** sowie **Lei Li** und **Dr. Mridula Dwivedi** danke ich sehr für die hilfreichen Denkanstöße, die wissenschaftlichen und auch nicht-wissenschaftlichen Gespräche sowie für die motivierenden und aufbauenden Worte in den schwierigen Zeiten meiner Promotion. Außerdem gebührt mein besonderer Dank **Kathrin Estel** für die gemeinsamen amüsanten Aufenthalte bei nationalen und internationalen Tagungen.

Ein großes Dankeschön geht an **Andrea Jeworrek**, die immer eine große Hilfe bei bürokratischen und organisatorischen Angelegenheiten war. Bei **Simone Möbitz** möchte ich mich für die Unterstützung im S1-Labor und für die erfolgreichen Proteinexpressionen bedanken. Außerdem gilt mein Dank **Bertina Schuppan**, die mir durch ihre Hilfsbereitschaft das Arbeiten im Labor und Büro erleichtert hat.

Worte können nicht beschreiben, wie dankbar ich meinem Freund **Patrick Bolduan** bin. Er stand mir geduldig in jeder guten und schlechten Situation zur Seite und hat mir immer den nötigen Rückhalt gegeben. Danke, dass du mich in jeder Hinsicht unterstützt hast, mir immer aufmerksam zugehört hast und immer da warst, als ich dich brauchte.

Nicht zuletzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner **Familie** und meinen **Freunden** für ihre uneingeschränkte Unterstützung und die wohltuenden Ablenkungen zwischendurch. Sie haben mich während der gesamten Studienzeit motiviert, nicht aufzugeben und an mich zu glauben. Mein unbegrenzter Dank gilt **meinen Eltern**, die mir diesen Lebensweg ermöglicht haben und denen ich diese Arbeit widme.

Publikationen

Einige Ergebnisse, die in diese Arbeit vorgestellt werden, wurden bereits veröffentlicht:

N. Erwin^{*}, M. Dwivedi,^{*} T. Mejuch,^{*} H. Waldmann, R. Winter, *ChemBioChem*, **2018**, *akzeptiert*.

N. Erwin, S. Patra, M. Dwivedi, K. Weise, R. Winter, *Biol. Chem.* **2017**, *398*, 547-563.

N. Erwin, S. Patra, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 30020-30028.

N. Erwin^{*}, B. Sperlich,^{*} G. Garivet, H. Waldmann, K. Weise, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 8954-8962.

E. Lump, L. M. Castellano, C. Meier, J. Seeliger, N. Erwin, B. Sperlich, C. M. Stürzel, S. Usmani, R. M. Hammond, J. Von 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, and J. Münch, *elife* **2015**, *4*, e05397.

Weitere Veröffentlichungen, die während dieser Arbeit entstanden sind:

M. Gao, M. Berghaus, S. Möbitz, V. Schuabb, N. Erwin, M. Herzog, K. Julius, C. Sternemann, R. Winter, *Biophys. J.* **2018**, *114*, 1080-1090.

L. Li, M. Dwivedi, N. Erwin, S. Möbitz, P. Nussbaumer, R. Winter, *Biochim. Biophys. Acta* **2018**, *1860*, 1008-1014.

S. Patra, C. Anders, N. Erwin, R. Winter, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2017**, *56*, 5045-5049.

T. Q. Luong, N. Erwin, M. Neumann, A. Schmidt, C. Loos, V. Schmidt, M. Fändrich, R. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 12412-12416.

S. Patra, N. Erwin, R. Winter, *Chem. Phys. Chem* **2016**, *17*, 4164-2169.

^{*}geteilte Autorenschaft

J. Seeliger, N. Erwin, C. Rosin, M. Kahse, K. Weise, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 7507-7513.

S. Suladze, M. Kahse, N. Erwin, D. Tomazic, R. Winter, *Methods* **2015**, *76*, 67-77.

Kurzfassung

Die Übertragung von extrazellulären Signalen über die Plasmamembran durch die Aktivierung von Rezeptorproteinen sowie nachgeschalteten membranassoziierten und zytosolischen Proteinen stellt einen der wichtigsten Mechanismen für die Regulation biologischer Prozesse dar. Eine zentrale Rolle spielen dabei die lipidierten Src-Kinasen und Ras-Proteine, die das Signal von den aktivierten Rezeptorproteinen verstärken bzw. auf zytosolische Effektorproteine übertragen. Dadurch werden intrazelluläre Signalkaskaden eingeleitet, die unterschiedliche Prozesse in der Zelle steuern. Dies spiegelt jedoch gleichzeitig das onkogene Potential der lipidierten Signalproteine wider, da anormale Signaltransduktionen durch die Überexpression oder eine aktivierende Mutation in diesen Proteinen häufig im Zusammenhang mit Krebserkrankungen stehen. Da die Lokalisation der lipidierten Ras-Proteine und Src-Kinasen an der Plasmamembran essentiell für die Aktivität dieser Signalproteine ist, stellt die Inhibierung von deren Membranassoziation einen potentiellen Therapieansatz dar. Daher ist es von großer Bedeutung, die Interaktionen zwischen den Lipoproteinen und Membranen sowie die Regulation dieser Wechselwirkungen besser zu verstehen. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss physiologisch relevanter Faktoren, wie die Membranzusammensetzung und molekulare Chaperone, auf die Bindung und Lokalisation der lipidierten Proteine/Peptide an Membranen unter Verwendung verschiedener mikroskopischer und spektroskopischer Methoden untersucht.

Zunächst wurden hierfür mithilfe der *Expressed Protein Ligation* in Kombination mit einem synthetischen Lipopeptid präparative Mengen des posttranslational modifizierten K-Ras4B-Proteins in hoher Reinheit hergestellt. Die Interaktionsstudien von K-Ras4B mit phosphatidylserinhaltigen Modellmembranen und riesigen Plasmamembranvesikeln haben gezeigt, dass die selektive Lokalisation und charakteristische Clusterbildung von K-Ras4B in der flüssig-ungeordneten Lipiddomäne phasenseparierter Membransysteme weitestgehend unabhängig von der Membranzusammensetzung ist, was auf einen allgemeinen Prozess des membrangebundenen K-Ras4B-Proteins hindeutet. Im Gegensatz dazu wird die laterale Verteilung und Organisation von N-Ras in Membransystemen mit koexistierenden flüssig-geordneten und -ungeordneten Lipidphasen im Wesentlichen durch die Linienspannung an den Phasengrenzflächen, die in natürlichen Membranen klein ist, reguliert. Nach dem Einbau in die flüssig-ungeordnete Phase akkumuliert N-Ras an der Domänengrenze und bildet Cluster in dieser Region, wodurch die energetisch ungünstige Linienspannung reduziert wird.

Zudem wurden die Wechselwirkungen zwischen Calmodulin, das an der Dissoziation von K-Ras4B von der Plasmamembran beteiligt ist, und der hypervariablen Region von K-Ras4B untersucht, um neue Einblicke in die strukturellen Änderungen von Calmodulin zu erhalten. Dabei wurde gezeigt, dass sich die zentrale Helix von holo-Calmodulin teilweise entfaltet, was die Bildung eines globulären Komplexes bei der Bindung des farnesylierten und polybasischen Peptids ermöglicht. Darüber hinaus konnte mithilfe von Druck als milder Störparameter die Energielandschaft von Calmodulin unter dem Einfluss von Ca^{2+} und der hypervariablen Region von K-Ras4B genauer untersucht werden. Dabei konnten sowohl für apo- als auch holo-Calmodulin sowie für den holo-Calmodulin/K-Ras4B-Komplex partiell entfaltete und stärker solvatisierte Konformationssubzustände bei höheren Drücken entdeckt werden, die eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Bindung von Liganden sowie Zielproteinen spielen könnten. Zudem wurde gezeigt, dass die Ca^{2+} -Ionen bei höheren Drücken dissoziieren.

Des Weiteren konnte durch eine umfangreiche Kinetikstudie ein zweistufiger Membranbindungsprozess für die myristoylierte *N*-terminale Sequenz von c-Src festgestellt werden. Der erste Bindungsschritt umfasst sowohl die Bildung elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen Peptid und Membran sowie die Insertion des Myristoylankers in die Membran. Im Anschluss erfolgen laterale Umlagerungen des Peptids in der Membran, die schließlich in der Bildung von Peptid/Lipid-Clustern resultieren. Der molekulare Chaperon UNC119A konkurriert sowohl bei der Assoziation als auch bei der Dissoziation von Myr-Src mit der Membran, was darauf hindeutet, dass dieser molekulare Chaperon an dem Transfer von c-Src zwischen verschiedenen Membrankompartimenten der Zelle beteiligt ist. Schließlich konnte bestätigt werden, dass Squarunkin A die Wechselwirkung zwischen UNC119A und Myr-Src auch in Gegenwart von Membranen inhibiert.

In einer weiteren Studie wurde der Effekt der molekularen Pinzette CLR01, die nicht nur die Bildung von amyloiden Fibrillen inhibiert, sondern auch eine antivirale Wirkung aufweist, auf virale Modellmembranen untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass CLR01 durch Bindung an die phosphatidylcholinhaltigen Lipidkopfguppen in der äußeren Lipiddoppelschicht eine positive Krümmung in der dicht gepackten Lipidphase induziert und in Kombination mit der hohen Linienspannung an der Phasengrenzfläche zur Ausstülpung der flüssig-ungeordneten Domäne führt. In einer viralen Membranhülle mit einer komplexeren Lipid- und Proteinzusammensetzung könnte CLR01 eine vollständige Zerstörung verursachen.

Da Druck ein wichtiger physikalischer Parameter für die Untersuchung struktureller und dynamischer Änderungen in biologischen Systemen ist, wurde eine Hochdruckzelle für die Mikroskopie entwickelt, die bei höheren Temperaturen in einem Bereich von 0,1-100 MPa zur Visualisierung von Druckeffekten auf verschiedene biologische Systeme eingesetzt werden kann. Die Funktion dieser Hochdruckzelle wurde durch die beobachtete druckinduzierte Phasentrennung einer Membran mit bekannter Lipidmischung validiert.

Abstract

The transduction of extracellular signals across the plasma membrane via the activation of receptor proteins as well as membrane-associated and cytosolic downstream proteins is one of the most important mechanisms for the regulation of biological processes. The lipidated Src kinases and Ras proteins play a central role in signalling transduction by amplifying the signals from the activated receptor proteins and transmitting them to cytosolic effector proteins. In this way, intracellular signalling cascades are initiated, which regulate different processes in the cell. This reflects as well the oncogenic potential of the lipidated signalling proteins since aberrant signalling, caused by overexpression or an activating mutation in these proteins, is often associated with cancer. The plasma membrane localization of the lipidated Ras proteins and Src kinases is a critical parameter for their activity, thus blocking the membrane association of these signalling proteins would provide a potential therapeutic approach. Therefore, the interactions between the lipoproteins and membranes as well as the regulation of these interactions have to be better understood. To this end, the influence of physiologically relevant factors, such as membrane composition and molecular chaperones, was investigated on the membrane binding and localization of lipidated proteins/peptides by using various microscopic and spectroscopic techniques.

Initially, preparative amounts of posttranslationally modified K-Ras4B protein were prepared in high purity by using the expressed protein ligation in combination with a synthetic lipopeptide. The interaction studies of K-Ras4B in phosphatidylserine-containing model membranes and giant plasma membrane vesicles have demonstrated that the selective localization and characteristic clustering of K-Ras4B in the liquid-disordered domain of phase-separated membrane systems is largely independent of the membrane composition, suggesting a general process of membrane-associated K-Ras4B protein. In contrast, the lateral distribution and organization of N-Ras in membrane systems showing liquid-disordered/liquid-ordered phase coexistence is mainly regulated by the line tension at the lipid phase boundary, which was suggested to be low in natural membranes. After incorporation into the liquid-disordered phase, N-Ras accumulates at the domain boundary and forms clusters in this region, thereby reducing the energetically unfavourable line tension.

In addition, the interactions between calmodulin, which is involved in the dissociation of K-Ras4B from the plasma membrane, and the hypervariable region of K-Ras4B were

studied to gain new insights into the structural changes of calmodulin. It has been shown that the central helix of holo-calmodulin partially unfolds allowing the formation of a globular complex upon binding the farnesylated and polybasic peptide. Furthermore, using pressure as a mild perturbant, the energy landscape of calmodulin was further explored in the absence and presence of Ca^{2+} and the hypervariable region of K-Ras4B. For both apo- and holo-calmodulin as well as for the holo-calmodulin/K-Ras4B complex, conformational substates that were partially unfolded and more solvated have been revealed at higher pressures. These may play an important role in the recognition and binding of ligands and target proteins. Moreover, it was shown that the Ca^{2+} ions dissociate at higher pressures. Furthermore, a comprehensive kinetic study has revealed a two-step membrane binding process for the myristoylated *N*-terminal sequence of *c*-Src. The first binding step involves both the formation of electrostatic interactions between the peptide and the membrane as well as the insertion of the myristoyl anchor into the membrane. Subsequently, the peptide undergoes lateral rearrangements in the membrane, resulting in the formation of peptide-lipid clusters. The molecular chaperone UNC119A competes with both the association and dissociation step of the myristoylated peptide with the membrane, suggesting that UNC119A is involved in the transfer of the lipidated Src kinase between different membrane compartments in the cell. Finally, squarunkin A has been confirmed as a specific small-molecule inhibitor of the interaction between UNC119A and its myristoylated cargo even in the presence of membranes.

In a further study, the effect of the molecular tweezer CLR01, which is not only inhibiting the formation of amyloid fibrils but also having an antiviral activity, has been studied on viral model membranes. It has been shown that CLR01 induces a positive curvature in the densely packed lipid phases by binding to the phosphatidylcholine-containing lipid head groups in the outer lipid bilayer. Owing to the high line tension at the phase boundaries, the curvature of the membrane leads to budding of the liquid-ordered lipid phase. In a viral membrane envelope with a more complex lipid and protein composition, CLR01 could cause membrane rupture.

As pressure is an important physical parameter for studying structural and dynamic changes in biological systems, a high-pressure microscopy cell has been developed that can be used at higher temperatures in the range of 0.1-100 MPa in order to visualize pressure effects on various biological systems. The function of this high-pressure cell was validated by the observed pressure-induced phase separation of a membrane with a canonical raft-like lipid mixture.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	XI
Abstract	XIII
Abkürzungsverzeichnis	XIX
Abbildungsverzeichnis	XXV
Tabellenverzeichnis	XXIX
1 Einleitung	1
1.1 Natürliche Plasmamembran	2
1.1.1 Lipidzusammensetzung	2
1.1.2 Polymorphismus und Phasenverhalten von Lipidmembranen	4
1.1.3 Aktuelles Modell der Plasmamembran	6
1.2 Lipidmodifizierte Proteine in Signaltransduktionen	9
1.2.1 Lipidmodifikationen	10
1.2.2 Ras-Proteine	13
1.2.3 Src-Protein	16
1.2.4 Regulation der Membranbindung lipidierter Proteine	18
2 Zielsetzung	23
3 Semisyntese eines posttranslational modifizierten K-Ras4B-Proteins	25
3.1 Einleitung	25
3.2 Material & Methoden	28
3.2.1 Material	28
3.2.2 Proteinexpression und -reinigung	29
3.2.3 Fluoreszenzmarkierung	30
3.2.4 Peptidligation	31
3.2.5 Proteinanalytische Methoden	32
3.2.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	32
3.2.5.2 SDS-PAGE	33

3.2.5.3	MALDI-Tof-Massenspektrometrie	34
3.3	Ergebnisse & Diskussion	35
3.3.1	Expression und Reinigung von K-Ras4B Δ 15-Mesna	35
3.3.2	Fluoreszenzmarkierung von K-Ras4B Δ 15-Mesna	36
3.3.3	Ligation des K-Ras4B Δ 15-Proteins mit dem <i>C</i> -terminalen K-Ras4B-Dodecapeptid	38
3.4	Zusammenfassung	39
4	Ras-Proteine in Membranen unterschiedlicher Zusammensetzung	41
4.1	Einleitung	41
4.2	Material & Methoden	43
4.2.1	Material	43
4.2.2	Kultivierung der eukaryotischen Zelllinie RBL-2H3	44
4.2.3	Isolierung der GPMVs	45
4.2.4	Lipidextraktion	45
4.2.5	Bestimmung der Phospholipidkonzentration	46
4.2.6	Vesikelpräparation	47
4.2.6.1	Elektroformation	47
4.2.6.2	Milde Hydratation	48
4.2.7	Phasenkontrastmikroskopie	48
4.2.8	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	49
4.3	Ergebnisse & Diskussion	49
4.3.1	K-Ras4B in PS-haltigen Membranen	49
4.3.2	Ras-Proteine in GPMVs	52
4.3.3	Ras-Proteine in proteinfreien GUVs aus GPMV-Lipidextrakten	56
4.4	Zusammenfassung	59
5	Konformationssubzustände von Calmodulin	61
5.1	Einleitung	61
5.2	Material & Methoden	66
5.2.1	Material & Probenvorbereitung	66
5.2.2	Fluorescein-Markierung des K-Ras4B-Peptids	67
5.2.3	Hochdruck-FT-IR-Spektroskopie	67
5.2.4	RÖNTGEN-Kleinwinkelstreuung	69
5.2.5	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	69
5.3	Ergebnisse & Diskussion	72
5.3.1	Einfluss von Ca ²⁺ auf die druckabhängigen CS von CaM	72
5.3.2	Einfluss der K-Ras4B-HVR auf die druckabhängigen CS von CaM	80
5.4	Zusammenfassung	85

6	Einfluss von UNC119A auf den Membranbindungsprozess von c-Src	89
6.1	Einleitung	89
6.2	Material & Methoden	91
6.2.1	Material & Probenpräparation	91
6.2.2	<i>Stopped-flow</i> -Fluoreszenzspektroskopie	92
6.3	Ergebnisse & Diskussion	96
6.3.1	Bindungsmechanismus von c-Src an Membranen	96
6.3.2	Einfluss negativ geladener Lipide auf die Membranbindung von c-Src	99
6.3.3	Einfluss von l_d/l_o -Phasenkoexistenzen auf die Membranbindung von c-Src	101
6.3.4	Einfluss von UNC119A auf die Membranbindung von c-Src	104
6.3.5	Inhibierung der UNC119A/c-Src-Wechselwirkungen	107
6.4	Zusammenfassung	108
7	Einfluss molekularer Pinzetten auf virale Modellmembranen	111
7.1	Einleitung	111
7.2	Material & Methoden	113
7.2.1	Material	113
7.2.2	Elektroformation	113
7.2.3	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	114
7.3	Ergebnisse & Diskussion	114
7.3.1	Molekulare Pinzetten	114
7.3.2	Molekulare Phosphatklammer	119
7.4	Zusammenfassung	120
8	Entwicklung und Bau einer Hochdruckzelle für die Mikroskopie	123
8.1	Einleitung	123
8.2	Material & Methoden	125
8.2.1	Material	125
8.2.2	Agarosegel-unterstützte Bildung von GUVs	125
8.2.3	Fluoreszenzmikroskopie	126
8.3	Ergebnisse & Diskussion	127
8.3.1	Zellkörper	127
8.3.2	Fenster und Stempel	129
8.3.3	Dichtungen	130
8.3.4	Probenhalter	130
8.3.5	Mikroskopie-Hochdruckstudien an GUVs	130
8.4	Zusammenfassung	135
9	Fazit	137

Literaturverzeichnis	141
-----------------------------	------------

Anhang	A
---------------	----------

A	Weitere Abbildungen	A
A.1	Plasmidkarte	A
A.2	Fluoreszenzmarkierung mit Maleimid-funktionalisierten Fluorophoren	B
A.3	Bestimmung der Phospholipidkonzentration	C
A.4	FT-IR-Spektren	D
A.5	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen	F
B	Eidesstattliche Versicherung	G

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
a_w	Nicht-unterstützter Aperturradius
AFM	Rasterkraftmikroskopie (<i>atomic force microscopy</i>)
Ala	Alanin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BODIPY	Bordipyromethen
c	Konzentration
C	Krümmung
CaM	Calmodulin
CBD	Chitinbindende Domäne
CD	Circulardichroismus
CF ₂₈₀	Korrekturfaktor bei 280 nm (<i>correction factor</i>)
Chol	Cholesterol
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (<i>confocal laser scanning microscopy</i>)
CPP	Kritischer Packungsparameter
CS	Konformationssubzustand (<i>conformational substate</i>)
CVD	Chemische Gasphasenabscheidung (<i>chemical vapour deposition</i>)
Cys	Cystein
d	Schichtdicke der Küvette
D	Diffusionskoeffizient
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOL	Farbstoff-Protein-Verhältnis (<i>degree of labeling</i>)
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DOPG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol)
DOPS	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPG	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol)
DPPS	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin

DTE	1,4-Dithioerythritol
DTT	1,4-Dithiothreitol
E_{Biege}	Biegeenergie
E_{Bud}	Energie der ausstülpenden Domäne
E_{Grenze}	Grenzflächenenergie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EPL	<i>Expressed protein ligation</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Fluoreszenzsignal
$F(t)$	Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt t
Far	Farnesyl
FBS	Fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FCCS	Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie (<i>fluorescence cross-correlation spectroscopy</i>)
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>)
FLCS	Fluoreszenzlebensdauerkorrelationsspektroskopie (<i>fluorescence lifetime correlation spectroscopy</i>)
FRET	FÖRSTER-Resonanzenergietransfer
FT	FOURIER-Transform
FTase	Farnesyltransferase
FWHM	Halbwertsbreite (<i>Full width at half maximum</i>)
G	GIBBS-Energie
$G(\tau)$	Autokorrelationskurve
GAP	GTPase-aktivierendes Protein (<i>GTPase activating protein</i>)
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor (<i>guanine nucleotide dissociation inhibitors</i>)
GDF	<i>GDI displacement factor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	GTP-Austauschfaktor (<i>guanine exchange factor</i>)
GGTase	Geranylgeranyltransferase
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GPMV	Riesiges Plasmamembranvesikel (<i>giant plasma membrane vesicle</i>)
GppNHp	5-Guanylylimidodiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GUV	Riesiges unilamellares Vesikel (<i>giant unilamellar vesicle</i>)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure

Hh	Hedgehog
HVR	Hypervariable Region
I	Intensität des austretenden Lichts
I_0	Intensität des einfallenden Lichts
$I(q)$	Streuintensität
Icmt	Isoprenylcystein Carboxylmethyltransferase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie (<i>isothermal titration calorimetry</i>)
ITO	Indiumzinnoxid (<i>indium tin oxide</i>)
$J(\lambda)$	Spektrale Überlappung
k	Geschwindigkeitskonstante
K	Gleichgewichtskonstante
K_b	Bindungskonstante
K_d	Dissoziationskonstante
L_α	Flüssig-kristalline Lipidphase
L_β	Gelphase mit geneigten Fettsäureketten
L_c	Sub-Gelphase
l_d	Flüssig-ungeordnete (<i>liquid-disordered</i>) Lipidphase
l_o	Flüssig-geordnete (<i>liquid-ordered</i>) Lipidphase
LC3	<i>Light chain 3</i>
LUV	Großes unilamellares Vesikel (<i>large unilamellar vesicle</i>)
Lys	Lysin
MALDI-Tof	Matrix-Assistierte-Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalyse (<i>time of flight</i>)
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MD	Molekulardynamik
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
Mesna	Natrium-2-sulfanylethansulfonat
MIC	Maleimidocaproyl
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
Myr	Myristoyl
$\langle N \rangle$	Mittlere Teilchenzahl
n_b	Brechungsindex
N-Rh-DHPE	<i>N</i> -(Lissamine TM Rhodamin B sulfonyl)-1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
NA	Numerische Apertur
NBD-DHPE	<i>N</i> -(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
NCL	Native chemische Ligation
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid

NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
p	Druck
p_y	Fließdruck
$P(r)$	Abstandsverteilungsfunktion
P_β	Gelphase mit periodisch gewellter Überstruktur
PA	Phosphorsäure (<i>phosphatidic acid</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
pI	Isoelektrischer Punkt
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLC ϵ	Phospholipase C- ϵ
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMT	Sekundärelektronenvervielfacher (<i>photomultiplier tube</i>)
PTFE	Polytetrafluorethylen
PS	Phosphatidylserin
q	Wellenvektorübertrag
Q_d	Quantenausbeute des Donors
R	Gaskonstante
R_0	FÖRSTER-Radius
R_g	Gyrationsradius
Rab	<i>Ras-related in brain</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RBL	Basophile leukämische Rattenzellen (<i>rat basophilic leukemia</i>)
Rce1	<i>Ras and a-factor converting enzyme</i>
RE	Rezyklierendes Endosom (<i>recycling endosome</i>)
RhB	Rhodamin B
S	Ordnungsparameter
SANS	Neutronen-Kleinwinkelstreuung (<i>small angle neutron scattering</i>)
SAXS	RÖNTGEN-Kleinwinkelstreuung (<i>small angle X-ray scattering</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SFK	Familie der Src-Kinasen (<i>src family kinase</i>)
SH	Src-Homologie
Sinapinsäure	<i>trans</i> -3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure
SM	Sphingomyelin
s_o	Gelphase (<i>solid-ordered</i>)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
StBu	<i>S-tert</i> -Butyl

SV	Säulenvolumen
t	Zeit
T	Temperatur
t_w	Fensterdicke
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N' -Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
u	Verhältnis des äußeren und inneren Zylinderdurchmessers
UV	Ultraviolett
V	Volumen
α_i	Anteil
γ	Linienspannung
ε	Molarer Extinktionskoeffizient
θ	Halber Streuwinkel
θ_{Pep}	Anteil des gebundenen Peptids
κ	Orientierungsfaktor
κ_B	Biegemodul
κ_w	Strukturparameter
λ	Wellenlänge
σ_B	Bruchfestigkeit
$\sigma_{0,2}$	0,2 %-Dehngrenze
σ_B	Bruchfestigkeit
τ	Verzögerungszeit
τ_i	Diffusionszeit

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Struktureller Aufbau von Phospholipiden und Steroiden.	3
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung der lamellaren Lipidphasen in wässrigem Medium.	5
Abb. 1.3:	Modifizierte schematische Darstellung des Flüssig-Mosaik-Modells einer biologischen Membran.	8
Abb. 1.4:	Struktureller Überblick über einige Lipidmodifikationen in Membranproteinen.	10
Abb. 1.5:	Sequenzidentität, Struktur und Membrananker der Ras-Isoformen.	14
Abb. 1.6:	Ras-vermittelte Signalwege.	15
Abb. 1.7:	Struktur und Aktivierung von c-Src.	17
Abb. 3.1:	Mechanismus der Proteinspleißreaktion und der <i>Expressed Protein Ligation</i>	26
Abb. 3.2:	Semisyntese eines posttranslational modifizierten und fluoreszenzmarkierten K-Ras4B-Proteins.	36
Abb. 3.3:	Charakterisierung des isolierten K-Ras4B-Proteins nach der Expression, Fluoreszenzmarkierung und Ligation.	37
Abb. 4.1:	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Bilder von K-Ras4B in PS-haltigen Membranen.	51
Abb. 4.2:	Schematische Darstellung der GPMV-Isolierung und Lipidextraktion.	53
Abb. 4.3:	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Bilder von K-Ras4B in GPMVs.	54
Abb. 4.4:	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Bilder von N-Ras in GPMVs.	55
Abb. 4.5:	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Bilder von K-Ras4B in proteinfreien GUVs, hergestellt aus den extrahierten GPMV-Lipiden.	57
Abb. 4.6:	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Bilder von N-Ras in proteinfreien GUVs, hergestellt aus den extrahierten GPMV-Lipiden.	58
Abb. 5.1:	Schematische Darstellung der Konformationsänderungen von CaM bei der Bindung von Ca ²⁺	62
Abb. 5.2:	CaM im Komplex mit dem smMLCK-Peptid (mit einer kanonischen CaM-Bindungsdomäne) und dem myristoylierten CAP-23/NAP-22-Peptid.	64
Abb. 5.3:	Schematische Darstellung der Energielandschaft eines Proteinfaltungstrichters.	65

Abb. 5.4:	FT-IR-Absorptionsspektren von apo-CaM, holo-CaM und holo-CaM/K-Ras4B-Peptid und die 2. Ableitung dieser Spektren.	73
Abb. 5.5:	Druckabhängige Differenzspektren von apo- und holo-CaM.	74
Abb. 5.6:	2. Ableitung der druckabhängigen, puffer- und basislinienkorrigierten sowie flächennormierten FT-IR-Absorptionsspektren von apo- und holo-CaM.	75
Abb. 5.7:	Druckinduzierte Änderung der Sekundärstrukturelemente von apo- und holo-CaM.	76
Abb. 5.8:	Druckinduzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus holo-CaM.	78
Abb. 5.9:	Aus FCS-Messungen ermittelter Diffusionskoeffizient und mittlere Diffusionszeit der K-Ras4B-HVR in Gegenwart von CaM.	80
Abb. 5.10:	Aus den SAXS-Experimenten ermittelte Abstandsverteilungsfunktion für holo-CaM in Abwesenheit und in Gegenwart der K-Ras4B-HVR.	81
Abb. 5.11:	Druckabhängige FT-IR-spektroskopische Analyse von holo-CaM/K-Ras4B-Peptid.	83
Abb. 5.12:	Schematische Darstellung der CS von CaM in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} und dem K-Ras4B-Peptid als Bindungspartner unter dem Einfluss von Druck.	86
Abb. 6.1:	Chemische Struktur von Myr-Src, Kristallstruktur von UNC119A im Komplex mit dem myristoylierten NPHP3-Peptid und die chemische Struktur von Squarunkin A.	90
Abb. 6.2:	FRET-basierter Assay zur Untersuchung der Membranbindung von Myr-Src.	97
Abb. 6.3:	Assoziations- und Dissoziationsexperimente von Myr-Src mit Membranen aus DOPC/DOPG (80:20 mol%).	98
Abb. 6.4:	Assoziations- und Dissoziationsexperimente von Myr-Src mit Membranen aus DOPC und unterschiedlichen Anteilen an PG (0-30 mol%).	99
Abb. 6.5:	Die Geschwindigkeitskonstanten für die Bindungsreaktion von Myr-Src mit Membranen aus DOPC und unterschiedlichen Anteilen an PG (0-30 mol%).	100
Abb. 6.6:	Assoziations- und Dissoziationsexperimente von Myr-Src mit homogenen und heterogenen Membranen mit 20 mol% PG in An- und Abwesenheit von UNC119A und Squarunkin A.	102
Abb. 6.7:	Die Geschwindigkeitskonstanten für die Bindungsreaktion von Myr-Src mit homogenen und heterogenen Membranen mit 20 mol% PG in An- und Abwesenheit von UNC119A sowie Squarunkin A.	103

Abb. 6.8:	Einfluss von UNC119A auf die Assoziation und Dissoziation von Myr-Src an bzw. von homogenen und heterogenen Membranen in Gegenwart und Abwesenheit von Squarunkin A.	105
Abb. 6.9:	Membranbindungsmechanismus von Myr-Src in An- und Abwesenheit von UNC119A mit anionischen <i>raft</i> -ähnlichen Membranen.	109
Abb. 7.1:	Chemische Struktur der molekularen Pinzette CLR01.	112
Abb. 7.2:	Fluoreszenzmikroskopischer Assay mit der molekularen Pinzette CLR01 unter Verwendung von <i>raft</i> -ähnlichen Modellmembranen.	115
Abb. 7.3:	Fluoreszenzmikroskopischer Assay mit CLR03 unter Verwendung von <i>raft</i> -ähnlichen Modellmembranen.	117
Abb. 7.4:	Fluoreszenzmikroskopischer Assay mit CLR05 unter Verwendung von <i>raft</i> -ähnlichen Modellmembranen.	118
Abb. 7.5:	Fluoreszenzmikroskopischer Assay mit der molekularen Phosphatklammer unter Verwendung von <i>raft</i> -ähnlichen Modellmembranen.	120
Abb. 7.6:	Deformation <i>raft</i> -ähnlicher Modellmembranen durch die molekulare Pinzette CLR01.	121
Abb. 8.1:	Explosionsdarstellung und Querschnitt der Mikroskopie-Hochdruckzelle.	128
Abb. 8.2:	Zusammengebaute Mikroskopie-Hochdruckzelle auf dem eigens dafür angefertigten xy-Mikroskoptisch am inversen Mikroskop des Modells Eclipse TE-300DV von Nikon.	131
Abb. 8.3:	Konfokale Fluoreszenzbilder von GUVs aus DOPC/DPPC/Chol (1:2:1 mol%) bei 55 °C in einem Druckbereich von 0,1-100 MPa.	132
Abb. 8.4:	Fluoreszenzbilder von GUVs aus DOPC/DPPC/Chol (1:2:1 mol%) in hochkonzentrierten Zuckerlösungen bei 55 °C in einem Druckbereich von 0,1-100 MPa.	134
Abb. A.1:	pTWIN2_KRas4B_wt_1-174 Plasmidkarte.	A
Abb. A.2:	Fluoreszenzmarkierung des K-Ras4B-Proteins mit Atto 488-Maleimid. .	B
Abb. A.3:	Kalibriergerade zur Bestimmung der Phosphatstoffmenge gemäß dem BARTLETT-Assay.	C
Abb. A.4:	Druckabhängige FT-IR-Absorptionsspektren von apo-CaM, holo-CaM und holo-CaM/K-Ras4B-Peptid und die 2. Ableitung dieser Spektren. .	D
Abb. A.5:	Bandenanpassung der Amid-I'-Bande von holo-CaM.	E
Abb. A.6:	FT-IR-Spektren des C-terminalen K-Ras4B-Peptids bei 0,1 MPa und 1300 MPa.	E
Abb. A.7:	<i>Raft</i> -ähnliche Modellmembranen nach der Behandlung mit CLR05. . .	F

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1:	Bezugsquellen der Chemikalien und Reagenzien für die Semisynthese von K-Ras4B.	28
Tab. 3.2:	Verwendete Nährmedien und Puffer für die Expression und Reinigung von K-Ras4B.	29
Tab. 3.3:	Spektrale Eigenschaften von BODIPY [®] FL.	31
Tab. 3.4:	Puffer für die Ligation des K-Ras4B Δ 15-Proteins mit dem <i>C</i> -terminalen K-Ras4B-Dodecapeptid.	32
Tab. 3.5:	Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE.	33
Tab. 3.6:	Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.	34
Tab. 4.1:	Bezugsquellen der Chemikalien und Lipide für die Untersuchungen der lipidierten Ras-Proteine in Membranen unterschiedlicher Zusammensetzung.	43
Tab. 4.2:	Medien und Puffer für die Kultivierung der Zelllinie RBL-2H3.	44
Tab. 5.1:	Bezugsquellen der Chemikalien, Proteine und Peptide für die Untersuchungen der CaM Konformationszustände.	66
Tab. 6.1:	Bezugsquellen der Chemikalien und Lipide für die kinetischen Untersuchungen zur Membranbindung von Myr-Src in Gegenwart von UNC119A.	91
Tab. 6.2:	Experimentelle Bedingungen für die Assoziations- und Dissoziationsexperimente von Myr-Src mit Membranen.	93
Tab. 6.3:	Experimentelle Bedingungen für die Assoziations- und Dissoziationsexperimente von Myr-Src mit Membranen in Anwesenheit von UNC119A.	93
Tab. 6.4:	Experimentelle Bedingungen für die Assoziations- und Dissoziationsexperimente von Myr-Src mit Membranen in Anwesenheit von UNC119A und Squarunkin A.	94
Tab. 6.5:	Dissoziationskonstanten des schnellen und langsamen Bindungsschrittes sowie des gesamten Bindungsprozess von Myr-Src mit Membranen aus DOPC mit verschiedenen PG-Anteilen (0-30 mol%).	101
Tab. 6.6:	Dissoziationskonstante für den schnellen und langsamen Bindungsschritt sowie den gesamten Bindungsprozess von Myr-Src mit homogenen und heterogenen Membranen mit 20 mol% PG.	104

Tab. 7.1: Bezugsquellen der Chemikalien und Lipide für die strukturelle Untersuchung der viralen Modellmembranen in Anwesenheit von molekularen Pinzetten.	113
Tab. 8.1: Bezugsquellen der Chemikalien und Lipide für die Präparation der in den Hochdruckstudien untersuchten Proben.	125

Einleitung

„Aufgabe der Naturwissenschaft ist es nicht nur die Erfahrung zu erweitern, sondern in diese Erfahrung eine Ordnung zu bringen.“

Nils Bohr

Das Ziel und die Aufgabe der Naturwissenschaft ist die Erforschung von natürlichen Phänomenen, um neue Erkenntnisse und ein tieferes Verständnis der Natur in all ihrer Komplexität zu erhalten. In der biophysikalischen Chemie werden biologische Fragestellungen und Probleme mithilfe von physikalischen Messmethoden untersucht und im Rahmen von physikalisch-chemischen Modellen beschrieben. Einfache Modellsysteme mit elementaren molekularen Komponenten einer Zelle werden entwickelt und verwendet, um biologische Prozesse unter kontrollierten Bedingungen und dem Einfluss einzelner Komponenten zu untersuchen. Auf diese Weise können zugrunde liegende Gesetzmäßigkeiten gefunden werden, die zu einem besseren Verständnis biologischer Vorgänge beitragen können, wodurch z.B. Auslöser von Krankheiten in Zellen erkannt werden können. Daher kann ein umfassendes Verständnis solcher Mechanismen letztlich zur Diagnose und Behandlung von Krankheiten beitragen.

In dieser Arbeit spielen die Wechselwirkungen lipidierter Proteine und Peptide mit Lipidmembranen sowie die proteinvermittelte Regulation dieser Interaktionen eine zentrale Rolle. In den folgenden Abschnitten werden die verwendeten Modellsysteme vorgestellt und erläutert, was der späteren Erarbeitung der hier untersuchten biologischen Fragestellungen dient.

1.1 Natürliche Plasmamembran

In allen lebenden Zellen ist der intrazelluläre Bereich, das Zytosol, von einer Plasmamembran umgeben, wobei Pflanzenzellen, Pilze und Bakterien zusätzlich von einer aus Polysacchariden aufgebauten Zellwand umhüllt sind. Dahingegen stellt in tierischen Zellen die Plasmamembran die einzige räumliche Abgrenzung zum extrazellulären Bereich dar und fungiert dabei als selektive Permeabilitätsbarriere, wodurch ein kontrollierter Stoffaustausch mit der Umgebung gewährleistet wird. Neben dieser grundlegenden Funktion ist die zelluläre Membran bei Säugetieren ebenfalls an der Ausbildung von Zellkontakten und -verbindungen sowie an Signaltransduktionen von extrazellulären Reizen ins Zellinnere beteiligt. Zudem interagieren Bestandteile der Plasmamembran mit Komponenten der extrazellulären Matrix oder den filamentösen Proteinen des Zytoskeletts, was essentiell für die mechanische Stabilisierung der Zelle ist.^[1-3]

1.1.1 Lipidzusammensetzung

Zum größten Teil besteht die zelluläre Membran aus Lipiden, die eine polare Kopfgruppe und hydrophobe Kohlenwasserstoffreste umfassen. Zu den Membranlipiden zählen u.a. Phospholipide, die entweder auf einem Glycerin- oder Sphingosin-Grundgerüst basieren und mit unterschiedlichen phosphorylierten Alkoholen modifiziert sind, durch deren Variation verschiedene Lipidspezies generiert werden können (siehe Abb. 1.1). Zu den Phosphoglyceriden, die mit $\sim 65\%$ den Lipidhauptbestandteil der eukaryotischen Membranen ausmachen, werden beispielsweise die unmodifizierte Phosphorsäure (PA), das bei physiologischem pH anionisch vorliegende Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylinositol (PI) sowie das zwitterionische Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) zugeordnet.^[4-6] Neben dem PC-haltigen Sphingomyelin (SM) als bekanntester Vertreter der Sphingolipide in tierischen Zellen existieren auch Glykosphingolipide, die glykosidisch gebundene Kohlenhydrateinheiten (Mono-, Di- oder komplexe Oligosaccharide) an der primären Hydroxylgruppe des Sphingosins tragen.^[7] Zusätzlich enthalten biologische Membranen Steroide, wie z.B. das in Säugetierzellen vorherrschende Cholesterol, bei dem ein rigides und hydrophobes Steroidgerüst mit einer polaren Hydroxylgruppe funktionalisiert ist (siehe Abb. 1.1).^[4,6]

Neben dem Lipidgrundgerüst und der polaren Kopfgruppe tragen zusätzlich die natürlich vorkommenden Fettsäuren, die sowohl in ihrer Kohlenstoffkettenlänge als auch in ihrem Sättigungsgrad variieren, zur Lipiddiversität bei. Die Kohlenstoffketten in Phosphoglyceriden besitzen vorwiegend eine Länge von 12-24 C-Atomen und können entweder gesättigt oder einfach bzw. mehrfach ungesättigt vorliegen, wobei die Doppelbindungen eine *cis*-Konfiguration aufweisen.^[1,6] Typischerweise sind diese Fettsäuren in eukaryotischen Zellen über eine Esterbindung an die *sn*-1 und *sn*-2 Position des Glycerinrückgrats gebunden.

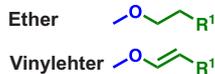
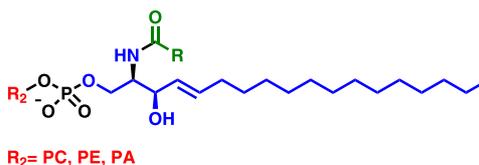
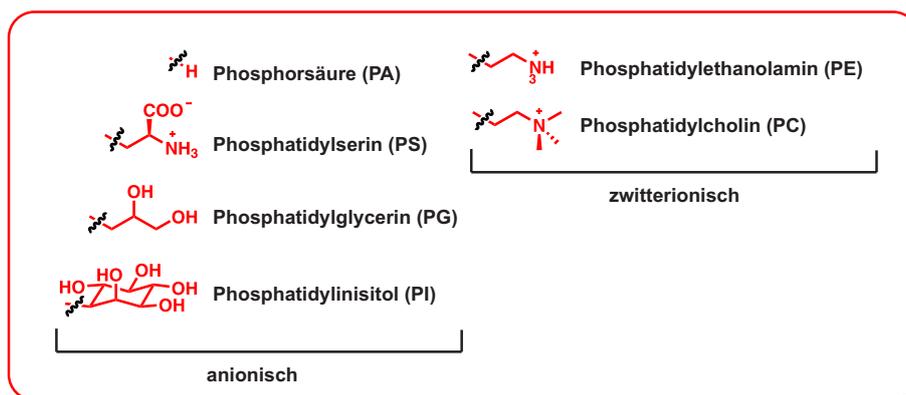
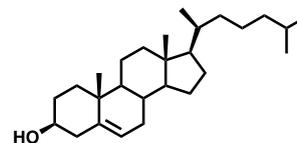
PhosphoglycerideSphingolipideGlyko-
einheitenSteroide

Abb. 1.1: Struktureller Aufbau der Membranlipide, unterteilt in Phosphoglyceride, Phosphosphingolipide (Grundgerüste in blau) und Steroide. Die strukturelle Diversität der Lipidmoleküle wird durch zusätzliche Variationen der polaren Kopfgruppe (rot) oder der hydrophoben Fettsäuren (grün) erhöht.

In einigen Zelltypen können jedoch auch langkettige Alkohole oder Vinylalkohole über eine Etherbindung an die *sn*-1 Position des Glycerins binden. Darüber hinaus existieren auch Lysophospholipide, die durch die Phospholipasen-katalysierte Hydrolyse nur noch eine Fettsäure in der *sn*-1 oder *sn*-2 Position besitzen. In Sphingolipiden werden die Fettsäuren hingegen über eine Amidbindung an das Sphingosingerüst gebunden, wodurch ein sogenanntes Ceramid gebildet wird (siehe Abb. 1.1). Die Fettsäuren in Ceramiden weisen Kohlenwasserstoffketten mit bis zu 36 Methyleneinheiten auf und sind vorwiegend gesättigt oder *trans*-ungesättigt.^[7] Die Kombinationen all dieser verschiedenen Lipidbausteine führt zu einer unglaublichen strukturellen Lipidvielfalt, wodurch eukaryotische Zellen in der Lage sind, mehr als 1000 verschiedene Lipidspezies zu generieren.^[1,2,4,6] Diese Lipiddiversität erlaubt es Organismen durch Variation der Lipidzusammensetzung die funktionellen Eigenschaften der zellulären Membranen, wie z.B. die Fluidität, unter allen äußeren Bedingungen aufrechtzuerhalten (homöoviskose Adaptation).^[8]

1.1.2 Polymorphismus und Phasenverhalten von Lipidmembranen

Die Lipidzusammensetzung bestimmt jedoch nicht nur die funktionellen, sondern auch die strukturellen Eigenschaften der Membran. Im Allgemeinen assoziieren Lipide wegen ihres amphiphilen Charakters spontan im wässrigen Medium zu supramolekularen Aggregaten, in denen die polaren Kopfgruppen in Wechselwirkung mit dem wässrigen Medium stehen und die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten sich verborgen im Inneren der Membran befinden. Der hydrophobe Effekt stellt dabei die ausschlaggebende Triebkraft dar.^[9] Da Lipide abhängig von der Kopfgruppe und der Acylketten unterschiedliche geometrische Formen aufweisen, nehmen die assemblierten Lipide verschiedene übergeordnete Strukturen an, in denen eine optimierte Packung der Lipidmoleküle gewährleistet wird. Diese Fähigkeit der Lipide in unterschiedliche strukturelle Aggregate zu assemblieren wird als Lipidpolymorphismus bezeichnet.^[10] Mithilfe des von ISRAELACHVILI eingeführten kritischen Packungsparameters $CPP = v_m / (A_0 \cdot l_c)$, der das molekulare Volumen der Kohlenwasserstoffketten v_m , die Fläche der polaren Kopfgruppe A_0 sowie die größtmögliche Länge der flexiblen Alkylkette l_c berücksichtigt, lässt sich die Aggregatstruktur der assemblierten Lipide vorhersagen.^[11] Die meisten PC-haltigen Lipide besitzen eine zylindrische Form ($CPP \sim 1$) und sind dadurch in der Lage, planare Lipiddoppelschichten auszubilden.^[10] Im Gegensatz dazu bilden kegelförmige Lysophospholipide ($CPP < 1/3$) mizellare Strukturen und PE-haltige Lipide besitzen aufgrund der relativ kleinen Kopfgruppe und der meist ungesättigten Alkylketten eine Kegelstumpfform ($CPP > 1$), weshalb sie sich zu inversen Mizellen zusammenlagern.^[10,12] Solche Strukturen werden häufig in nicht-lamellaren Phasen, wie der invers hexagonalen (H_{II}) und den verschiedenen kubischen Phasen (Q_{II}) beobachtet, die eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen, wie der Membranfusion sowie Endo- und Exozytose, spielen.^[2,10,12] Ferner kann die durch PE-induzierte negative Membrankrümmung auch die Einlagerung und Aktivität von Membranproteinen beeinflussen.^[13,14] Der kritische Packungsparameter ist jedoch keine fixe Größe, sondern hängt von äußeren Parametern, wie der Hydratation, Temperatur, Druck, pH, Ionenstärke und der Anwesenheit von Salzen ab.

In Abhängigkeit von der Temperatur können Lipiddoppelschichten unterschiedliche thermotrope lamellare Phasenzustände annehmen, die sowohl mit einer Änderung der lateralen Ordnung und Rotationsordnung der Lipidmoleküle als auch der Konformationsordnung der Kohlenwasserstoffketten einhergehen (siehe Abb. 1.2).^[12] Manche Lipide, wie z.B. DPPC, können mehrere temperaturabhängige Phasenübergänge durchlaufen. Bei sehr niedrigen Temperaturen befinden sich die Lipide zunächst in einer physiologisch nicht relevanten Sub-Gelphase L_c , in der sie kristallin in einem orthorhombischen Gitter angeordnet sind. Die laterale Diffusion und Rotation der Lipide sind dadurch stark eingeschränkt. Mit steigender Temperatur gehen die Lipide in eine L_β -Gelphase über, die auch als fest-geordnete s_o (*solid-ordered*)-Phase bekannt ist, in der die Lipide in einem quasi-hexagonalen Gitter

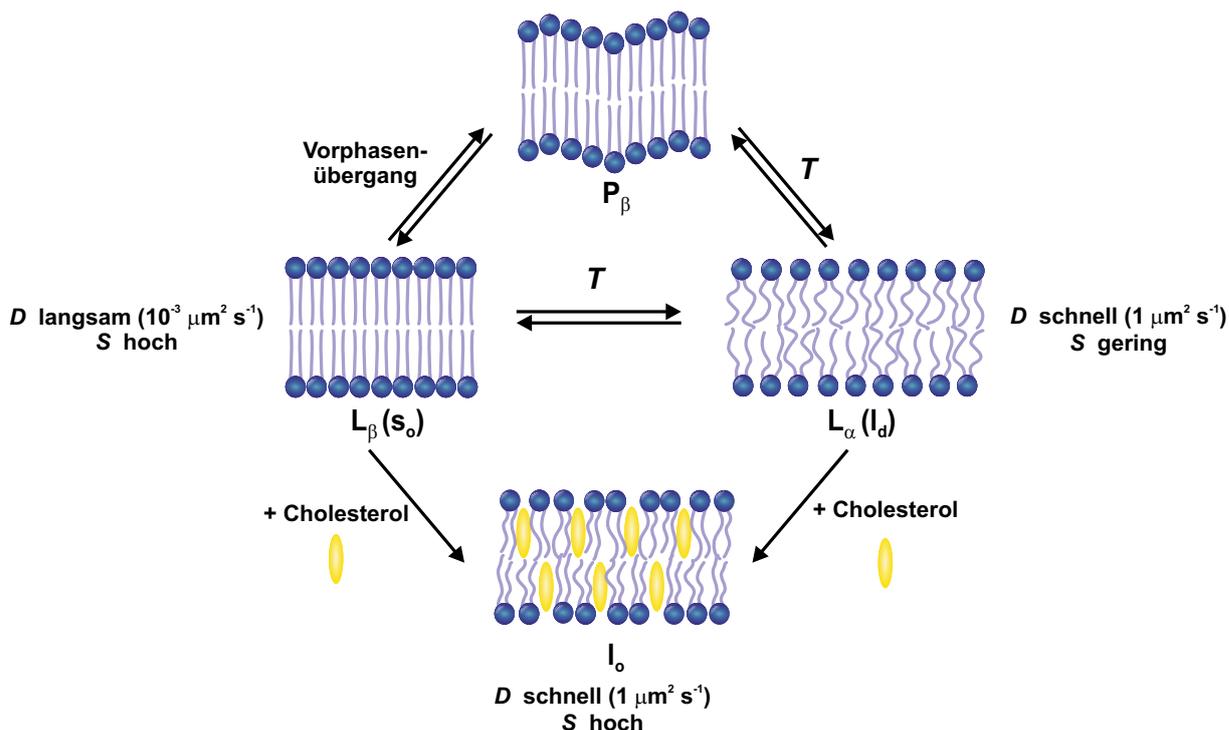


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der lamellaren Lipidphasen in wässrigem Medium. Bei tiefen Temperaturen befindet sich die Lipiddoppelschicht in der Gelphase L_{β} , auch als s_o (*solid-ordered*)-Phase bekannt, in der die Kohlenwasserstoffketten in der *all-trans*-Konformation vorliegen, sodass der Ordnungsparameter S hoch ist, während die laterale Diffusion D weitestgehend eingeschränkt ist. Höhere Temperaturen führen zu einer periodisch gewellten Überstruktur (P_{β} -Phase). Durch eine weitere Erhöhung der Temperatur geht die Membran in die flüssig-kristalline L_{α} -Phase, auch als l_d (*liquid-disordered*)-Phase bekannt, über, in der die Kohlenwasserstoffketten vorwiegend in der *gauche*-Konformation vorliegen und der Ordnungsparameter gering ist. In dieser Phase ist die laterale Diffusion der Lipidmoleküle schnell. Die Einlagerung von Cholesterol resultiert in einer flüssig-geordneten l_o (*liquid-ordered*)-Phase, in welcher der Ordnungsparameter hoch ist und die Lipide gleichzeitig eine hohe laterale Diffusion besitzen.

gepackt sind. Die Kohlenwasserstoffketten weisen dabei eine *all-trans*-Konformation auf und sind maximal gestreckt, sodass eine extrem dichte Packung der Lipide ermöglicht wird. Abhängig vom Hydratationsgrad können die Kohlenwasserstoffketten senkrecht (L_{β}) oder geneigt ($L_{\beta'}$) bezüglich der Membrannormalen vorliegen, wobei sich der Neigungswinkel mit zunehmendem Wassergehalt vergrößert. Die Neigung der Lipide resultiert aus dem hohen Platzbedarf der Kopfgruppen im Vergleich zu dem der gesättigten Kohlenwasserstoffketten und ermöglicht dadurch die dichte Packung der Lipide. Der Phasenübergang in die darauffolgende P_{β} -Gelphase wird als Vorphasenübergang bezeichnet. Hier sind die Lipide in einem hexagonalen Kristallgitter angeordnet und die Lipiddoppelschicht besitzt eine periodisch gewellte Überstruktur. Wie bei L_{β} -Gelphase sind die Kohlenwasserstoffketten der Lipide in dieser Gelphase entweder senkrecht (P_{β}) oder geneigt ($P_{\beta'}$) zur Membrannormalen. Die Rotationsfreiheit der Lipide in den beiden Gelphasen L_{β} und P_{β} ist relativ hoch, wohingegen die laterale Diffusion weitestgehend eingeschränkt ist. Mit weiter steigender Temperatur erfolgt der Hauptphasenübergang in die flüssig-kristalline L_{α} -Phase oder auch flüssig-ungeordnete l_d (*liquid-disordered*)-Phase, in der sowohl die laterale Diffusion der Lipidmoleküle als auch die Konformationsfreiheit der Alkylketten

zunimmt. In dieser Phase liegen die Alkylketten vorwiegend in *gauche*-Konformationen vor.^[12] Obwohl durch die daraus resultierende geringere Packungsdichte weniger VAN DER WAALS-Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Alkylketten ausgebildet werden, wird wegen der großen Anzahl an Rotationsisomeren die Konformationsentropie erhöht, sodass der Phasenübergang energetisch begünstigt ist.^[15] Weiterhin führen die *gauche*-Konformationen der Fettsäureketten in der L_α -Phase zu einer geringeren Membrandicke als in den Gelphasen, obwohl das Volumen der Membran in der fluiden Phase insgesamt größer wird.^[16] Die flüssig-kristalline Phase weist von allen Lipidphasen die höchste Fluidität auf. Da diese essentiell für die Funktionen der Plasmamembran ist, spiegelt die L_α -Phase den physiologisch relevanten Zustand der zellulären Membran wider. Wie bereits erwähnt, können Organismen durch die homöoviskose Adaptation die Lipidzusammensetzung ihrer Plasmamembran äußeren Umwelteinflüssen anpassen, um die benötigte Membranfluidität zu gewährleisten.^[8] Kurze und ungesättigte Kohlenwasserstoffketten in der Membran erniedrigen die Übergangstemperatur in die fluide Phase, da zum einen der enthalpische Beitrag durch die Wechselwirkung benachbarter Ketten bei kurzen Alkylketten geringer ist und zum anderen die *cis*-Doppelbindungen einen Knick in der Alkylkette verursachen, sodass eine dichte Packung der Lipide verhindert wird. Daher werden solche Lipide häufig in Plasmamembranen von Organismen beobachtet, die Lebensräume mit tiefen Temperaturen oder anderen extremen Bedingungen bewohnen.^[17] Die Einlagerung von Cholesterol hingegen reduziert zum einen die Fluidität der Membran, da die benachbarten Fettsäureketten durch die Interaktionen mit dem rigiden Steroidgerüst in eine *all-trans*-Konformation überführt werden und zum anderen stört die Interkalation der Cholesterolmoleküle die kristalline Packung der Fettsäuren, wodurch der Phasenübergang in die Gelphase verhindert wird.^[18,19] Mit steigender Cholesterolkonzentration wird der Hauptphasenübergang zunehmend breiter. Demzufolge existiert eine weitere Lipidphase in Anwesenheit von Cholesterol, die als flüssig-geordnete l_o (*liquid-ordered*)-Phase bezeichnet wird. In dieser Phase sind die laterale Mobilität und die Rotation der Lipidmoleküle vergleichbar mit denen in der l_d -Phase und der Konformationsfreiheitsgrad der Kohlenwasserstoffketten ist ähnlich zu dem in der s_o -Phase (siehe Abb. 1.2).^[20]

1.1.3 Aktuelles Modell der Plasmamembran

Da sich die Plasmamembran aus mehreren hundert Lipidspezies und Proteinen zusammensetzt, beschreibt eine einfache Lipiddoppelschicht nicht alle strukturellen und funktionellen Eigenschaften der zellulären Membran. Daher wurden in den letzten Jahrzehnten unterschiedliche Modelle für den Aufbau der Plasmamembran vorgeschlagen, die in diesem Abschnitt vorgestellt werden.

Bereits 1889 hat OVERTON gezeigt, dass Zellen von einer aus Lipiden bestehenden Grenzschicht umgeben sind, die als selektive Permeabilitätsbarriere dient.^[21] Nachdem LANGMUIR

1917 den Langmuir-Trog vorgestellt hatte, der die quantitative Charakterisierung von Lipidmonoschichten an der Luft-Wasser-Grenzfläche ermöglichte,^[22] haben GORTNER und GREDEL 1925 mithilfe dieser Technik die Plasmamembran von roten Blutzellen untersucht und festgestellt, dass sich biologische Membranen aus Lipiddoppelschichten zusammensetzen.^[23] Neben Lipidmolekülen enthalten natürliche Membranen ebenfalls eine Vielzahl an integral und peripher eingebetteten Membranproteinen (siehe Abschnitt 1.2), denen die Lipiddoppelschicht als zweidimensionales Lösungsmittel dient. Abhängig vom Zelltyp variiert das Verhältnis von Protein zu Lipid in der Plasmamembran eukaryotischer Zellen beträchtlich zwischen 20 und 70 %.^[24,25] Die Anwesenheit von peripheren Membranproteinen wurde zuerst von DANIELLI und DAWSON 1935 beschrieben und später 1966 von ROBERTSON.^[26] Schließlich haben SINGER und NICOLSON 1972 das bekannte Flüssig-Mosaik-Modell vorgestellt, welches die Membran als dynamisch zweidimensionale Struktur beschreibt, in der die Membranproteine und -lipide eine hohe laterale Diffusion in der Membranebene aufweisen. Daraus resultiert eine weitestgehend homogene Verteilung der Membrankomponenten, dennoch unterscheiden sich die Lipid- und Proteinzusammensetzung der beiden Lipidmonoschichten signifikant voneinander.^[27] In eukaryotischen Zellen ist die extrazelluläre Lipidschicht der Plasmamembran mit PC, SM und Glykolipiden angereichert, während die anionischen Lipide PS, PI und PA sowie das zwitterionische PE ausschließlich auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran vorkommen (siehe Abb. 1.3).^[28] Der Anteil negativ geladener Phospholipide (PS und PI) in der Plasmamembran eukaryotischer Zellen variiert abhängig vom Zelltyp zwischen 10 und 15 %.^[5,29] Der Cholesterolanteil in der Plasmamembran liegt zwischen 10 und 50 %, wobei die Verteilung dieses Moleküls auf beiden Seiten der Membran kontrovers diskutiert wird, da es eine relativ schnelle transversale Diffusion aufweist, jedoch bevorzugte Interaktionen mit SM auf der nicht-zytosolischen Seite der Plasmamembran eingeht.^[30,31] Die asymmetrische Lipidverteilung hat wichtige funktionelle Konsequenzen, z.B. ist die Exposition von PS an die Zelloberfläche ein Signal für die Apoptose und Blutgerinnungskaskade.^[29,32] Diese Asymmetrie wird durch selektive Lipidtransporterproteine und durch die sehr langsame transversale Diffusion der meisten Lipidmoleküle von einer Membranseite zur anderen (*flip-flop*) aufrechterhalten.^[5,33]

Das vorgeschlagene Flüssig-Mosaik-Modell der biologischen Membranen berücksichtigt jedoch nicht, dass durch die bevorzugte Wechselwirkung zwischen Proteinen und gewissen Lipiden laterale Heterogenitäten in der Membranstruktur induziert werden können. Bereits 1977 demonstrierte ISRAELACHVILI in seinem überarbeiteten Membranmodell, dass die Insertion von Proteinen in die Membran einen Einfluss auf die Anordnung der Lipide hat. So werden beispielsweise bestimmte Lipide von der Protein-Lipid-Grenzfläche ausgeschlossen und andere rekrutiert, um energetisch ungünstige Packungsdefekte in der Membran und/oder die Exposition hydrophober Flächen zu minimieren.^[13] Diese Idee wurde später von MOURITSEN in seinem Matratzenmodell aufgegriffen und verfeinert,

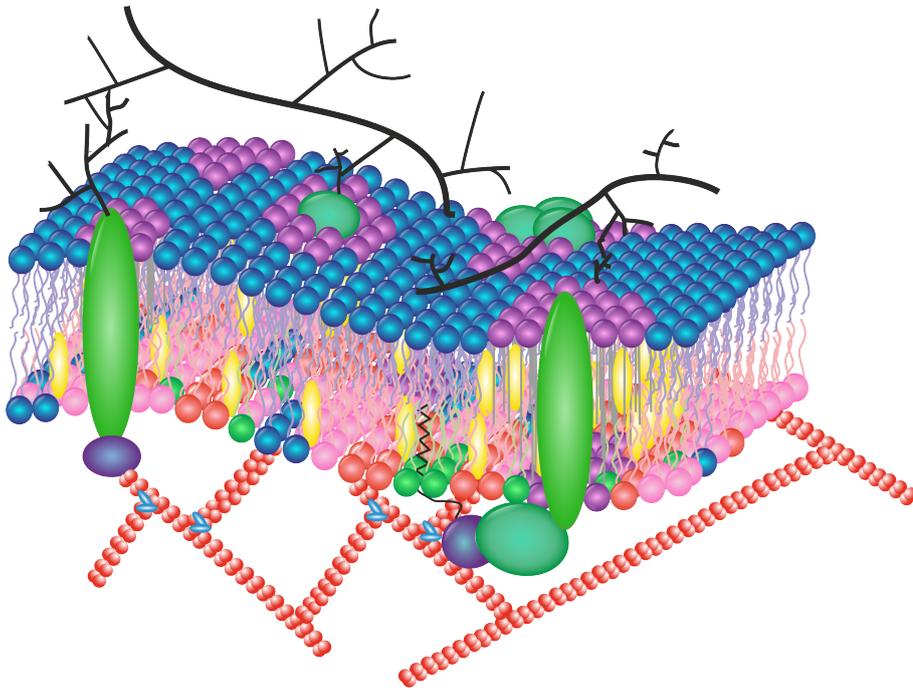


Abb. 1.3: Modifizierte schematische Darstellung des Flüssig-Mosaik-Modells einer biologischen Membran. Während die extrazelluläre Seite der Plasmamembran hauptsächlich PC (blau), SM (lila) und Glykolipide enthält, befinden sich PE (rosa), PS (rot) und PI (grün) ausschließlich auf der intrazellulären Membranseite. Cholesterol (gelb) und SM sind in geordneten Membrandomänen angereichert (laterale Phasenseparation). Einige Lipide und Membranproteine diffundieren frei lateral in der Membranebene, während andere durch das Zytoskelett (Aktin) oder die extrazelluläre Matrix (Proteoglykane) in ihrer Mobilität eingeschränkt sind.

in dem der Begriff des hydrophoben *mismatches* seinen Ursprung hat. Die Minimierung eines solchen hydrophoben *mismatch* zwischen der hydrophoben Proteinfläche und des Membraninneren geht nicht nur mit einer lateralen Phasenseparation der Lipide einher, sondern kann auch durch eine Konformationsänderung des Proteins oder der Ausbildung von Proteinaggregaten/-oligomeren ermöglicht werden.^[34,35] Die Proteinverteilung in der Membran kann darüber hinaus durch Bindungsmotive in Proteinen für bestimmte Lipidspezies, wie beispielsweise Cholesterol oder PI, reguliert werden.^[36,37] Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden beeinflussen jedoch nicht nur die Lokalisation und damit die Aktivität von Membranproteinen, sondern haben auch Auswirkungen auf die Form, Lipidzusammensetzung und Dynamik der zellulären Membran.

Selektive Lipid-Lipid-Interaktionen, wie die bevorzugte Wechselwirkung von Cholesterol mit gesättigten Phosphoglyceriden oder Sphingolipiden,^[38] resultieren in einer lateralen Entmischung und führen zur Ausbildung von geordneten Membrandomänen inmitten einer fluiden Lipidmatrix.^[20] Dies bildet die Grundlage für das sogenannte „*lipid raft*“-Modell, in dem SIMONS und IKONEN 1997 die Existenz von transienten, nanoskopischen Domänen in der Zellmembran postulierten, die mit Sphingolipiden und Cholesterol angereichert sind. Diese stellen eine Plattform für Membranproteine dar, die zahlreiche zelluläre Prozesse, wie z.B. die Dynamik des Zytoskeletts, Transportprozesse und intrazelluläre Signalweiterleitungen, regulieren.^[39,40] Obwohl einige Experimente auf die Existenz solcher funktionellen

Membrandomänen hinweisen, wird dieses Modell kontrovers diskutiert, da eine direkte Beobachtung und Untersuchung möglicher *raft*-Domänen in lebenden Zellen aufgrund ihrer Größe und kurzen Lebensdauer eingeschränkt ist.^[41]

1995 präsentierte SACKMANN schließlich ein Membranmodell, das weitreichende Heterogenitäten in der Zellmembran aufzeigt. Diese resultieren aus den zusätzlichen Interaktionen der Lipide und Proteine mit dem Zytoskelett auf der zytosolischen Seite der Membran sowie mit der Glykokalix auf der extrazellulären Seite, wodurch die laterale Diffusion der Membrankomponenten signifikant reduziert und eine homogene Verteilung unterbunden wird (siehe Abb. 1.3).^[1,3,42]

Die strukturelle Komplexität und dynamische Struktur der zellulären Membran erschwert die Untersuchungen der räumlich und zeitlich regulierten Prozesse an der Membran unter kontrollierten Bedingungen innerhalb einer Zelle. Die Rekonstitution dieser biologischen Systeme *in vitro* unter Verwendung von Modellmembranen bietet daher eine attraktive Alternative, membranassoziierte Vorgänge und den Einfluss individueller Komponenten aufzuklären.

1.2 Lipidmodifizierte Proteine in Signaltransduktionen

Die Fähigkeit von Zellen, mit ihrer Umgebung zu kommunizieren und auf äußere Reize zu reagieren, ist essentiell für ihr Überleben. Hierfür werden extrazelluläre Signale über die Plasmamembran in das Zellinnere weitergeleitet. Bei diesen Signaltransduktionen werden zunächst Rezeptorproteine auf der Zelloberfläche durch die Bindung von Wachstumsfaktoren, Hormonen oder durch andere Umgebungsreize aktiviert, woraufhin das Signal auf periphere Membranproteine, die sich auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran befinden, übertragen wird. Bei diesen membranassoziierten Proteinen handelt es sich vorwiegend um GTPasen und Kinasen, die über ein definiertes Set von nachgeschalteten Effektorproteinen intrazelluläre Signalkaskaden initiieren, die letztendlich die Transkription gewisser Gene beeinflussen. All diese molekularen Prozesse verursachen bestimmte zelluläre Reaktionen, die z.B. das Überleben, die Proliferation, Motilität oder Differenzierung der Zelle regulieren. Wenn entscheidende Komponenten dieser Signalwege durch die Überexpression oder Mutation von Onkogenen verändert werden, kann dies ein unkontrolliertes Zellwachstum zur Folge haben oder die Apoptose unterbinden. Aus diesem Grund werden anormale Signalweiterleitungen häufig mit Krankheiten wie Krebs in Verbindung gebracht und repräsentieren folglich ein potentiell wirkstoffziel für neue Krebstherapien.^[43]

1.2.1 Lipidmodifikationen

Um gezielt in solche Signalwege eingreifen zu können, werden unterschiedliche chemische und biochemische Ansätze verfolgt. So können beispielsweise einerseits die Bindungsstellen der extrazellulären Signalmoleküle im Rezeptorprotein oder die Interaktionen zwischen den Proteinen direkt mittels kleiner Moleküle blockiert werden. Andererseits kann auch die Aktivierung der einzelnen Komponenten und damit die Signalweiterleitung verhindert werden. Einen weiteren vielversprechenden, indirekten Therapieansatz stellt die Inhibierung der Membranassoziation der peripheren Membranproteine dar, da die Lokalisation an der Plasmamembran zwingend für die biologische Funktion der Proteine und folglich für die Initiierung der nachgeschalteten Signalkaskade erforderlich ist.^[43,44]

Die Bindung dieser membranassoziierten Proteine an die zytosolische Seite der Plasmamembran wird durch die co- oder posttranslationale Lipidierung reguliert. Die kovalente Anbindung von z.B. Fettsäuren, Isoprenoiden oder Phospholipiden (siehe Abb. 1.4) erhöht die Hydrophobizität und damit die Membranaffinität der lipidierten Proteine. Lipidmodifikationen können im weitesten Sinne in zwei Kategorien eingeteilt werden: Lipidmodifikationen, die entweder im Zytoplasma sowie auf der zytosolischen Seite der Endomembranen stattfinden, oder die im Lumen von Organellen des sekretorischen Weges erfolgen.^[45] Zu der zweiten Kategorie zählt u.a. der Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker, der im endoplasmatischen Retikulum (ER) an den C-Terminus einiger Membranproteine gebunden wird. Proteine, die mit diesem Lipidanker modifiziert sind, befinden sich ausschließlich auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran.^[46]

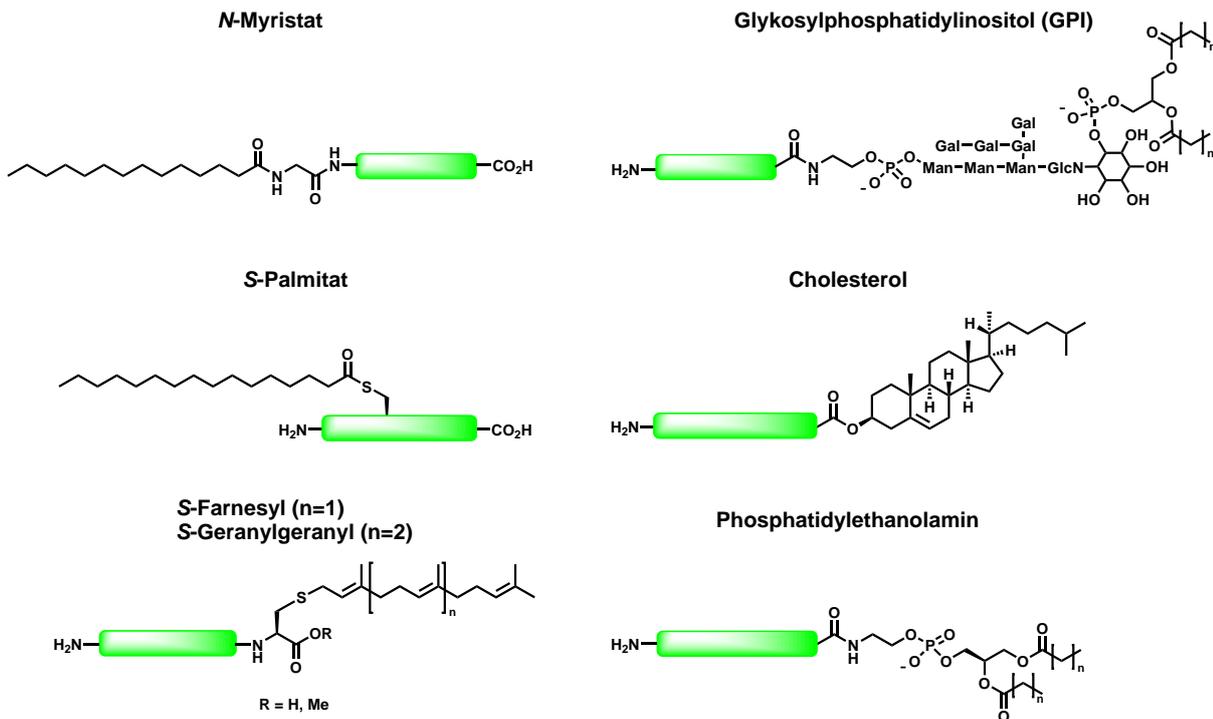


Abb. 1.4: Struktureller Überblick über einige Lipidmodifikationen in Membranproteinen.

Ein anders lipidmodifiziertes sekretorisches Protein ist das als Morphogen agierende Hedgehog (Hh) Protein, das eine Schlüsselrolle in der embryonalen Entwicklung einnimmt. Nach der Synthese dieses Proteins wird es zunächst in das ER importiert, wo die *N*-terminale Signalsequenz proteolytisch abgespalten wird. Daraufhin durchläuft dieses Vorläuferprotein eine Autoprozessierung, bei der die *C*-terminale Domäne entfernt und ein Cholesterolkövalent an den neuen *C*-Terminus der *N*-terminalen Domäne gebunden wird. Des Weiteren wird der *N*-Terminus dieser Domäne mit einer über eine stabile Amidbindung gebundenen Palmitoylgruppe modifiziert. Das zweifach lipidierte Protein wird schließlich zur extrazellulären Seite der Plasmamembran transportiert.^[47]

Im Fokus dieser Arbeit stehen jedoch Lipidmodifikationen, die im Zytoplasma oder an der zytosolischen Seite der Endomembranen ablaufen. Hierzu gehören neben der seltenen Phospholipid-Konjugation, die bisher nur am Atg8/LC3 Protein beobachtet wurde,^[48] vor allem die häufig stattfindende *N*-Myristoylierung, *S*-Palmitoylierung und *S*-Prenylierung.^[49]

***N*-Myristoylierung**

Die *N*-Myristoylierung erfolgt vorwiegend cotranslational in Proteinen mit der *N*-terminalen Erkennungssequenz MGXXS/T. Nachdem das initiale Methionin am *N*-Terminus von einer Aminopeptidase entfernt wurde, katalysiert das Enzym *N*-Myristoyltransferase die Übertragung einer Myristoylgruppe auf die Aminogruppe des nun freiliegenden Glycins (Gly). Aufgrund der hohen Stabilität der entstandenen Amidbindung ist die *N*-Myristoylierung irreversibel.^[50] Obwohl sich die Membranaffinität der Proteine durch die Myristoylierung erhöht, wird bei der Insertion dieses Lipidankers in die Membran nicht genug Energie freigesetzt, um das Protein stabil in der Membran zu verankern.^[51] Die daraus resultierende rapide Dissoziation von der Membran kann jedoch durch zusätzliche Membranbindungsmotive im Protein verhindert werden. Häufig enthalten myristoylierte Proteine, wie z.B. die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase c-Src (siehe Abschnitt 1.2.3), die an zahlreichen intrazellulären Signaltransduktionen beteiligt ist, eine polybasische Sequenz in der Nähe der Lipidfunktion. Dadurch können zusätzlich elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Lipidkopfgruppen an der zytosolischen Seite der Plasmamembran ausgebildet werden.^[52] Die Membranbindung solcher Proteine kann durch die Phosphorylierung benachbarter Serinreste reguliert werden, weil die elektrostatischen Interaktionen zwischen Protein und Membran durch die negative Ladung der Phosphatgruppe geschwächt werden, sodass die Dissoziation von der Membran begünstigt wird.^[53] Des Weiteren können myristoylierte Proteine anstelle einer polybasischen Sequenz auch einen zusätzlichen Palmitoylanker in der Nähe des *N*-Terminus aufweisen.^[49]

S-Palmitoylierung

Bei der *S*-Palmitoylierung wird ein Palmitat oder eine andere Fettsäure kovalent über einen Thioester an die Seitenkette eines Cys gebunden. Diese Reaktion wird von Palmitoylacyltransferasen an Endomembranen katalysiert und erfolgt im Gegensatz zur Myristoylierung posttranslational. Im Vergleich zu den anderen Lipidierungen existiert für die *S*-Palmitoylierung keine allgemeine Konsensussequenz in den Proteinen.^[49] Darüber hinaus ist die *S*-Palmitoylierung als einzige Lipidmodifikation reversibel, da die hydrolyselabile Thioesterbindung spontan oder von Thioesterasen gespalten werden kann. Die Membranbindung und damit verbundene Aktivität palmitoylierter Proteine kann durch den stetigen Palmitoylierungs-/Depalmitoylierungszyklus reguliert werden.^[54] Wie bereits erwähnt, liefert die Einlagerung einer einzelnen Lipidmodifikation nicht genügend GIBBS-Energie für eine stabile Membranassoziation der lipidmodifizierten Proteine, weshalb weitere Membranbindungsmotive erforderlich sind. Neben dem bereits erwähnten Myristoylanker und der Cholesterolmodifikation werden Palmitoylanker ebenfalls häufig in der Nähe von Prenylgruppen beobachtet, wie z.B. bei den Ras-Proteinen (siehe Abschnitt 1.2.2).^[49,55]

S-Prenylierung

Bei der Prenylierung wird ein Isoprenoid posttranslational an die Thiolgruppe eines Cys gebunden. Anders als bei der Palmitoylierung erfolgt die Bindung des Polyisoprenrestes an das Cys über eine Thioetherbindung. Die hohe Stabilität dieser Bindung macht die Prenylierung zu einem irreversiblen Prozess. Prenylierte Proteine enthalten meistens die *C*-terminale Konsensussequenz CAAX, die das lipidmodifizierte Cys, zwei angrenzende aliphatische Aminosäuren (AS) und eine terminale AS umfasst, die festlegt, ob das Protein mithilfe einer Farnesyltransferase (FTase) farnesyliert (15 C-Atome) oder durch die Geranylgeranyltransferase I (GGTaseI) geranylgeranyliert (20 C-Atome) wird.^[56] Proteine, die dieses CAAX-Motiv aufweisen, werden nach der Prenylierung an die zytosolische Oberfläche des ER transportiert, wo die Endopeptidase Rce1 das Tripeptid AAX proteolytisch entfernt. Der neu entstandene *C*-Terminus am prenylierten Cys wird durch das Enzym Icm1 carboxymethyliert (siehe Abschnitt 1.2.2).^[49,57] Ein weiterer Prenylierungsmechanismus existiert für die Familie der Rab-Proteine, die die *C*-terminalen Konsensussequenzen CXC oder CC aufweisen, wobei die zwei benachbarten Cys-Reste mithilfe der GGTaseII geranylgeranyliert werden.^[56]

Während die beiden Geranylgeranylgruppen die Membranaffinität der lipidierten Proteine so weit erhöhen, dass eine stabile Membranverankerung resultiert, dissoziieren Proteine, die nur eine Prenylfunktion tragen, rapide von der Membran. Daher benötigen prenylierte Proteine ähnlich wie myristoylierte ein sekundäres Membranbindungsmotiv, um die Asso-

ziation mit der Membran zusätzlich zu stabilisieren. Entweder sie treten in Kombination mit einer polybasischen Sequenz auf, wie die Spleißvariante K-Ras4B, die über sechs aufeinanderfolgende Lysinreste neben dem Farnesylanker verfügt, oder sie durchlaufen weitere Lipidmodifikationen wie N-Ras und H-Ras, die einen bzw. zwei zusätzliche Palmitoylanker tragen.^[57,58]

1.2.2 Ras-Proteine

Zu den peripheren Membranproteinen, die für die Signalweiterleitung an der Plasmamembran verantwortlich sind, gehören die Ras-Proteine. In tierischen Zellen werden die vier Proteine H-Ras, N-Ras, K-Ras4B sowie K-Ras4A, die von den klassischen drei *ras*-Genen kodiert werden, beinahe ubiquitär exprimiert, auch wenn sich das Expressionslevel je nach Gewebe und Entwicklungsstadium der Zelle unterscheidet.^[59,60] Diese Proteine werden der Familie der kleinen GTPasen (ca. 21 kDa) zugeordnet, die als molekulare Schalter zwischen einer inaktiven Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen und einer aktiven Guanosintriphosphat (GTP)-gebundenen Konformation wechseln können (siehe Abb. 1.6).^[61] Die Aktivierung von Ras wird durch den GTP-Austauschfaktor GEF (*guanine exchange factor*) reguliert, indem die Dissoziation des gebundenen GDP erleichtert und durch das in der Zelle häufiger vorkommende GTP ausgetauscht wird.^[62] Durch den GEF-katalysierten Austausch von GDP durch GTP wird eine Konformationsänderung in den *Switch*-Regionen, *Switch I* und *Switch II*, induziert, sodass eine Interaktionsstelle für die nachgeschalteten Effektorproteine exponiert wird. Demnach kann die intrazelluläre Signalkaskade nur von der GTP-gebundenen Ras-Form induziert werden.^[63] Obwohl das Ras-Protein eine intrinsische GTPase-Aktivität besitzt, wird die GTP-Hydrolyse durch ein GTPase-aktivierendes Protein (*GTPase activating protein*, GAP) um einige Größenordnungen beschleunigt, sodass eine rapide Inaktivierung der Ras-Proteine gewährleistet wird und die Signalweiterleitung schnell unterbunden werden kann.^[62]

Die katalytisch aktive G-Domäne (AS 1-166) (siehe Abb. 1.5) wird in die *N*-terminale Effektordomäne (AS 1-86), die den größten Teil der Nukleotidbindestelle und die Interaktionsstelle für die Effektorproteine enthält, und den *C*-terminalen allosterischen Bereich (AS 87-171), der die membranwechselwirkenden Teile des Ras-Proteins umfasst, unterteilt. Während die Sequenz aller Ras-Isoformen in der *N*-terminalen Effektordomäne zu 100 % identisch ist, liegt die Sequenzidentität im *C*-terminalen allosterischen Bereich bei 90 %.^[64] Ob diese geringen Sequenzunterschiede zu den isoformspezifischen Funktionen der Ras-Proteine beitragen, ist noch weitgehend unbekannt. Allerdings spielt der allosterische Bereich eine wichtige Rolle für die Konformation der *Switch II*-Region und beeinflusst die Orientierung der Ras-Proteine an der Membran, welche sich wiederum auf die Wechselwirkungen mit den Effektorproteinen auswirken können.^[66,67]

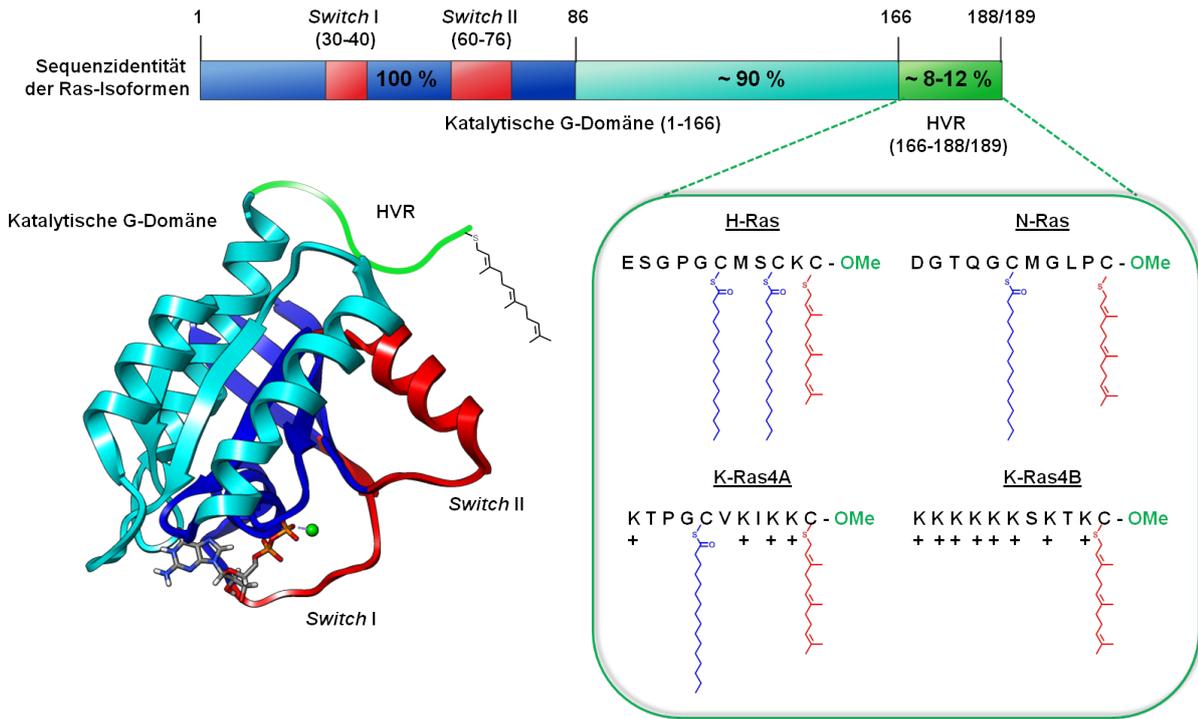


Abb. 1.5: Sequenzidentität, Struktur und Membrananker der Ras-Isoformen. Die katalytischen G-Domänen (1-166) der Ras-Isoformen sind hoch konserviert (90-100 % identisch), wohingegen sich die Sequenzen der C-terminalen HVR deutlich unterscheiden (8-12 % identisch). Exemplarisch ist die G-Domäne von K-Ras4B in der GDP-gebundenen Form (PDB-ID-Code: 4OBE) dargestellt. Die HVR enthält die isoformspezifische Ankersequenz. Dabei erhalten alle vier Ras-Isoformen eine Farnesylgruppe am C-terminalen carboxymethylierten Cys. Als sekundäres Membranbindungsmotiv besitzt K-Ras4B eine polybasische Sequenz aus insgesamt acht Lysinresten, während N-Ras sowie K-Ras4A über eine weitere Palmitoylgruppe und H-Ras über zwei weitere Palmitoylgruppen in ihrer Ankersequenz verfügen. Die Proteinstruktur wurde mit Chimera^[65] (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) dargestellt und modifiziert.

Die sich überschneidenden und dennoch verschiedenen Funktionen der Ras-Proteine in der Zelle können jedoch vorwiegend auf die C-terminale hypervariable Region (HVR) (AS 167-188/189) zurückgeführt werden. Im Gegensatz zur katalytischen G-Domäne weist diese extreme Sequenzunterschiede innerhalb der vier Ras-Isoformen auf. Die HVR besteht aus einem unstrukturierten Linker und einer isoformspezifischen Membranankerregion, die für die Membranbindung der Ras-Proteine verantwortlich ist und deren subzelluläre Verteilung bestimmt. Dadurch erreichen sie verschiedene Effektor- und Regulatorproteine, die letztendlich für die isoformspezifischen Zellantworten verantwortlich sind^[68,69] Nach der Synthese durchlaufen die zytosolischen Ras-Vorstufen eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen. Hierbei überträgt zunächst die Farnesyltransferase eine Farnesylgruppe auf das Cys im C-terminalen CAAX-Motiv. Daraufhin wird das farnesylierte Ras an die zytosolische Oberfläche des ER transportiert, wo die Endopeptidase Rce1 das Tripeptid AAX entfernt. Der neu entstandene C-Terminus am farnesylierten Cys wird durch das Enzym Icmt methyliert. Während H-Ras, N-Ras und K-Ras4A im Golgi-Apparat an zwei bzw. einem weiteren Cys in der HVR palmitoyliert werden und über den sekretorischen Weg zur Plasmamembran transportiert werden, besitzt die Spleißvariante K-Ras4B keine

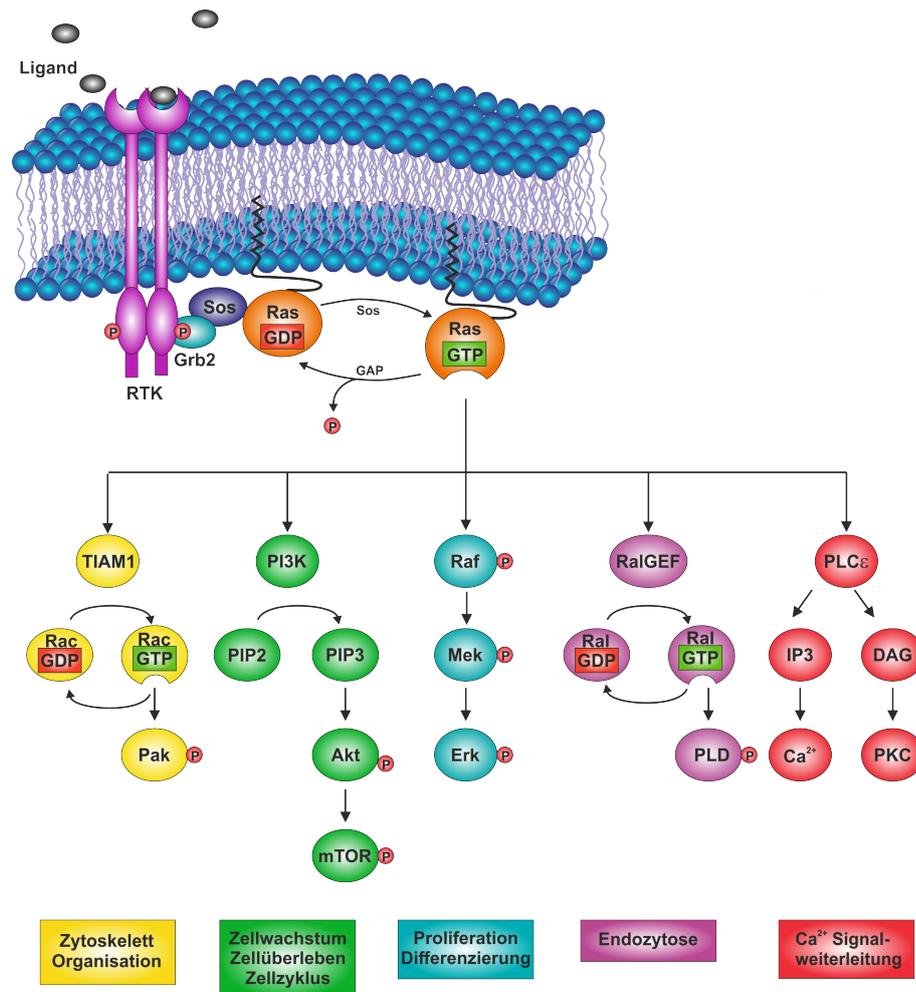


Abb. 1.6: Ras-Signalwege werden durch Bindung von Liganden, wie Wachstumsfaktoren, an deren Rezeptortyrosinkinasen stimuliert. Die darauffolgende Dimerisierung und Transphosphorylierung der Transmembranrezeptoren hat zur Folge, dass zytosolische Adapter- und GEF-Proteine zur Plasmamembran rekrutiert werden, die die kleine GTPase Ras aktivieren. Im GTP-gebundenen Zustand bindet Ras eine Vielzahl von nachgeschalteten Effektorproteinen und moduliert damit zahlreiche Signalkaskaden.

weiteren Lipidmodifikationen, sondern einen polybasischen Bereich mit insgesamt acht Lys-Resten, der als sekundäres Membranbindungsmotiv dient (siehe Abb. 1.5).^[57,68]

Zu den wichtigsten und am meisten untersuchten Ras-Effektoren gehört die Raf-Kinase, die eine wichtige Komponente des mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalwegs darstellt (siehe Abb. 1.6). Dieser Signalweg ist für die Kontrolle mehrerer zellulärer Funktionen wie die Zellproliferation zuständig. Der MAPK-Signalweg wird durch die Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) an den EGF-Rezeptor aktiviert. Nach der Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors wird das Adapterprotein Grb2 an das Rezeptorprotein gebunden. Grb2 bindet wiederum das als GEF-fungierende Sos-Protein, welches das membranassoziierte Ras-Protein aktiviert. Das GTP-gebundene Ras rekrutiert daraufhin die Kinase Raf zur Plasmamembran, die zur Aktivierung weiterer Kinasen und Transkriptionsfaktoren, welche mit der Zellproliferation assoziiert sind, führt.^[70] Neben Raf wurden mindestens sechs weitere Proteinfamilien als Ras-Effektoren identifiziert, wie z.B. die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die den anti-apoptotischen PI3K-Signalweg einleitet

oder das Ral-spezifische GEF-Protein, das an der Regulation des vesikulären Transports beteiligt ist. Die Fähigkeit dieser Effektoren zur Onkogenese beizutragen, beruht zum Teil darauf, dass mutante Formen dieser Proteine selbst Onkoproteine darstellen. Ein weiterer wichtiger Ras-Effektor ist das Rac-spezifische GEF-Protein, das eine wichtige Rolle in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts spielt. Die PLC ϵ (Phospholipase C- ϵ) ist ein weiterer Ras-Effektor, der für die Produktion der zwei sekundären Botenstoffe Diacylglycerol und Ca²⁺ verantwortlich ist.^[57]

Daraus wird deutlich, dass Änderungen in den Ras-vermittelten Signalweiterleitungen zu karzinogenen Prozessen beitragen können. Punktmutationen in den H-, N- oder K-*ras*-Protoonkogenen führen häufig zu Konformationsänderungen in den korrespondierenden Ras-Proteinen, durch welche die effiziente GTP-Hydrolyse verhindert wird, sodass eine anhaltende, nicht mehr regulierbare Aktivität der kleinen GTPase hervorgerufen wird. Solch aktivierende Mutationen in einem der drei *ras*-Gene werden in etwa 20-30 % aller menschlichen Tumore beobachtet. Aus diesem Grund werden unterschiedliche Ansätze verfolgt, um gezielte Therapien für Ras-induzierte Krebserkrankungen zu entwickeln.^[71,72]

1.2.3 Src-Protein

Zu den peripheren Membranproteinen gehören auch die lipidierten Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase der Src-Familie (*src family kinase*, SFK), die eine zentrale Rolle in der intrazellulären Signalweiterleitung spielen. Dadurch sind die SFKs an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse, wie z.B. der Zellproliferation und -differenzierung, beteiligt. Die Src-Familie umfasst elf strukturell verwandte Mitglieder, die eine konservierte Domänenstruktur aufweisen. Die gemeinsame Struktur besteht aus einem myristoylierten N-terminalen SH4-Segment, den beiden regulatorischen SH3- und SH2-Domänen, der enzymatischen Tyrosinkinase-Domäne (SH1) sowie einem regulatorischen C-terminalen Segment (siehe Abb. 1.7).^[73,74] Diese konservierte Domänenanordnung deutet auf einen gemeinsamen Regulationsmechanismus hin. Die Aktivität der Src-Kinasen wird allosterisch durch zwei intramolekulare Bindungsereignisse gesteuert. Zum einen bindet die C-terminale Region an die SH2-Domäne, wenn der autoinhibierende Tyrosinrest Tyr530 (humanes Src) innerhalb des C-Terminus phosphoryliert wird. Zum anderen bilden die SH2- und SH3-Domäne intramolekulare Wechselwirkungen mit der Kinasedomäne aus, sodass die Aktivierungsschleife in der katalytischen SH1-Domäne eine kompakte helikale Struktur bildet. Dadurch blockiert sie die katalytische Bindestelle und verhindert die Autophosphorylierung von Tyr419, die jedoch für eine vollständige Aktivierung und Kinaseaktivität erforderlich ist.^[73,75]

Die Aktivität der SFKs wird zudem über die subzelluläre Lokalisation reguliert, denn in der inaktiven Form sind die Src-Kinasen vorwiegend an den Endomembranen lokalisiert, werden jedoch nach der Aktivierung über verschiedene Mechanismen zur Plasmamembran

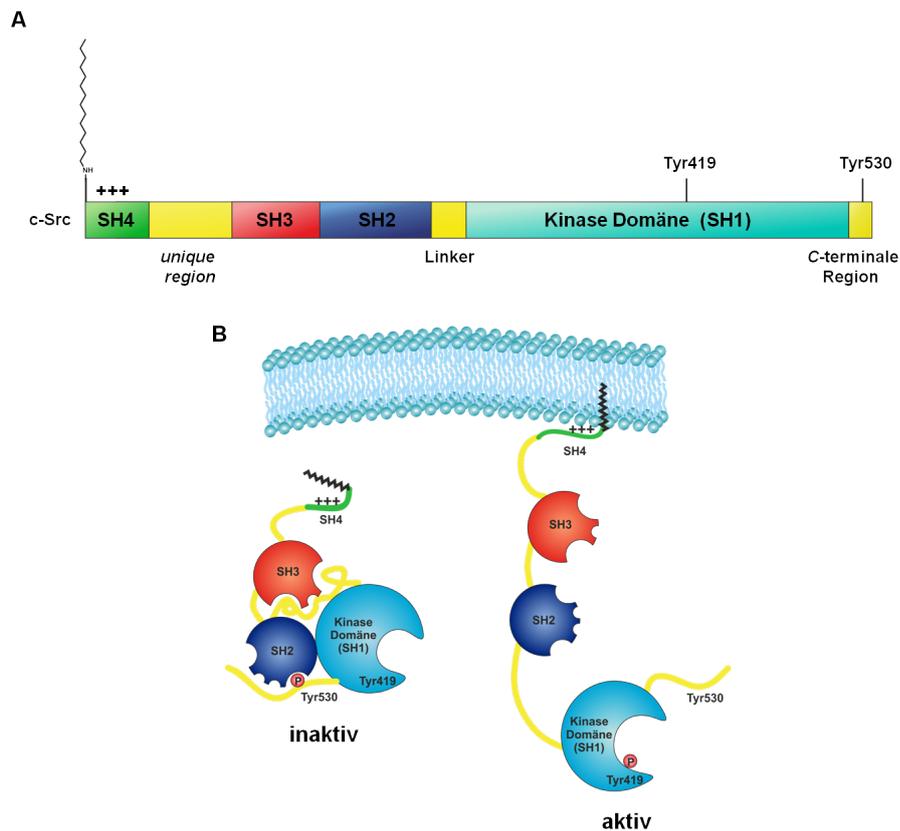


Abb. 1.7: Die Struktur von c-Src umfasst ein *N*-terminales SH4-Segment, das sowohl einen Myristoylanker als auch eine polybasische Sequenz enthält, die beiden regulatorischen SH3- und SH2-Domänen, die enzymatische Tyrosinkinase-Domäne (SH1) sowie ein regulatorisches *C*-terminales Segment (A). Wenn das autoinhibierende *C*-terminale Tyr530 phosphoryliert ist, bindet dieses Segment an die SH2-Domäne. Aus dieser Interaktion sowie aus der Bindung der SH2- und SH3-Domäne mit der Kinasedomäne resultiert eine geschlossene inaktive Konformation. Umgekehrt erfolgt die Aktivierung von c-Src, wenn Tyr530 dephosphoryliert und die autoinhibierenden Interaktionen gelöst werden, wodurch das Protein eine offene und aktive Form annimmt. Die vollständige Aktivierung erfordert eine Phosphorylierung von Tyr419 in der katalytischen Domäne (B).

transportiert.^[76–79] Dort interagieren die SFKs schließlich mit nachgeschalteten Effektorproteinen, wodurch die intrazelluläre Signalweiterleitung induziert wird.

Für die Bindung der SFKs an die Membran ist die *N*-terminale SH4-Region verantwortlich, die ein *N*-myristoyliertes Gly enthält. Zusätzlich besitzen die meisten SFKs einen bzw. zwei Cys-Reste in der SH4-Region, die als Palmitoylierungsstelle dienen. Eine Ausnahme stellt das bekannteste Mitglied der Src-Kinasen c-Src dar. Dieses weist neben dem Myristoylanker keine weiteren Lipidmodifikationen auf, stattdessen umfasst die SH4-Region von c-Src eine polybasische Sequenz. Diese basischen Aminosäuren können elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phospholipiden, die sich vermehrt auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran befinden, ausbilden. Sowohl die zusätzlichen Palmitoylmodifikationen als auch die polybasische Sequenz in der SH4-Region erhöhen die Membranaffinität der SFKs.^[80]

Die strukturellen Ähnlichkeiten innerhalb der katalytischen Domäne sowie der regulatorischen SH2- und SH3-Domänen weisen auf eine funktionelle Redundanz der SFKs hin.

Verschiedene Studien haben dennoch gezeigt, dass sich die Phänotypen von Knockout-Mäusen und Zellen, in denen die einzelnen SFK-codierenden Gene deaktiviert wurden, sehr stark unterscheiden, was auf die funktionelle Spezifität der verschiedenen SFKs hindeutet.^[81] Ähnlich wie bei den Ras-Proteinen wird vermutet, dass die spezifischen Funktionen der einzelnen SFKs auf die Unterschiede in dem Lipidierungsmuster zurückzuführen sind, denn dieses reguliert maßgeblich die subzelluläre Verteilung der Proteine. Zum Beispiel wurde berichtet, dass palmitoylierte Proteine über den sekretorischen Weg zur Plasmamembran transportiert werden, wohingegen c-Src vom rezyklierenden Endosom (*recycling endosome*, RE) nahe der perinuklearen Region über einen aktinabhängigen Transportpfad zur Plasmamembran befördert wird.^[77,78] Des Weiteren wird angenommen, dass die palmitoylierten SFKs, wie z.B. Fyn, im Gegensatz zu c-Src bevorzugt mit den *raft*-Domänen der Plasmamembran assoziieren. Da den Src-Kinasen in den unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle und in den Subdomänen der Plasmamembran andere Interaktionspartner zur Verfügung stehen, können alternative Signalkaskaden und damit zelluläre Reaktionen ausgelöst werden.^[82,83] Folglich ist die subzelluläre Verteilung nicht nur ein wichtiger Regulationsmechanismus für die Aktivität der SFKs, sondern moduliert auch die spezifischen Funktionen dieser Src-Kinasen.

In einer Vielzahl von menschlichen Tumoren wurde im Vergleich zu normalem Gewebe eine Überexpression und/oder erhöhte Kinaseaktivität von c-Src beobachtet, weshalb es ein wichtiges Zielmolekül für die Krebstherapie darstellt.^[84] Einen möglichen Ansatz bietet die Inhibierung der Membranbindung von c-Src, da in frühen Studien gezeigt wurde, dass die Assoziation von c-Src mit der Plasmamembran eine zentrale Rolle bei der zellulären Transformation spielt.^[85,86] Daher ist es wichtig, die Regulationsmechanismen für die subzelluläre Lokalisation der Src-Kinasen im Detail zu untersuchen.

1.2.4 Regulation der Membranbindung lipidierter Proteine

Die Lokalisation lipidmodifizierter Proteine an der Plasmamembran ist essentiell für deren Interaktionen mit den nachgeschalteten Effektorproteinen, welche die Spezifität und Effektivität der intrazellulären Signalweiterleitung modulieren. Daher existieren viele Mechanismen in der Zelle, um die Membranbindung solcher Proteine sowie deren Freisetzung von der Membran zu regulieren. Beispielsweise können durch die Phosphorylierung einer AS, z.B. eines Serinrestes, innerhalb der polybasischen Sequenz die elektrostatischen Interaktionen zwischen Lipoproteinen und der negativ geladenen Phospholipide in der Plasmamembran geschwächt werden. Dies kann die Dissoziation einiger Lipoproteine, wie z.B. des myristoylierten MARCKS oder des farnesylierten K-Ras4B Proteins, von der Plasmamembran erleichtern.^[53,87,88]

Im Gegensatz zu den restlichen Lipidmodifikationen ist die *S*-Palmitoylierung reversibel, da die labile Thioesterbindung spontan oder mithilfe von Thioesterasen gespalten wer-

den kann. Auf diese Weise kann die Membranbindung einiger palmitoylierter Proteine, wie z.B. N-Ras und H-Ras, durch einen stetigen enzymkontrollierten Palmitoylierungs/-Depalmitoylierungszyklus reguliert werden. Diese beiden Ras-Isoformen werden nach der Farnesylierung an der ER-Membran im Golgi-Apparat palmitoyliert, von wo sie anschließend über den sekretorischen Weg zur Plasmamembran befördert werden. Die Depalmitoylierung führt zur Freisetzung der farnesylierten N- und H-Ras-Proteine von der Plasmamembran. Anschließend werden diese über einen nicht-vesikulären Transport zurück zum Golgi-Apparat gebracht, wo sie erneut palmitoyliert werden können. Dadurch kann die subzelluläre Lokalisation dieser beiden Proteine und folglich deren Aktivität gesteuert werden.^[54,89]

Dahingegen sind die Myristoyl- und Prenylgruppe über eine stabile Amid- bzw. Thioetherbindung an die Proteine gebunden, die für gewöhnlich während der Lebensdauer eines Proteins *in vivo* nicht gespalten werden. Infolgedessen muss die Dissoziation myristoylierter und farnesylierter Proteine von der Membran durch andere Mechanismen reguliert werden.^[90]

N-Myristoylierung

In einer Vielzahl von N-myristoylierten Proteinen wird die Membranbindung über einen sogenannten Myristoylschalter vermittelt. Diese Proteine können zwei verschiedene Konformationen annehmen, bei denen die Myr-Gruppe entweder exponiert vorliegt oder in einer intramolekularen hydrophoben Bindungstasche verborgen ist. Dadurch kann die Bindung bzw. Dissoziation des Proteins reguliert werden. Diese Konformationsänderung kann durch die Bindung kleiner Liganden, wie z.B. Ca^{2+} , oder durch Protein-Protein-Interaktionen induziert werden.^[91,92]

Darüber hinaus wird der zytosolische Transport und die subzelluläre Verteilung myristoylierter Proteine von molekularen Chaperonen, wie z.B. UNC119A/B, gesteuert. Diese Proteine bestehen aus einem Immunoglobulin-ähnlichen Sandwich, dessen β -Faltblätter eine hydrophobe Bindungstasche bilden, in die der Myristoylanker der lipidierten Proteine eingelagert werden kann, um ihn von der wässrigen Umgebung im Zytosol abzuschirmen.^[93] Erst kürzlich wurde gezeigt, dass UNC119 an dem Transport der SFKs zur Plasmamembran beteiligt ist, indem es die myristoylierten Proteine im Zytosol bindet, deren Diffusion erhöht und am RE mithilfe der sich dort aufhaltenden Arl2/3 Proteine freisetzt. Die Tyrosinkinase c-Src bleibt über elektrostatische Wechselwirkungen an dem RE gebunden, bis es mittels vesikulären Transports zurück zur Plasmamembran transportiert wird.^[94]

S-Prenylierung

Ähnlich wie bei den myristoylierten Proteinen wird die Membranbindung prenylierter Proteine und deren Transfer zwischen den zellulären Membranen vor allem durch molekulare Chaperone reguliert. Diese können die Prenylgruppe in ihre hydrophoben Bindungstasche aufnehmen, sodass die Löslichkeit der lipidmodifizierten Proteine im Zytosol erhöht wird. Auf diese Weise wird der Intermembrantransfer der geranylgeranylierten Proteine der Rho- und Rab-Familie u.a. von den GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDI), RhoGDI und RabGDI, kontrolliert. Bei der Extraktion binden diese Regulatoren zunächst an die katalytische Domäne der membrangebundenen GTPasen, woraufhin die Insertion der Prenylgruppe in die hydrophobe Bindungstasche der GDIs ermöglicht wird. Dies resultiert schließlich in der Dissoziation der lipidmodifizierten Proteine von der Membran.^[95,96] Aufgrund der hohen Affinität der GDIs zu den geranylgeranylierten Proteinen erfolgt die Freisetzung aus der hydrophoben Tasche nicht spontan, sondern benötigt weitere Faktoren, die diesen Prozess begünstigen. Im Fall der Rab-Proteine wurde z.B. das integrale Membranprotein *GDI displacement factor* (GDF) identifiziert, welches die Dissoziation des Rab-Proteins aus dem GDI-Komplex katalysiert.^[97] Die GDIs regulieren jedoch nicht nur den Transfer der Rho- und Rab-Proteine zwischen den zellulären Membranen, sondern auch deren Aktivität. Die Interaktionen mit der katalytischen Domäne der GTPasen verhindern den GEF-katalysierten Nukleotidaustausch, sodass die inaktive, GDP-gebundene Form stabilisiert wird.^[98]

Demgegenüber zählen u.a. Galektin-1 und Galektin-3 zu den farnesylbindenden Chaperonen die spezifisch mit H-Ras und K-Ras4B interagieren. Obwohl einige Studien gezeigt haben, dass sie die Lokalisation der jeweiligen Ras-Isoform an der Plasmamembran begünstigen,^[99,100] wurden diese Interaktionen kaum charakterisiert. Ein anderes Ras-bindendes Protein, das die Lokalisation der farnesylierten Ras-GTPasen an der Plasmamembran reguliert, ist PDE δ .^[101,102] Ähnlich wie das homologe UNC119A/B und RhoGDI Protein besteht PDE δ aus einem Immunoglobulin-ähnlichen β -Sandwich, das eine hydrophobe Tasche bildet, in die bevorzugt ein Farnesylanker aufgenommen werden kann. Im Gegensatz zu den GDIs bindet PDE δ die farnesylierten Ras-Proteine unabhängig vom nukleotidgebundenen Zustand, da in PDE δ anders als in RhoGDI die Bindestelle für die katalytische Domäne der GTPasen fehlt.^[101]

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass das Ca²⁺-bindende Protein Calmodulin (CaM) an der Dissoziation von K-Ras4B beteiligt ist, wodurch die nachgeschaltete Signaltransduktion verhindert wird, während die Lokalisation und Aktivität der anderen beiden Ras-Isoformen N-Ras und H-Ras nicht beeinflusst werden.^[103,104] Die isoformspezifische Bindung basiert auf den strukturellen Unterschieden in der HVR der drei Ras-Proteine. Neben dem Farnesylanker trägt nämlich auch die polybasische Sequenz in K-Ras4B signifikant zur Bindung an CaM bei, da sich auf der Proteinoberfläche von CaM viele

negativ geladene AS befinden, die elektrostatische Wechselwirkungen mit den Lys-Resten in der K-Ras4B-HVR ausbilden können.^[105,106] Im Gegensatz zu den anderen Chaperonen, deren hydrophobe Bindetasche aus einem Immunoglobulin-ähnlichen β -Sandwich gebildet wird, nimmt die Ca^{2+} -gebundene Form von CaM eine hantelförmige Struktur an, in der die globulären *N*- und *C*-terminalen Domänen durch einen flexiblen α -helikalen Linker verbunden sind. Bei der Bindung seiner Zielproteine kann CaM allerdings eine kompakte Konformation annehmen, in der die hydrophoben AS-Reste der beiden globulären Domänen einen hydrophoben Tunnel bilden. Obwohl bislang detaillierte Strukturinformationen zu dem CaM/K-Ras4B-Komplex fehlen, deutet die Kristallstruktur eines Ca^{2+} -gebundenen CaM-Komplexes mit einem *N*-myristoylierten Peptid, das ebenfalls eine polybasische Sequenz enthält,^[107] auf die Aufnahme des Lipidankers in die hydrophoben Taschen von CaM hin.

Da all diese Regulatoren die Bindung und Freisetzung der lipidierten Proteine an die bzw. von der Plasmamembran und damit die von den Lipoproteinen induzierte intrazelluläre Signalweiterleitung beeinflussen, stellen sie ein potentiell wirkstoffziel in einer Vielzahl von Krankheiten dar. Obwohl heutzutage klar ist, dass die Lipidmodifikation selbst sowie die Regulatoren die subzelluläre Lokalisation lipidierter Proteine beeinflussen, stellt sich immer noch die Frage, wie diese Interaktionen zur korrekten Lokalisation der Lipoproteine führen und ob weitere Faktoren daran beteiligt sind.

Zielsetzung

Lipidmodifizierte Ras-Proteine und Src-Kinasen spielen als periphere Membranproteine eine zentrale Rolle in zahlreichen zellulären Signalwegen, die verschiedene Prozesse in der Zelle regulieren, was jedoch auch ihr onkogenes Potential widerspiegelt. Die Aktivität und Funktion dieser Proteine steht im engen Zusammenhang mit ihrer Lokalisation an der Plasmamembran und anderen Endomembranen. Aus diesem Grund stellt die Inhibierung der Membranassoziation dieser lipidierten Proteine einen potentiellen therapeutischen Ansatz für die Krebsbehandlung dar. Das Ziel dieser Arbeit ist daher, die Wechselwirkungen zwischen den lipidierten Proteinen und Membranen sowie verschiedenen Regulatorproteinen mithilfe biophysikalischer Methoden zu charakterisieren.

- (I) Zunächst soll ein fluoreszenzmarkiertes K-Ras4B-Protein, das einen methylierten *C*-Terminus und eine Farnesylgruppe am *C*-terminalen Cystein enthält, über einen semisynthetischen Ansatz hergestellt werden.
- (II) Anschließend soll der Einfluss der Membranzusammensetzung auf die Segregation und laterale Organisation lipidierter Ras-Proteine in phasenseparierten Modellmembran untersucht werden. Zum einen soll überprüft werden, ob monovalente anionische Lipide wie PS Auswirkungen auf die räumliche Verteilung des polybasischen K-Ras4B-Proteins in Membranen mit l_d/l_o -Phasenkoexistenz haben. Zum anderen sollen komplexe zelluläre Membransysteme in An- und Abwesenheit von nativen Membranproteinen verwendet werden, um deren Einfluss auf die räumliche Verteilung und Clusterbildung der beiden Ras-Isoformen K-Ras4B und N-Ras zu studieren.
- (III) Die Dissoziation von K-Ras4B wird u.a. von dem äußerst flexiblen Ca^{2+} -bindenden Protein Calmodulin reguliert. Hier sollen zum einen die Strukturänderungen von Calmodulin in Anwesenheit des farnesylierten *C*-Terminus von K-Ras4B charakterisiert werden. Mithilfe druckabhängiger Untersuchungen sollen zum anderen

Konformationssubzustände von Calmodulin im Ca^{2+} -freien und -gebunden Zustand sowie im Komplex mit der hypervariablen Region von K-Ras4B identifiziert werden.

- (IV) In einem weiteren Projekt soll der Bindungsmechanismus der myristoylierten *N*-terminalen Sequenz von c-Src unter Verwendung von kinetischen Studien aufgeklärt werden. Des Weiteren soll untersucht werden, welchen Einfluss der myristoylbindende Chaperon UNC119A auf die Assoziation und Dissoziation von c-Src mit bzw. von der Membran hat. Außerdem soll der inhibierende Effekt von Squarunkin A auf UNC119A in Anwesenheit von Membranen überprüft werden.
- (V) Darüber hinaus soll der Einfluss der molekularen Pinzette CLR01 auf virale Modellmembranen mit l_d/l_o -Phasenkoexistenz untersucht werden, da diesem Molekül eine antivirale Wirkung zugeschrieben wird.
- (VI) Abschließend soll eine temperierbare Hochdruckzelle für die Mikroskopie entwickelt werden, die zur Visualisierung von Hochdruckeffekten auf biologische Systeme verwendet werden kann.

Semisyntese eines posttranslational modifizierten K-Ras4B-Proteins

3.1 Einleitung

Wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, durchlaufen die Ras-Proteine posttranslationale Modifikationen, bei denen das *C*-terminale Cys farnesyliert, der *C*-Terminus methyliert und weitere Cys-Reste in der HVR isoformspezifisch palmitoyliert werden. Die Lipidmodifikationen erhöhen u.a. die Membranaffinität der Ras-Proteine, wodurch sie deren subzelluläre Verteilung beeinflussen. Die Lokalisation an der Plasmamembran ist ein kritischer Parameter für die Aktivität der Ras-Proteine und somit für die intrazelluläre Signalweiterleitung, die durch diese Proteine vermittelt wird.^[68,69,108]

Biophysikalische Untersuchungen dieser Proteine erfordern präparative Mengen des vollständig posttranslational modifizierten, funktionalen und gegebenenfalls fluoreszenzmarkierten Proteins. Die Herstellung solch modifizierter Proteine kann in eukaryotischen Expressionssystemen, wie z.B. Hefe,^[109] *Dictyostelium discoïdum*^[110,111] und Baculovirus-infizierten Insektenzellen,^[112] erfolgen, da die rekombinanten Proteine bei der eukaryotischen Expression im Gegensatz zu bakteriellen mit den erforderlichen posttranslationalen Modifikationen versehen werden. Das langsame Zellwachstum, die geringe Expressionsrate sowie die aufwendige und anspruchsvolle Kultivierung stellen jedoch maßgebliche Nachteile der eukaryotischen Expression dar. Dahingegen weisen bakterielle Expressionssysteme, wie z.B. *E. coli*,^[113] im Allgemeinen hohe Ausbeuten, schnelles Wachstum und hohe Expressionsraten auf. Zudem verläuft die Kultivierung der Bakterienzellen schnell und einfach. Um die Vorteile der bakteriellen Expression trotz der fehlenden posttranslationalen Modifizierungsmaschinerie zu nutzen, kann ein semisyntetischer Ansatz für die Herstellung posttranslational modifizierter Proteine verfolgt werden.^[114] Dabei wird das rekombinante Protein verkürzt in *E. coli* exprimiert und die modifizierte *N*- oder *C*-terminale Peptid-

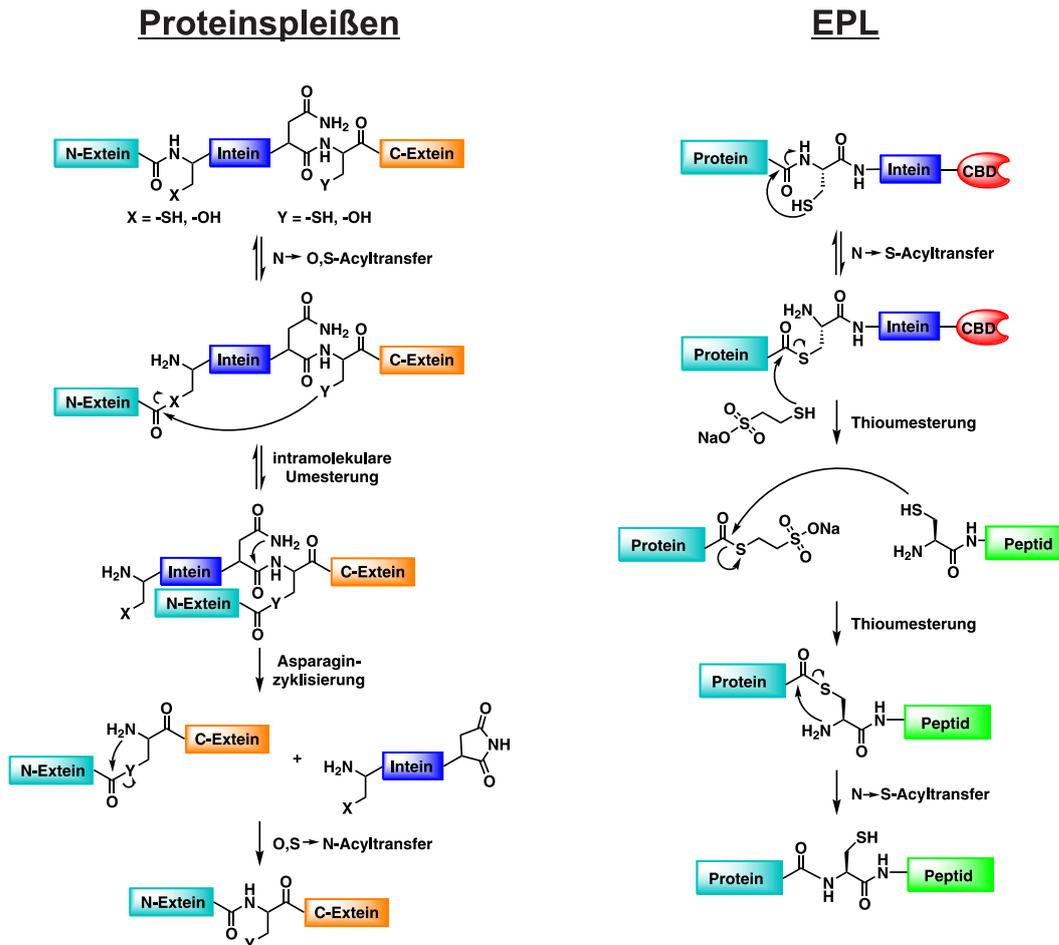


Abb. 3.1: Mechanismus der Proteinspleißreaktion (links) und der *Expressed Protein Ligation* (EPL) (rechts).

sequenz nach erfolgreicher Synthese an das Protein ligiert. Die am häufigsten verwendeten Ligationstechniken für die Ras-Proteine stellen die *Expressed Protein Ligation* (EPL), die Maleimidocaproyl (MIC)-Ligation oder die Sortase-vermittelte Ligation dar.^[114]

Bei der EPL wird ein Proteinthioester durch eine Modifikation des natürlichen Proteinspleißprozesses (siehe Abb. 3.1 links) erzeugt. Beim Proteinspleißen wird die sogenannte Inteindomäne, die von zwei Exteindomänen flankiert wird, autokatalytisch herausgeschnitten, wodurch die beiden Exteindomänen über eine native Amidbindung verknüpft werden. Anfänglich erfolgt am *N*-terminalen Cys-Rest des Inteins ein reversibler $N \rightarrow S$ -Acytransfer, der zur Bildung eines Thioesters zwischen dem Intein und dem *N*-terminalen Extein führt. Im nächsten Schritt findet an dem generierten Thioester eine Umesterung durch den Cys-Rest, der sich in der *C*-terminalen Exteindomäne in der Nähe des Inteins befindet, statt. Dadurch werden die beiden Exteindomänen zusammengeführt und ein verzweigtes Intermediat entsteht. Nach einer Zyklisierungsreaktion des konservierten Asparagin (Asn)-Restes am *C*-Terminus der Inteindomäne wird das Intein abgespalten. Am Thioester, der die beiden Exteine verknüpft, erfolgt nun ein $S \rightarrow N$ -Acytransfer, durch den sich eine stabile Amidbindung zwischen den Exteindomänen bildet. Bei der EPL wird das Zielprotein mit einer Inteindomäne fusioniert, wobei die Spleißreaktion durch

die Mutation des konservierten Asn zu Alanin (Ala) nach der Bildung des Thioesters inhibiert wird (siehe Abb. 3.1 rechts). Eines der Exteine wird dabei als Affinitätstag verwendet. In diesem Fall wird eine chitinbindende Domäne (CBD) eingesetzt, die eine Reinigung des Proteins über eine Chitinsäule ermöglicht. Vor der Konjugation des lipidierten Peptids wird das rekombinante Protein durch einen Überschuss eines Thiols, wie z.B. Natrium-2-sulfanylethansulfonat (Mesna), von der Säule freigesetzt, was zur Bildung eines Thioesters am *C*-Terminus des rekombinanten Proteins führt. Dieser kann schließlich mit dem lipidierten Peptid, das einen *N*-terminalen Cys-Rest enthält, über eine Umes-terungsreaktion ligiert werden.^[115,116] Der N→S-Acyltransfer resultiert in einer nativen Amidbindung zwischen dem rekombinanten Protein und dem lipidierten Peptid wie bei der nativen chemischen Ligation (NCL).^[117] Der Vorteil dieser Ligationsmethode im Vergleich zur MIC-Ligation ist die Ausbildung einer nativen Amidbindung, für die kein weiterer unnatürlicher Linker eingeführt werden muss.^[118] Die Sortase-vermittelte Ligation erfordert ebenfalls die Einführung einer nicht-nativen Peptidsequenz,^[119] die die Funktion des Proteins beeinflussen könnte. Aus diesem Grund wird für die Synthese des *S*-farnesylierten und carboxymethylierten K-Ras4B-Proteins eine EPL mit einem synthetischen Lipopeptid nach einem bekannten Protokoll^[120] durchgeführt.

3.2 Material & Methoden

3.2.1 Material

Die Chemikalien, die für die Semisynthese des posttranslational modifizierten und BODIPY-markierten K-Ras4B-Proteins verwendet wurden, sind in Tabelle 3.1 zusammengetragen.

Tab. 3.1: Bezugsquellen der Chemikalien und Reagenzien für die Semisynthese von K-Ras4B.

Chemikalien	Bezugsquelle
Acetonitril	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (29:1)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ampicillin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Bromphenolblau Natriumsalz	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Chloramphenicol	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Coomassie [®] Brilliantblau R 250	Serva (Heidelberg, Deutschland)
DMF (<i>N,N</i> -Dimethylformamid)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
DTE (1,4-Dithioerythritol)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Essigsäure	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hefeextrakt	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
KH ₂ PO ₄	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
K ₂ HPO ₄	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Mesna	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
MgCl ₂	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumacetat (NaOAc)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
NaCl	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
TFA (Trifluoressigsäure)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Trypton	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

3.2.2 Proteinexpression und -reinigung

Die für die Expression und Reinigung von K-Ras4B Δ 15-Thioester verwendeten Nährmedien und Puffer sind in Tabelle 3.2 zusammengetragen. Nachdem das Gen für die ersten 174 AS des humanen K-Ras4B in den pTWIN2-Vektor (ImpactTM-System, New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland) kloniert worden war, wurde das generierte Plasmid (siehe Abb. A.1) in *E.coli* BL21 (T7 Express *lysY* Competent, New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland) transformiert. Die Zellen wurden anschließend auf selektivem LB-Nährboden ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Kolonien in 200 mL LB-Medium suspendiert und über Nacht bei 37 °C sowie 130 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden sechs Kolben mit je 1,5 L TB-Medium mit 25 mL der Vorkultur angeimpft und weiter bei 37 °C und 130 rpm inkubiert, bis eine Extinktion von etwa 0,6 bei 600 nm (OD₆₀₀) unter Verwendung eines Photometers (BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gemessen wurde. Daraufhin wurde die Expression des Proteins durch die Zugabe von je 0,4 mM IPTG induziert und die Kulturen über Nacht bei 15 °C und 130 rpm weiter im Inkubationsschüttler inkubiert. Schließlich wurden die Zellen bei 4 °C sowie 6000 rpm für 15 min in einer Zentrifuge sedimentiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden entweder bis zur Weiterverwendung bei –80 °C gelagert oder die Zellen wurden direkt aufgeschlossen.

Tab. 3.2: Verwendete Nährmedien und Puffer für die Expression und Reinigung von K-Ras4B.

Nährmedium	Zusammensetzung	Puffer	Zusammensetzung
LB-Medium ^{a,b}	5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Trypton, 10 g/L NaCl, pH = 7,4	Lysepuffer ^c	20 mM HEPES (pH = 7), 50 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100
	TB-Medium ^a		24 g Hefeextrakt, 12 g Trypton, 4 mL Glycerol, auf 900 mL dest. H ₂ O +
2,31 g KH ₂ PO ₄ , 12,54 g K ₂ HPO ₄ in 100 mL dest. H ₂ O		Lagerungspuffer	20 mM TRIS (pH = 7,4), 5 mM MgCl ₂

^a 100 mg/mL Ampicillin in dest. H₂O (1:1000 Verdünnung in den Kulturen) und 34 mg/mL Chloramphenicol in EtOH (1:1000 Verdünnung in den Kulturen).

^b + 1,5 % Bacto[®] Agar für LB-Agar.

^c + 1 mM PMSF in EtOH und eine Spatelspitze DNase

Für den Zellaufschluss wurden etwa 20 g geerntete Bakterienzellen in 200 mL Lysepuffer resuspendiert und mithilfe eines Ultraschallhomogenisators lysiert. Die unlöslichen Zellfragmente wurden in einer Zentrifuge bei 20.000 rpm und 4 °C für 30 min getrennt.

Der Überstand wurde mit dem Lysepuffer auf 500 mL verdünnt. Nach dem Filtrieren (0,45 μm Porendurchmesser) des Überstands wurde dieser langsam (ca. 16 h, 0,5 mL/min) auf eine Chitinsäule (50 mL Säulenvolumen (SV)), die zuvor mit dem Lysepuffer äquilibriert worden war, unter Verwendung eines ÄKTAprime plus-Systems (GE Healthcare, Solingen, Deutschland) aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch das Waschen mit Lysepuffer (8-10 SV) entfernt. Die Elution des K-Ras4B Δ 15-Proteins wurde durch Mesna induziert. Dafür wurde die beladene Säule für 12 h bei 4 °C mit dem Elutionspuffer (etwa 3 SV) inkubiert. Anschließend konnte das Protein durch weitere Zugabe des Elutionspuffers von der Säule eluiert werden. Die proteinenthaltenden Fraktionen wurden auf etwa 1 mL mithilfe von Zentrifugationsfiltern (Amicon[®] Ultra 15-10K, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) aufkonzentriert. Gleichzeitig wurde der Puffer gewechselt, indem die aufkonzentrierte Proteinlösung mehrmals im Lagerungspuffer verdünnt und anschließend wieder aufkonzentriert wurde. Die Proteinkonzentration wurde schließlich UV-spektroskopisch bei 280 nm bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.5.1).

3.2.3 Fluoreszenzmarkierung

Für die Modifikation mit BODIPY[®] FL wurde der K-Ras4B Δ 15-Thioester unter Verwendung einer HiTrap[™] Desalting-Säule (5 mL, GE Healthcare, Solingen, Deutschland) in einen 0,1 M NaHCO₃-Puffer (pH = 8,5) überführt. Nachdem die Konzentration UV-spektroskopisch bei 280 nm bestimmt worden war, wurde ein zehnfacher Überschuss an BODIPY[®] FL NHS-Ester (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aus einer Stammlösung ($c = 20 \text{ mg/mL}$) in DMF zur Proteinlösung gegeben. Die Proteinkonzentration lag meistens zwischen 1 und 4 mg/mL in einem Reaktionsvolumen von 300-1000 μL . Dabei wurde darauf geachtet, dass die DMF-Konzentration an dem gesamten Reaktionsvolumen $\leq 5 \%$ (v/v) war. Das Reaktionsgemisch wurde für mindestens 4 h bei 4 °C im Dunkeln gerührt. Die Reinigung des Proteins sowie der Austausch des Puffers erfolgte mithilfe einer HiTrap[™] Desalting-Säule (5 mL, GE Healthcare, Solingen, Deutschland), die zuvor mit dem Lagerungspuffer äquilibriert worden war. Im Anschluss wurde das fluoreszenzmarkierte Protein unter Verwendung von Zentrifugalfiltern (Amicon[®] Ultra 15-10K, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) aufkonzentriert.

Nach der Reinigung des fluoreszenzmarkierten Proteins kann der Markierungsgrad (*degree of labeling*, DOL) mittels Absorptionsspektroskopie unter Verwendung des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes (siehe Gl. 3.2) bestimmt werden. Hierfür wurde die Absorption sowohl am Absorptionsmaximums des Proteins bei 280 nm (A_{280} , siehe Abschnitt 3.2.5.1) als auch bei der Wellenlänge am Absorptionsmaximum des Fluorophors (A_{max}) gemessen. A_{280} muss um den Beitrag des Fluorophors zur Absorption bei dieser Wellenlänge, der durch den Korrekturfaktor (*correction factor*, CF_{280}) beschrieben wird, korrigiert werden. Für die Absorption des Proteins folgt schließlich: $A_{\text{Prot}} = A_{280} - A_{\text{max}} \cdot CF_{280}$. Bei bekann-

tem Extinktionskoeffizienten des Proteins bei 280 nm ($\varepsilon_{\text{Prot}}$) sowie des Fluoreszenzmarkers am Absorptionsmaximum (ε_{max}) kann die durchschnittliche Anzahl an Farbstoffmolekülen, die an ein Protein gekoppelt sind, gemäß folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{DOL} = \frac{c_{\text{Fluorophor}}}{c_{\text{Prot}}} = \frac{A_{\text{max}}/\varepsilon_{\text{max}}}{A_{\text{Prot}}/\varepsilon_{\text{Prot}}} = \frac{A_{\text{max}} \cdot \varepsilon_{\text{Prot}}}{(A_{280} - A_{\text{max}} \cdot \text{CF}_{280}) \cdot \varepsilon_{\text{max}}} \quad (3.1)$$

Die spektralen Eigenschaften des verwendeten Fluoreszenzmarkers sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tab. 3.3: Spektrale Eigenschaften von BODIPY[®] FL.

	λ/nm	$\varepsilon_{\lambda}/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	CF_{280}
BODIPY[®] FL	504	68.000	0,04

Die Absorptionmessungen wurden unter Verwendung eines NanoVue Plus Spektralphotometers (GE Healthcare, Solingen, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei als Referenz der Puffer, in dem das Protein gelöst war, diente.

3.2.4 Peptidligation

Die für die Ligation verwendeten Puffer sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. Zunächst wurden vier Äquivalente des K-Ras4B-Peptids ($\text{NH}_2\text{-C}(\text{StBu})\text{KKKKKKSKTKC}(\text{Far})\text{-OCH}_3$, $\geq 95\%$, Eurogentec, Seraing, Belgien) im Peptidpuffer bei Raumtemperatur gelöst ($c = 5\text{ mg/mL}$). Durch die Zugabe von 5 mM TCEP wurde das *N*-terminale Cys geschützt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde ein Äquivalent des fluoreszenzmarkierten Proteins zum gelösten Peptid gegeben. Der Ligationsansatz sollte mindestens eine Konzentration von 800 $\mu\text{L}/\text{mg}$ Protein aufweisen und wurde gegebenenfalls mit Peptidpuffer verdünnt. Das Reaktionsgemisch wurde unter einer Argonatmosphäre bei 4 °C für mindestens 3 h gerührt. Daraufhin wurde der Ansatz 1:1 mit dem Dialysepuffer verdünnt und in einer Dialysekammer (Slide-a-Lyzer[™] 10K, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) über Nacht gegen den Dialysepuffer dialysiert. Während der Dialyse wurde der Puffer mindestens einmal ausgetauscht. Die Isolierung des Kupplungsproduktes erfolgte mittels Kationenaustauschchromatographie mit einer HiTrap[™] SP-XL-Säule (5 ml, GE Healthcare, Solingen, Deutschland), die zuvor unter Verwendung des ÄKTaprime plus-Systems (GE Healthcare, Solingen, Deutschland) mit 4 SV Äquilibrierungspuffer konditioniert worden war. Anschließend wurde der nach der Dialyse aufkonzentrierte Ligationsansatz auf die Säule aufgetragen und mit etwa 10 SV Äquilibrierungspuffer gewaschen, wodurch das nicht umgesetzte Protein entfernt wurde. Schließlich wurde das Kopplungsprodukt mithilfe des Elutionspuffers eluiert. Die proteinenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration mittels Zentrifugationsfilter (Amicon[®] Ultra 15-10K, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) aufkonzentriert. Dabei wurde auch der Elutionspuffer

gegen den Lagerungspuffer ausgetauscht. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe von Absorptionsmessungen (siehe Abschnitt 3.2.5.1) bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Protein schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tab. 3.4: Puffer für die Ligation des K-Ras4B Δ 15-Proteins mit dem C-terminalen K-Ras4B-Dodecapeptid.

Puffer	Zusammensetzung
Peptidpuffer	100 mM TRIS (pH = 8,5), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 5 mM Mesna
Dialysepuffer	25 mM NaOAc (pH = 5,4), 1 mM MgCl ₂
Äquilibriumspuffer	25 mM NaOAc (pH = 6,3), 1 mM MgCl ₂
Elutionspuffer	25 mM NaOAc (pH = 6,3), 1 mM MgCl ₂ , 500 mM NaCl
Lagerungspuffer	20 mM TRIS (pH = 7,4), 5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTE

3.2.5 Proteinanalytische Methoden

3.2.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration c wurde photometrisch gemäß dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz (siehe Gl. 3.2) für verdünnte Lösungen über die Messung der Absorption A bei 280 nm bestimmt.

$$A_{280} = \lg \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon_{280} \cdot c \cdot d \quad (3.2)$$

Dabei repräsentiert d die Schichtdicke der Küvette. I_0 sowie I entsprechen der Intensität des einfallenden bzw. austretenden Lichts. Bei bekannter Proteinsequenz kann der molare Extinktionskoeffizient (ε_{280}) über die folgende Gleichung berechnet werden:^[121]

$$\varepsilon_{280}[\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}] = 5500 \cdot \sum \text{Trp} + 1490 \cdot \sum \text{Tyr} + 125 \cdot \sum \text{Disulfid} \quad (3.3)$$

Da vorwiegend die aromatischen Aminosäuren Tyr, Trp sowie die Disulfidbrücken in einem Protein bei 280 nm absorbieren, werden mit dieser empirischen Formel die gesamten Beiträge dieser Gruppen zur Proteinabsorption bei 280 nm berücksichtigt. Dieser Formel

liegen die durchschnittlichen ε_{280} von Tyr, Trp und den Disulfidbrücken zugrunde. Die Absorptionsmessungen wurden mit einem Photometer (BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei Raumtemperatur gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden 100 μL Proteinlösung angesetzt und als Referenz diente der Puffer, in dem das Protein gelöst war.

3.2.5.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*))-Polyacrylamidgelelektrophorese) ist eine analytische Methode, um Proteine gemäß ihrer Größe bzw. ihres Molekulargewichts (MW) zu trennen, identifizieren und um Informationen über die Reinheit der Proteinprobe zu erhalten.^[122] Durch die Zugabe des anionischen Detergens SDS wird gewährleistet, dass die Proteine denaturiert vorliegen und die Eigenladung der Proteine maskiert wird, sodass die durch SDS eingeführte Ladung proportional zur Masse des Proteins ist. Da kleinere Proteine schneller im elektrisch angelegten Feld durch das Gel wandern, erfolgt eine Auftrennung der Proteine gemäß ihrer Größe.

Die Zusammensetzung der für die SDS-PAGE verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Tab. 3.5: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE.

Puffer & Lösungen	Zusammensetzung
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M TRIS (pH = 8,8), 0,4 %(w/v) SDS
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M TRIS (pH = 6,8), 0,4 %(w/v) SDS
Laufpuffer	25 mM TRIS, 192 mM Glycerol, 0,1 %(w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (4x)	0,5 M TRIS (pH = 6,8), 20 %(w/v) β -Mercaptoethanol, 8 %(w/v) SDS, 40 %(v/v) Glycerol, 5 mg/L Bromphenolblau
Färbelösung	0,2 %(w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250, 10 %(v/v) Essigsäure, 50 %(v/v) Ethanol
Entfärbelösung	10 %(v/v) Essigsäure

Das diskontinuierliche Polyacrylamidgel wurde hergestellt, indem ein 15 %-iges Trenngel mit einem 4 %-igen Sammelgel (siehe Tab. 3.6) in einem Gel-Gießsystem überschichtet wurde. Durch die Verwendung eines Gelkamms wurden Probenkammern für die Proteinlösungen geformt. Das erhaltene Gel wurde in eine Elektrophoresekammer (MiniPROTEAN®

Bio-Rad, Hercules, USA) eingesetzt und mit Lauffpuffer befüllt. Je nach Konzentration der Proben wurden 1-3 μL Proteinlösung mit 7-10 μL 4x SDS-Probenpuffer gemischt und in die vorgeformten Sammelgeltaschen aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Geltasche mit 10 μL von dem SigmaMarkerTM (*low range*, MW 6.500-66.000 Da, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) als Referenz befüllt. Die Gelelektrophorese wurde zunächst bei einer Stromstärke von 25 mA gestartet, welche anschließend auf etwa 60 mA erhöht wurde, wenn die durch Bromphenolblau gefärbten Proteinproben am Trenngel angekommen sind. Sobald die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Das Gel wurde daraufhin in der Färbelösung erhitzt und auf einer Schüttelplatte für ca. 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Gel wiederholt in der Entfärbelösung erhitzt und inkubiert, bis die unspezifische Hintergrundfärbung weitestgehend entfernt war.

Tab. 3.6: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.

	Trenngel (15 %)	Sammelgel (4 %)
Acrylamid-Bisacrylamid (29:1) (40 % (w/v))	2,8 mL	250 μL
Trenngelpuffer (4x)	1,9 mL	-
Sammelgelpuffer (4x)	-	625 μL
dest. H ₂ O	2,9 mL	1,63 mL
APS (10 % (w/v))	60 μL	100 μL
TEMED	6 μL	7 μL

3.2.5.3 MALDI-Tof-Massenspektrometrie

Die matrixunterstützte Laser-Desorption-Ionisation mit einer Flugzeitmassenspektrometer-Detektion (MALDI-Tof) bietet eine schnelle und hochempfindliche Methode zur Bestimmung von Molmassen ionisierter Biomoleküle, wie z.B. Proteinen. Hierbei werden die Proteine zunächst mit einer bei der verwendeten Laserwellenlänge absorbierenden Matrix kokristallisiert. Die matrixunterstützte Probe wird unter Hochvakuum mit einem kurzwelligen Laserimpuls beschossen, sodass das Protein zusammen mit der Matrix desorbiert und ionisiert wird. Die entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und im feldfreien Flugrohr nach dem Ladungs-Masse-Verhältnis getrennt. Durch die Messung der Flugzeit der Analytmoleküle bei bekannter Beschleunigungsspannung und Flugstrecke kann das Ladungs-Masse-Verhältnis ermittelt werden.

Diese massenspektrometrische Methode wurde verwendet, um die hergestellten Proteine zu charakterisieren. Als Matrix wurde hier *trans*-3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) eingesetzt. Zu Beginn wurde eine gesättigte Matrixlösung in einem Acetonitril/0,1 % (v/v) TFA-Gemisch (1:2) angesetzt, wobei die überschüssige Matrix durch Zentrifugieren sedimentiert wurde. 1 μL dieser gesättigten Matrixlösung wurde mit je 1 μL der unterschiedlich verdünnten Proteinlösungen

(1:10, 1:100, 1:1000) gemischt und auf die Metallprobenplatte (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) aufgetragen. Nachdem das Lösungsmittel verdampft und das Probengemisch kristallisiert worden war, wurden die Messungen am Massenspektrometer (UltrafleXtreme, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) im positiven Ionendetektionsmodus durchgeführt. Die Steuerung der massenspektrometrischen Messungen und die Analyse der erhaltenen Daten erfolgte mithilfe der Software flexControl (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland).

3.3 Ergebnisse & Diskussion

3.3.1 Expression und Reinigung von K-Ras4B Δ 15-Mesna

Zur Herstellung eines funktionalen und posttranslational modifizierten K-Ras-4B-Proteins hat sich eine Kombination aus EPL und Synthese eines Lipopeptids als geeignet erwiesen (siehe Abb. 3.2).^[120] Dabei reagiert das rekombinante Protein, das einen reaktiven C-terminalen Thioester enthält, mit dem N-terminalen Cys des synthetisierten Lipopeptids unter Ausbildung einer nativen Amidbindung. Um den benötigten, verkürzten K-Ras4B Δ 15-Thioester zu erhalten, wurde das Gen für die ersten 174 AS des humanen K-Ras4B-Proteins in den pTWIN2-Vektor kloniert. Dadurch wurde das verkürzte K-Ras4B Δ 15-Protein als Fusionsprotein mit einer Inteindomäne und CBD am C-Terminus exprimiert. Die Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins erfolgte über die Chitin-Affinitätschromatographie, wobei die Elution des Proteins durch Thiolyse mittels Mesna induziert wurde (siehe Abschnitt 3.2.2). Wie im Abschnitt 3.1 erläutert, wird diese Spaltung durch die selbst-spleißende Aktivität der Inteindomäne ermöglicht.

Die Expression und Reinigung des verkürzten K-Ras4B Δ 15-Thioesters wurde in Zusammenarbeit mit Frau Simone Möbitz (Technische Assistentin am Lehrstuhl Physikalische Chemie I, TU Dortmund) durchgeführt. Pro Liter Zellsuspensionsvolumen wurden im Durchschnitt etwa 22 mg des K-Ras4B Δ 15-Proteins erhalten. Das isolierte Protein wurde schließlich mittels SDS-PAGE und MALDI-Tof charakterisiert (siehe Abb. 3.3). Das Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE-Gelbild und die massenspektrometrische Analyse deuten auf eine erfolgreiche Proteinexpression- und -reinigung hin. Die durch MALDI-Tof ermittelte Proteinmasse von 19721 g/mol weist eine Differenz von -168 g/mol von der berechneten Molmasse des K-Ras4B Δ 15-Proteins auf. Bei der Messung wurde kein Peptid- oder Proteinstandard zur Kalibrierung verwendet, was die Abweichung der gemessenen Werte von weniger als 1 % erklären kann.

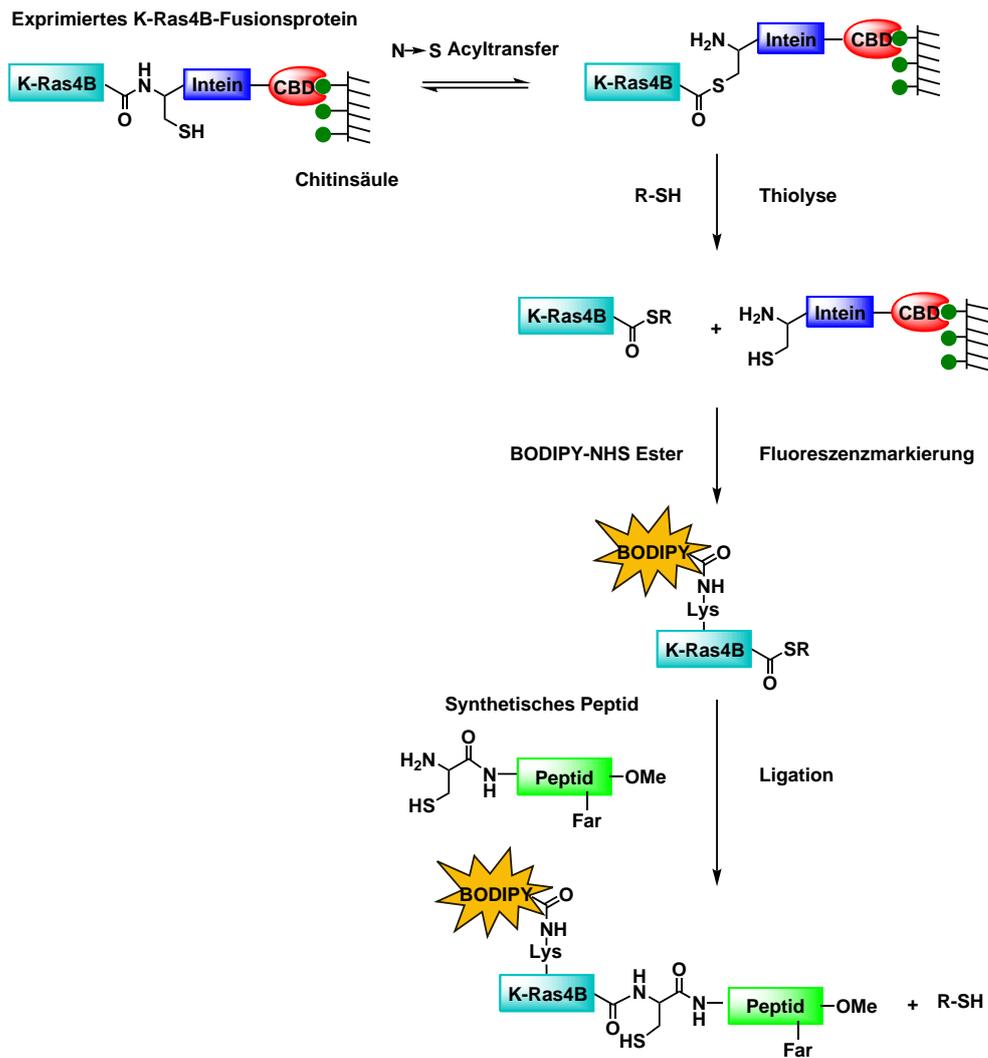


Abb. 3.2: Semisyntese eines posttranslational modifizierten und fluoreszenzmarkierten K-Ras4B-Proteins. Das rekombinante K-Ras4B-Protein, fusioniert mit einer Intein- und CBD-Domäne, wird über eine Chitinsäule gereinigt. Durch das thiolinduzierte Inteinspleißen wird ein reaktiver Thioester am C-Terminus des rekombinanten Proteins erzeugt, der mit dem N-terminalen Cys eines synthetisch hergestellten Peptids umgesetzt wird. Vor der Ligation werden die Lys-Reste des rekombinanten Proteins mit dem Fluoreszenzmarker BODIPY[®] FL modifiziert.

3.3.2 Fluoreszenzmarkierung von K-Ras4B Δ 15-Mesna

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von K-Ras4B erforderten die Einführung eines Fluoreszenzmarkers, der kovalent an das Protein gebunden ist. Heutzutage stehen zahlreiche Methoden zur Modifikation von Proteinen mit kleinen organischen Fluorophoren zur Verfügung, wobei sich diese in der Art der chemischen Bindung und dem Grad der Spezifität unterscheiden. Bei der Fluoreszenzmarkierung werden häufig die reaktiven Lys-Seitenketten adressiert, da diese in den meisten Proteinen enthalten sind. Zudem sind die Lys-Reste aufgrund ihrer positiven Ladung vorwiegend an der Proteinoberfläche exponiert, wodurch sie leicht zugänglich für die Kopplungsreaktion sind.

Die primären Aminogruppen der Lys-Seitenketten sind bei physiologischem pH protoniert, können aber bei einem $\text{pH} \geq 8$ als Nukleophile mit aktivstermodifizierten Fluorophoren

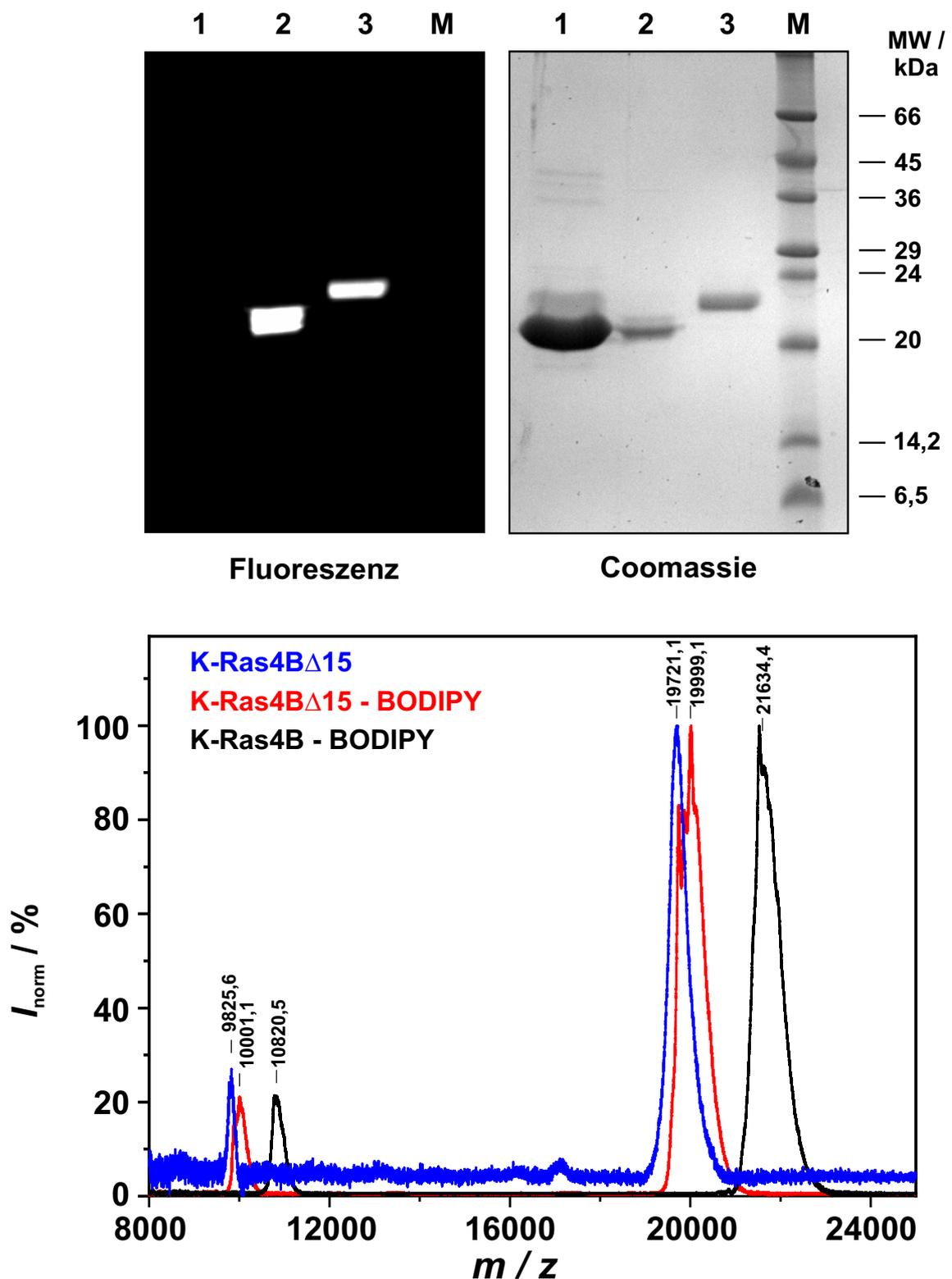


Abb. 3.3: Charakterisierung des isolierten K-Ras4B Δ 15-Proteins nach der Expression (**1**) und nach der Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY (**2**) sowie des K-Ras4B-Proteins nach der Ligation mit dem farnesylierten und carboxymethylierten K-Ras4B-Dodecapeptid (**3**). Fluoreszenzaufnahme des SDS-PAGE-Gels bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm sowie eine Aufnahme des SDS-PAGE-Gels nach der Aufnahme des Coomassie-Blau-Färbung. Als Marker (**M**) wurde der SigmaMarkerTM (*low range*) verwendet (oben). Massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-Tof für das K-Ras4B Δ 15-Mesna vor ($M_{\text{theo}} = 19888$ g/mol) und nach der Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY ($M_{\text{theo}} = 20163$ g/mol) sowie für das Kupplungsprodukt nach der Ligation ($M_{\text{theo}} = 21637$ g/mol) (unten).

reagieren. Aktivester, wie z.B. *N*-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester), ermöglichen die Kopplung des fluoreszierenden Farbstoffs an die ϵ -Aminogruppen der exponierten Lys-Reste unter Ausbildung einer stabilen Amidbindung ohne den Einsatz weiterer Kopplungsreagenzien. Aminhaltige Puffer, wie TRIS, und ein zu hoher pH-Wert führen zu unerwünschten Nebenreaktionen bzw. erhöhen die Neigung des NHS-Esters zur Hydrolyse.^[123] Daher wurde K-Ras4B Δ 15-Mesna in einem aminfreien NaHCO₃-Puffer bei pH = 8,5 mit zehn Äquivalenten an BODIPY-NHS-Ester für mindestens 4 h bei 4 °C umgesetzt (siehe Abschnitt 3.2.3). Nachdem überschüssiger Farbstoff durch Gelfiltration entfernt worden war, wurde das isolierte Protein über SDS-PAGE und MALDI-Tof charakterisiert. Aufgrund der geringen Molmassenzunahme bei der Kopplung eines BODIPY-Moleküls ($\Delta M_{\text{theo}} = 274$ g/mol) kann kein eindeutiger Unterschied in der Lage der Proteinbanden vor (**1**) und nach der Fluoreszenzmarkierung (**2**) im SDS-PAGE-Gelbild beobachtet werden (siehe Abb. 3.3). Eine Fluoreszenzaufnahme dieses Gels bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm zeigt jedoch deutlich eine fluoreszierende Proteinbande (**2**) bei etwa 20 kDa, was auf eine erfolgreiche Fluoreszenzmarkierung des K-Ras4B Δ 15-Proteins hindeutet. Die massenspektrometrisch bestimmte Molmassenzunahme von 278 g/mol bestätigt, dass ein BODIPY-Molekül kovalent an das Protein gebunden hat. Das MALDI-Tof-Spektrum des K-Ras4B-Proteins nach der BODIPY-Kopplung weist jedoch zusätzlich eine Schulter bei 19721 g/mol auf, was auf eine unvollständige Kopplungsreaktion hinweist. Trotz des zehnfachen Überschusses an BODIPY und einer Inkubationszeit von 4 h konnte im Durchschnitt nur ein Markierungsgrad von 20-30 % (siehe Gl. 3.1) erreicht werden.

Weitere Fluoreszenzmarkierungen von K-Ras4B erfolgten unter Verwendung von 1,5 Äquivalenten eines Maleimid-funktionalisierten Fluorophors, da die Reaktionszeit auf 1 h reduziert und der Markierungsgrad auf 50-70 % erhöht werden konnte (siehe Abb. A.2). Die Maleimid-Gruppe ermöglicht unter milden Bedingungen eine sehr selektive und schnelle Reaktion (MICHAEL-Addition) mit den Thiolgruppen der Cys-Seitenketten in Proteinen.^[124]

3.3.3 Ligation des K-Ras4B Δ 15-Proteins mit dem *C*-terminalen K-Ras4B-Dodecapeptid

Nach der erfolgreichen Modifikation des K-Ras4B Δ 15-Thioesters mit BODIPY wurden die fehlenden *C*-terminalen AS, wie in Abbildung 3.1 (rechts) dargestellt, an das Protein gebunden, um ein farnesyliertes und carboxymethyliertes K-Ras4B-Protein zu erhalten. Da diesem Protein außer dem farnesylierten Cys weitere für die Kopplungsreaktion benötigte Cys-Reste in der *C*-terminalen Sequenz fehlten, wurde ein zusätzliches Cys zwischen Gly174 und Lys175 eingeführt.

Vor der Kopplung musste das *St*Bu-geschützte Cys am *N*-Terminus des K-Ras4B-Dodecapeptids zunächst reduktiv mit TCEP gespalten werden. Anschließend wurden vier Äquivalente des entschützten Peptids mit K-Ras4B Δ 15-Mesna für 3 h bei 4 °C umgesetzt (siehe Abschnitt

3.2.4). Während das überschüssige Peptid mittels Dialyse abgetrennt wurde, konnte das nicht umgesetzte Protein mithilfe der Kationenaustauschchromatographie entfernt werden, da der isoelektrische Punkt (pI) des Proteins nach der Ligation mit dem polylbasischen K-Ras4B-Peptid deutlich von 5,3 auf 8,2 erhöht wird. Die Bande (**3**) bei etwa 21 kDa im SDS-PAGE-Gel (siehe Abb. 3.3) weist auf eine erfolgreiche Ligation hin. Die für das Kopplungsprodukt erwartete Zunahme des Molekulargewichts von 1638 g/mol kann eindeutig im Massenspektrum beobachtet werden ($\Delta M_{\text{theo}} = 1635$ g/mol). Das posttranslational modifizierte und fluoreszenzmarkierte K-Ras4B-Protein konnte in hoher Reinheit mit einer Ausbeute von 25 % über beide Reaktionsschritte bezogen auf die eingesetzte Menge des K-Ras4B Δ 15-Proteins isoliert werden.

3.4 Zusammenfassung

Biophysikalische Untersuchungen zu Ras-Membran-Interaktionen erfordern präparative Mengen an lipidierten Ras-Proteinen. Hier wurde ein bekannter semisynthetischer Ansatz gewählt, um das benötigte BODIPY-markierte, carboxymethylierte und farnesylierte K-Ras4B-Protein herzustellen.^[120] Die Expression des K-Ras4B Δ 15-Proteins als Fusionsprotein mit einer Intein- und CBD-Domäne am *C*-Terminus erfolgte rekombinant in *E. coli* sodass für die Reinigung des Proteins eine Chitinsäule verwendet werden konnte. Durch die Zugabe einer frischen Mesna-Lösung wurde das K-Ras4B Δ 15-Protein mit einem *C*-terminalen Thioester von der Säule eluiert. Anschließend konnten die exponierten Lys-Seitenketten dieses Proteins erfolgreich mit BODIPY modifiziert werden. Daraufhin wurde die Ligation des Protein-Thioester mit dem carboxymethylierten und farnesylierten K-Ras4B-Dodecapeptid, das ein *N*-terminales Cys besitzt, durchgeführt. Die EPL unter Verwendung des synthetischen Lipopeptids stellte eine effiziente Methode, um das posttranslational modifizierte K-Ras4B-Protein in hoher Reinheit und einer Ausbeute von 25 % herzustellen.

Ras-Proteine in Membranen unterschiedlicher Zusammensetzung*

4.1 Einleitung

Obwohl die verschiedenen Ras-Isoformen *in vitro* teilweise mit den gleichen Effektorproteinen interagieren, generieren sie unterschiedliche Signalantworten in Zellen. Es wird vermutet, dass die stark divergente, lipidmodifizierte, C-terminale HVR dieser Proteine vorwiegend für diese Unterschiede verantwortlich ist. Das isoformspezifische Lipidierungsmuster in der HVR steuert die subzelluläre Verteilung der Ras-Proteine. In den verschiedenen zellulären Kompartimenten variiert die relative Häufigkeit und lokale Konzentration der Regulator- und Effektorproteine, was die Signalgebung der Ras-Isoformen maßgeblich beeinflusst.^[68,108] Die Aufenthaltszeit der Ras-Proteine in den verschiedenen Membrankompartimenten kann ebenfalls zu den isoformspezifischen Signalantworten in der Zelle beitragen.^[126] Wie in Abschnitt 1.2.4 diskutiert, wird die Membranbindung lipidierter Proteine durch verschiedene Mechanismen reguliert.

Vorwiegend findet die Ras-vermittelte Signalweiterleitung jedoch an der Plasmamembran statt. Wie in Abschnitt 1.1 erläutert, organisieren sich die Komponenten der Plasmamembran in diskrete Subdomänen, wie z.B. den *raft*-Domänen, denen eine wichtige Rolle als Plattform für Signalproteine in der intrazellulären Signaltransduktion zugeschrieben wird. Es wurde gezeigt, dass die unterschiedlichen Lipidmodifikationen sowie das in der G-Domäne gebundene Nukleotid (GDP/GTP) einen großen Einfluss auf die Lokalisation der Ras-Proteine in den Subdomänen der Plasmamembran haben.^[68] Darüber hinaus kann sich die Orientierung der katalytischen G-Domäne an der Membrangrenzfläche durch die Bindung des Nukleotids ändern, wodurch Bindungsstellen für gewisse Effektor- und

*Die Ergebnisse dieser Studie wurden in der Ref. [125] veröffentlicht und werden in diesem Kapitel teilweise wiedergegeben. Adapted from Ref. [125] with permission from the PCCP Owner Societies.

Regulatorproteine freigelegt oder verborgen werden können.^[66,127,128] Zudem wurde in den letzten Jahren berichtet, dass sich die Ras-Isoformen aufgrund ihrer divergenten HVR zu unterschiedlichen proteinangereicherten Domänen, sogenannten Nanoclustern, an der Plasmamembran zusammenlagern.^[129,130] Dies kann ebenfalls zur isoformspezifischen Signalantwort in der Zelle beitragen, da diese transienten und räumlich abgegrenzten Nanocluster wichtige Plattformen darstellen, die für die Rekrutierung und Aktivierung von Effektorproteinen verantwortlich sein könnten.^[130] Kürzlich wurde gezeigt, dass spezifische Lipide entscheidend für die Bildung, Stabilität und Dynamik dieser Ras-Nanocluster sind.^[131] Dies führt zu der Annahme, dass die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran einen ausschlaggebenden Effekt auf die laterale Organisation und somit auf die Funktion der Ras-Proteine hat. Während die Auswirkungen der unterschiedlichen Lipidierungsmuster der Ras-Proteine auf die Membranbindung in den letzten Jahren intensiv untersucht wurden,^[132-134] ist der Effekt der Membranzusammensetzung auf die Verteilung dieser lipidierten Proteine sowie deren laterale Organisation in den Subdomänen der Plasmamembran weitestgehend unbekannt.

Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit die Wechselwirkungen zwischen Membransystemen unterschiedlicher Zusammensetzung sowie Komplexität und den beiden lipidierten Proteinen N-Ras und K-Ras4B, die in vielen Zelltypen häufiger exprimiert werden als H-Ras,^[72,135] untersucht. Um zusätzlich den Einfluss des in der G-Domäne gebundenen Nukleotids auf die Membraninteraktionen zu untersuchen, wurden beide Ras-Proteine sowohl in der inaktiven GDP-gebundenen Form als auch in der aktiven GTP-gebundenen Form eingesetzt. In Kombination mit früheren Studien kann mit diesen Untersuchungen ein allgemeiner molekularer Mechanismus für die laterale Segregation lipidierter Proteine und deren Bildung von Nanoclustern an Membranen vorgeschlagen werden, der zum besseren Verständnis der funktionellen Diversität der Ras-Isoformen beitragen kann.

4.2 Material & Methoden

4.2.1 Material

Alle verwendeten Chemikalien und Lipide für die Untersuchungen der lipidierten Ras-Proteine in Membranen unterschiedlicher Zusammensetzung sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Tab. 4.1: Bezugsquellen der Chemikalien und Lipide für die Untersuchungen der lipidierten Ras-Proteine in Membranen unterschiedlicher Zusammensetzung.

Chemikalien und Lipide	Bezugsquelle
CaCl ₂	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Chloroform	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Cholesterol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DOPC (1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DOPS (1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPC (1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPE (1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Fetales Kälberserum (FBS, Gibco TM)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Formaldehyd	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
HEPES	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
KCl	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Methanol	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
MEM (+ 2 mM L-Glutamin, Gibco TM)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
MEM (ohne L-Glutamin, Gibco TM)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
MgCl ₂	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
<i>N</i> -Rh-DHPE (<i>N</i> -(Lissamine TM Rhodamin B sulfonyl)-1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
NaCl	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Penicillin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Perchlorsäure	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Streptomycin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
TRIS	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Trypsin/EDTA-Lösung	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

4.2.2 Kultivierung der eukaryotischen Zelllinie RBL-2H3

Für die Isolierung der riesigen Plasmamembranvesikel (*giant plasma membrane vesicles*, GPMVs) wurde die Zelllinie RBL-2H3 (DSMZ Nr.: ACC 312, Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) verwendet. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um adhärenente Zellen, die sowohl Eigenschaften von basophilen als auch von Mastzellen aufweisen. Isoliert wurde diese Subzelllinie aus RBL-1-Zellen, die in basophilen Tumorzellen der Wistar-Ratte gefunden wurden.^[136,137]

Die Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank (MSC-Advantage, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Hierbei wurden ausschließlich sterile Medien, Puffer und Reagenzlösungen (siehe Tab. 4.2) sowie Materialien und Geräte verwendet.

Tab. 4.2: Medien und Puffer für die Kultivierung der Zelllinie RBL-2H3.

Medium/Puffer	Zusammensetzung
MEM(+Gln)-Medium	500 mL MEM (+ 2 mM L-Glutamin), 10 %(v/v) hitzeinaktiviertes FBS, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin
MEM(-Gln)-Medium	500 mL MEM (ohne L-Glutamin), 10 %(v/v) hitzeinaktiviertes FBS, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin
PBS	9 mM Na ₂ HPO ₄ , 3,7 mM NaH ₂ PO ₄ (pH = 7,4), 120 mM NaCl, 2,7 mM KCl
GPMV-Puffer	10 mM HEPES (pH = 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂
GPMV-Reagenz	100 mL GPMV-Puffer (pH = 7,4), 25 mM Formaldehyd, 3 mM DTT

Die Kultivierung der Zellen erfolgte gemäß einem bekannten Protokoll^[138] in 25 mL MEM(+Gln)-Medium in einer 75 cm²-Zellkulturflasche (*cell culture flask, tissue-culture treated polystyrene, canted neck, plug-seal cap*, BD Falcon™) bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % in einem Inkubationsschrank (HERAcell 150, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Zweimal wöchentlich wurden die adhärenenten Zellen bei einer Konfluenz von 80 % mithilfe einer 0,05 %-igen Trypsin/EDTA-Lösung passagiert. Hierfür wurde zunächst das alte Medium abgenommen, die am Flaschenboden haftenden Zellen zweimal mit je 10 mL PBS gewaschen und anschließend mit 3 mL Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet.

Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Zellen von der Zellkulturflasche gelöst und mit einer Aussaatdichte von $0,375 \cdot 10^6$ bzw. $0,75 \cdot 10^6$ Zellen in 25 mL frischem Medium pro 75 cm²-Kulturflasche für drei bzw. vier Tage inkubiert.

Zur Kontrolle des Zellwachstums sowie zur optischen Bestimmung der Konfluenz und der Zellzahl mittels der NEUBAUER-Zählkammer wurde ein Phasenkontrastmikroskop verwendet. Hierfür wurden die Zellen direkt in der Zellkulturflasche bzw. in der NEUBAUER-Zählkammer beobachtet.

4.2.3 Isolierung der GPMVs

Die Herstellung der GPMVs erfolgte wie von SEELIGER *et al.* beschrieben.^[138] Hierbei wurden die RBL-2H3-Zellen zunächst drei Tage unter den in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen Bedingungen kultiviert und anschließend mit einer höheren Aussaatdichte von etwa 10^6 Zellen pro 75 cm²-Kulturflasche in 25 mL frischem MEM(-Gln)-Medium für fünf Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nachdem das alte Medium entfernt worden war, wurden die Zellen zweimal mit jeweils 15 mL GPMV-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 3 mL GPMV-Reagenz wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C unter Schütteln bei 60 rpm inkubiert. Für die Herstellung des GPMV-Reagenzes wurde Paraformaldehyd durch Erhitzen im GPMV-Puffer gelöst, wobei dieser zu Formaldehyd depolymerisierte. Der Überstand in der Zellkulturflasche, der nun die von der Zellmembran abgeschnürten GPMVs enthielt, wurde abgenommen und bei 4 °C über Nacht gelagert. Für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen wurden die unteren 20 % der Lösung, die die sedimentierten GPMVs enthielten, verwendet.

4.2.4 Lipidextraktion

Die Extraktion der GPMV-Lipide erfolgte gemäß der von BLIGH und DYER beschriebenen Methode, bei der die Lipide unter Verwendung einer Chloroform/Methanol-Mischung extrahiert werden.^[139] Zu diesem Zweck wurde die wässrige Vesikelsuspension unmittelbar nach der Isolation der GPMVs mit Chloroform und Methanol in einem Volumenverhältnis von 0,8:1:2 gemischt, sodass ein Einphasensystem entstand, in dem sowohl die Lipide als auch die anderen zellulären Komponenten eine hohe Löslichkeit besaßen. Diese Mischung wurde in einen 500 mL Scheidetrichter überführt und gut geschüttelt. Anschließend wurden jeweils eine Volumeneinheit Chloroform und Milli-Q-H₂O hinzugefügt. Nach erneutem Schütteln trennten sich die wässrige und organische Phase. Die wässrige Phase wurde weitere zweimal mit je einer Volumeneinheit Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroform-Phasen wurden daraufhin mit 0,4 Volumeneinheiten einer 1 M KCl-Lösung und anschließend mit 0,4 Volumeneinheiten Milli-Q-H₂O gewaschen. Mithilfe eines Rotationsverdampfers wurde der Großteil des Chloroforms entfernt. Das restliche Lösungsmittel wurde zunächst

unter einem Stickstoffstrom verdampft und anschließend über Nacht im Vakuum entfernt. Die trockenen Lipide wurden bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.2.5 Bestimmung der Phospholipidkonzentration

Zur Quantifizierung der Phospholipide wurde ein modifizierter BARTLETT-Assay verwendet, bei dem die Stoffmenge von anorganischem Phosphat kolorimetrisch bestimmt wird.^[140] Hierfür wurden die trockenen Lipide zunächst in 1 mL Chloroform gelöst. Von dieser Lösung wurden jeweils 50 und 100 μL in ein 8 mL Glasgefäß aliquotiert. Das Lösungsmittel wurde zunächst durch einen Stickstoffstrom und anschließend für mindestens 2 h unter Vakuum entfernt. Dann wurden 75 μL H_2O sowohl zu den trockenen Lipidproben unbekannter Phospholipidmenge als auch zu den Standard-Phosphatlösungen (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mit den Stoffmengen 20, 40, 60, 80 und 100 nmol hinzugegeben. Zusätzlich wurde eine Referenz hergestellt, die keine Lipide enthielt, dessen Absorptionsspektrum zur Hintergrundkorrektur von allen anderen Spektren abgezogen wurde. Da bei diesem kolorimetrischen Assay nur frei in Lösung vorliegende Phosphorsäure detektiert werden kann, mussten die Phosphorsäureesterbindungen in den Lipiden vor der Messung oxidativ mit Perchlorsäure gespalten werden. Dafür wurden 400 μL einer 70 %-igen Perchlorsäure-Lösung zu allen Proben einschließlich der Referenz pipettiert und für mindestens 1,5 h auf über $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Nachdem die Proben abgekühlt waren, wurden jeweils 2,4 mL einer 0,44 % (w/v)-igen $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und einer 2,5 % (w/v)-igen FISKE-SUBBAROW-Reduktionsreagenz-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) hinzugegeben und gemischt. Die Proben wurden daraufhin für genau 10 min in siedendes Wasser gestellt und unmittelbar danach auf Eis abgekühlt. Dadurch bildet das freie Phosphat einen Molybdänblau-Komplex, der UV/Vis-spektroskopisch bei 820 nm detektiert werden kann. Da die Absorption des entstandenen, blauen Komplexes proportional zur Menge des freien Phosphats ist, kann hieraus die Stoffmenge und schließlich die Konzentration der Phospholipide bestimmt werden. Zur Quantifizierung wurde eine Kalibrierkurve mit Phosphatlösungen bekannter Stoffmengen erstellt (siehe Abb. A.3):

$$A_{820} = 0,00571 \cdot n(\text{PO}_4^{3-}) - 0,007. \quad (4.1)$$

Die Absorptionmessungen mit den Standard-Phosphatlösungen sowie die Erstellung der daraus resultierenden Kalibriergeraden (siehe Abb. A.3) erfolgten bereits im Rahmen der Masterarbeit (Ref. [141]). Die Absorptionmessungen wurden am UV/Vis-Spektrometer (Lambda 25, Perkin Elmer) durchgeführt und die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung des Programms Origin (OriginLab, Northampton, USA).

4.2.6 Vesikelpräparation

4.2.6.1 Elektroformation

Die in Pulverform erhaltenen Lipide wurden zunächst in einer Konzentration von 10 mg/mL in Chloroform gelöst. Diese Stammlösungen wurden schließlich verwendet, um die Lipidmischung DOPC/DOPS/DPPC/DPPS/Chol (20:5:45:5:25 mol%) herzustellen. Zu der Lipidmischung wurden 0,2 mol% *N*-Rh-DHPE ($c = 100 \mu\text{M}$ in MeOH) gegeben. Die riesigen unilamellaren Vesikel (*giant unilamellar vesicles*, GUVs) wurden mittels Elektroformation hergestellt.^[142] Hierfür wurde zunächst ein dünner homogener Lipidfilm auf optisch transparenten und elektrisch leitfähigen, Indiumzinnoxid (*indium tin oxide*, ITO)-beschichteten Deckgläser (22x22 mm, 100 Ω , SPI Supplies, West Chester, USA) aufgebracht, indem 20 μL der in Chloroform gelösten Lipidmischung mit einer Konzentration von 1-2 mg/mL über die Rotationsbeschichtung bei 800 rpm für 1 min auf einem ITO-Deckglas gespreitet wurden. Um das organische Lösungsmittel vollständig zu entfernen, wurden die lipidbeschichteten ITO-Deckgläser für mindestens 2 h im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde je ein lipidbeschichtetes und ein lipidfreies ITO-Deckglas einseitig mit einem dünnen Streifen selbstklebender Kupferfolie (SPI Supplies, West Chester, USA) versehen und zum Verschließen der Probenkammer des Typs RC-21B ($V = 358 \mu\text{L}$, Warner Instruments, Hamden, USA) verwendet, wobei zur Abdichtung Vakuumfett benutzt wurde. Zum Befüllen der Kammer wurden kurze Polyethylenschläuche (PE-160, Warner Instruments, Hamden, USA) in die seitlichen Öffnungen eingeführt. Unter Verwendung eines Durchfluss-Temperierelements wurde diese Probenkammer mit den aufliegenden ITO-Deckgläsern an der zugehörigen Plattform P-2 (Warner Instruments, Hamden, USA) befestigt. Der sich in der Probenkammer befindende Lipidfilm wurde mit Puffer (20 mM TRIS (pH = 7,4), MgCl_2) hydratisiert. Über die aus der Kammer ragende Kupferfolie konnte mithilfe eines Funktionsgenerators (TG315, Thurlby Thandar Instruments, Huntingdon, UK) eine sinusförmige Wechselspannung mit einer Frequenz von 500 Hz angelegt werden, wobei die Spannung wie folgt variiert wurde: 140 mV für 5 min, 1,25 V für 20 min, 3,5 V für 90 min. Während der gesamten Elektroformation wurde die Temperatur der Probenkammer mit $\geq 65 \text{ }^\circ\text{C}$ oberhalb der Phasenübergangstemperatur der verwendeten Lipidmischungen gehalten. Nach der Elektroformation wurde die Probenkammer langsam (1 $^\circ\text{C}/\text{min}$) auf Raumtemperatur abgekühlt und direkt zum Mikroskopieren verwendet.

4.2.6.2 Milde Hydratation

Die GUVs aus den extrahierten Lipiden der GPMVs wurden mithilfe der milden Hydratation/natürlichen Quellung hergestellt.^[143] Hierfür wurden ähnlich wie bei der Elektroformationsmethode zunächst 20 μL der in Chloroform gelösten Lipidextrakte ($c = 1\text{-}2 \text{ mg/mL}$) durch die Rotationsbeschichtung bei 800 rpm für 1 min auf einem Deckglas (22x22 mm) gespreitet. Nachdem das restliche organische Lösungsmittel für mindestens 2 h unter Vakuum entfernt worden war, wurden die Deckgläser wie bei der Elektroformation an die Probenkammer des Typs RC-21B ($V = 358 \mu\text{L}$, Warner Instruments, Hamden, USA) gelegt, die mit kurzen Polyethylenschläuchen (PE-160, Warner Instruments, Hamden, USA) versehen wurde. Mithilfe eines Durchfluss-Temperierelements wurde diese Probenkammer an der zugehörigen Plattform P-2 (Warner Instruments, Hamden, USA) befestigt. Der in die Probenkammer gerichtete Lipidfilm wurde 30 min vorhydratisiert, indem ein wassergesättigter Stickstoffstrom durch die Probenkammer geleitet wurde. Dadurch können sich die einzelnen Lipidschichten des Lipidfilms separieren, wodurch die anschließende Vesikelbildung erleichtert wird.^[143] Die Probenkammer wurde daraufhin mit 10 mM HEPES (pH = 7,4) gefüllt und über Nacht bei $\geq 65 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nachdem die Probenkammer langsam abgekühlt worden war, konnten die erhaltenen GUVs direkt in dieser Kammer mikroskopisch beobachtet werden.

4.2.7 Phasenkontrastmikroskopie

Für die phasenkontrastmikroskopischen Messungen wurde das inverse Mikroskop des Modells Eclipse TE2000-U (Nikon, Tokio, Japan) verwendet, das entweder mit einem Phasenkontrastobjektiv des Typs CFI Plan Fluor ELWD (*Extra Long Working Distance*) 20 \times (NA 0,45, Phasenblende Ph1, Phasenring DM (*Dark Medium*), WD (*Working Distance*) 7,4 mm, Nikon, Tokio, Japan) oder des Typs CFI 10 \times (NA 0,25, Phasenblende Ph1, Phasenring ADL (*Apodized Dark Low*), WD 6,2 mm, Nikon, Tokio, Japan) ausgestattet war. Für die mikroskopischen Aufnahmen der Zellen wurde die Kamera Digital Sight DS-5Mc (Nikon, Tokio, Japan) eingesetzt, die über den Kameracontroller Digital Sight DS-U1 (Nikon, Tokio, Japan) mit einem Computer verbunden war und mit der Software ACT-2U (Nikon, Tokio, Japan) gesteuert wurde. Die Korrektur des Hintergrundes und eine Kontrasterhöhung der Bilder erfolgten unter Verwendung der Software ImageJ.^[144]

4.2.8 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die proteinhaltigen GPMVs ($\sim 100 \mu\text{M}$) wurden vor Beginn der fluoreszenzmikroskopischen Messungen für 30 min bei Raumtemperatur mit 0,2 mol% *N*-Rh-DHPE ($c = 100 \mu\text{M}$ in MeOH) inkubiert. Unmittelbar nachdem das entsprechende BODIPY-markierte Ras-Protein ($c = 2 \mu\text{M}$) zu den Vesikeln gegeben worden war, wurde das Gemisch in eine geschlossene Probenkammer des Typs RC-20 ($V = 36 \mu\text{L}$, Warner Instruments, Hamden, USA), die zwei Deckgläser ($\varnothing = 15 \text{ mm}$) enthielt und auf der zugehörigen Plattform P-5 (Warner Instrumentes, Hamden, USA) befestigt war, injiziert. Diese Messungen erfolgten zum Teil bereits im Rahmen der Masterarbeit (Ref. [141]).

Bei den Messungen mit den proteinfreien GUVs aus den GPMV-Lipidextrakten, die mittels milder Hydratation in der Probenkammer des Typs RC-21B (siehe Abschnitt 4.2.6.2) hergestellt wurden, wurden die BODIPY-markierten Ras-Proteine ($c = 2 \mu\text{M}$) vorsichtig in die Kammer injiziert, ohne die gebildeten GUVs zu entfernen. Anschließend wurden die fluoreszenzmikroskopischen Messungen direkt in dieser Kammer durchgeführt. Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur.

Für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde das konfokale Laser-Scanning-System MRC 1024 (Bio-Rad Laboratories), das an ein inverses Mikroskop des Modells Eclipse TE-300DV (Nikon, Tokio, Japan) gekoppelt war, verwendet. Als Lichtquelle diente ein KrAr-Laser (ALC 60WL, Dynamic Laser, Salt Lake City, USA), der die Fluoreszenz bei 488 nm und 568 nm anregen kann. Das inverse Mikroskop wurde entweder mit einem Objektiv des Typs CFI Plan Apo VC 60 \times WI (*Water immersion*, NA 1,2, WD 0,22 mm, Nikon, Tokio, Japan) oder des Typs CFI Plan Apo Lambda 100 \times Oil (NA 1,45, WD 0,13 mm, Nikon, Tokio, Japan) genutzt. Die Fluoreszenzemission wurde in zwei verschiedenen PMTs detektiert, denen jeweils der Emissionsfilter 522 nm/35 nm FWHM (*full width at half maximum*) und 580 nm/32 nm FWHM vorgeschaltet war. Die Steuerung des konfokalen Fluoreszenzmikroskops und die Aufnahme der Bilder mit 512×512 Pixeln erfolgte mithilfe der Software LaserSharp2000 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Das Programm ImageJ^[144] wurde zur Bildbearbeitung (Hintergrundkorrektur und Kontrasterhöhung) benutzt.

4.3 Ergebnisse & Diskussion

4.3.1 K-Ras4B in PS-haltigen Membranen

Wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, wird durch die Insertion des Farnesylankers in die Membran nicht ausreichend GIBBS-Energie freigesetzt, um K-Ras4B stabil in der Membran zu verankern. Daher sind anionische Lipide erforderlich, die elektrostatische Interaktionen mit der polybasischen Sequenz von K-Ras4B eingehen können. Da frühere Studien

darauf hinwies, dass K-Ras4B keine spezifischen Bindungen mit einem der bekannten negativ geladenen Phospholipide in der Plasmamembran eingeht,^[145] wurden Membraninteraktionsstudien von K-Ras4B *in vitro* und *in silico* häufig mit Modellmembranen, die PG-Lipide enthielten, durchgeführt.^[127,134,146,147] Die zytosolische Seite der zellulären Plasmamembran enthält jedoch vorwiegend PS und PI (10-15 %) als monovalente anionische Phospholipide (siehe Abschnitt 1.1.3).^[29,145] Es wird vermutet, dass membrangebundene K-Ras4B-Proteine wie andere lipidierte Proteine mit polybasischer Sequenz ein lokales, positives Potential an der Plasmamembran induzieren können.^[148] Durch einen effektiven Lipidsortierungsmechanismus können schließlich multivalente anionische Lipide rekrutiert werden, die zu einer höheren Ladungsdichte führen und die Bildung proteinangereicherter Domänen begünstigen.^[134] *In vivo*-Studien haben gezeigt, dass die Zusammensetzung der Ras-Nanocluster die Rekrutierung von Effektorproteinen und folglich die Aktivierung der Signalkaskaden reguliert. Dies könnte eine weitere Erklärung für die funktionelle Diversität der Ras-Isoformen liefern.^[130,131,149]

Um den Einfluss von PS auf die laterale Organisation von K-Ras4B und dessen Fähigkeit zur Ausbildung von Proteinclustern zu erforschen, wurden fluoreszenzmikroskopische Interaktionsstudien an Modellmembranen, die physiologisch relevante Mengen an PS enthalten, durchgeführt. Hierfür wurden GUVs aus der Lipidmischung DOPC/DOPS/DPPC/DPPS/Chol (20:5:45:5:25 mol%) hergestellt. Die l_d -Phase dieser phasenseparierten GUVs wurde mit dem fluoreszierenden Lipid *N*-Rh-DHPE sichtbar gemacht (siehe Abb. 4.1 B, D), wohingegen die verwendeten K-Ras4B-Proteine zur Visualisierung mit BODIPY modifiziert (siehe Abb. 4.1 A, C) waren. Das GDP-gebundene K-Ras4B-Protein wurde im Rahmen dieser Arbeit (siehe Kapitel 3) synthetisiert, wohingegen das GTP-gebundene K-Ras4B-Protein von der Arbeitsgruppe von Prof. Herbert Waldmann (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) semisynthetisch gemäß bekannten Vorschriften^[120,134] hergestellt und zur Verfügung gestellt wurde. Anstelle des GTP enthielt das K-Ras4B-Protein jedoch das nicht-hydrolysierbare GppNHp-Analogon, um den aktiven Zustand des K-Ras4B-Proteins während der Messungen zu gewährleisten.

Unmittelbar nach Zugabe der K-Ras4B-Proteine zu den GUVs mit 10 mol% PS-Lipiden konnte beobachtet werden, dass sich sowohl das inaktive als auch das aktive Protein bevorzugt in der l_d -Domäne der phasenseparierten GUVs aufhält (siehe Abb. 4.1). Außerdem ist in dieser Abbildung zu sehen, dass die Proteine unabhängig vom Nukleotid homogen in der l_d -Phase der PS-haltigen GUVs verteilt sind. Ein ähnliches Bindungsverhalten wurde für das aktive und inaktive K-Ras4B-Protein in PG-haltigen GUVs mit l_d/l_o -Phasenkoexistenz beobachtet.^[134] Eine mögliche Ursache für die bevorzugte Lokalisation von K-Ras4B in der l_d -Phase der Lipidmembran ist der sterische Anspruch der Farnesylgruppe, deren Einlagerung in die hoch geordneten Lipidphasen (l_o) verhindert wird. Dahingegen kann der Farnesylanker leichter in den weniger dicht gepackten und ungeordneteren Lipiddomänen (l_d) aufgenommen werden. Dieses Bindungsverhalten wurde kürzlich

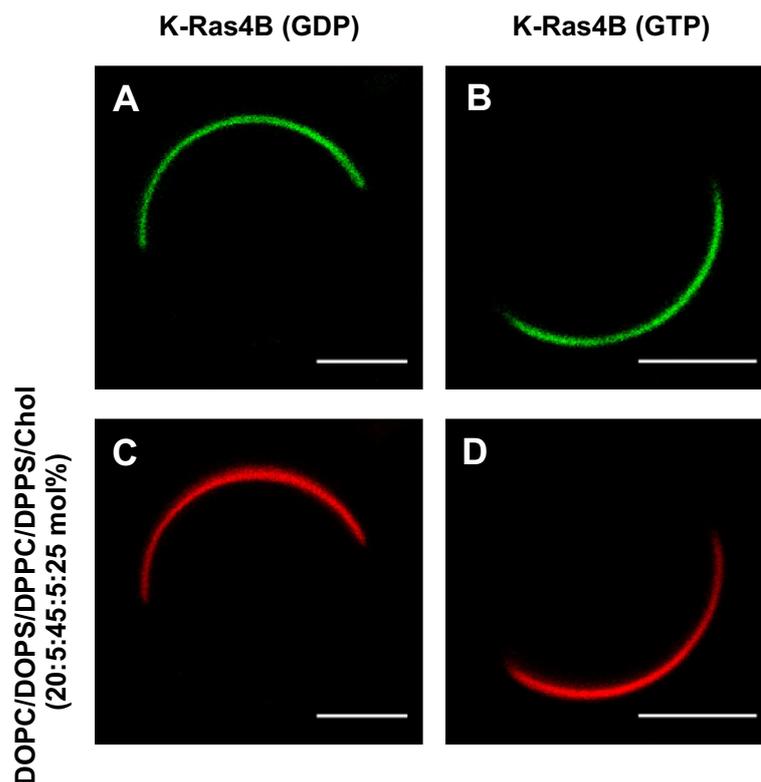


Abb. 4.1: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Bilder von BODIPY-markiertem K-Ras4B (GDP) (B) und K-Ras4B (GTP) (D) (grün, $c = 2 \mu\text{M}$) in phasenseparierten GUVs (A,C), die sich aus den Lipiden DOPC/DOPS/DPPC/DPPS/Chol (20:5:45:5:25 mol%) zusammensetzen. Die l_d -Phase der GUVs ist mit *N*-Rh-DHPE markiert (rot, 0,2 mol%). Der Maßstab beträgt $5 \mu\text{m}$ in allen Bildern. Adapted from: N. Erwin, B. Sperlich, G. Garivet, H. Waldmann, K. Weise and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 8954 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

für die HVR von K-Ras4B an Lipidmembranen unterschiedlicher Zusammensetzungen mithilfe von Molekulardynamik (MD)-Simulationen im atomaren Maßstab bestätigt.^[150] In der Studie von WEISE *et. al* wurden des Weiteren komplementäre hochauflösende Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM)-Experimente mit den phasenseparierten, PG-enthaltenden Membranen durchgeführt. Diese Messungen zeigten, dass die K-Ras4B-Proteine innerhalb der l_d -Phase der PG-haltigen Lipiddoppelschicht spontan neue proteinenthaltende Domänen bildeten, wobei die Clusterbildung für das aktive K-Ras4B ausgeprägter war.^[134]

Um den Effekt von PS auf die laterale Organisation und das Clusterverhalten der K-Ras4B-Proteine genauer zu untersuchen, wurden AFM-Experimente in DOPC-Membranen mit unterschiedlichen DOPS-Anteilen (0-10 mol%) durchgeführt (von Benjamin Sperlich, Doktorand am Lehrstuhl PC I, TU Dortmund). Die Ergebnisse zeigen, dass K-Ras4B (GDP) unabhängig von der verwendeten PS-Menge Proteincluster im Nanometerbereich an der Membranoberfläche bildet. Erstaunlicherweise konnten diese proteinenthaltenden Domänen auch in reinen DOPC-Lipiddoppelschichten beobachtet werden,^[125] was darauf hindeutet, dass anionische Lipide für die Bildung stabiler Proteincluster nicht erforderlich sind. Dieses Clusterverhalten wurde auch in früheren Studien für K-Ras4B in neutralen Membranen mit

l_d/l_o -Phasenkoexistenz beobachtet.^[134] Demzufolge wird die Bildung der K-Ras4B-Cluster in der fluiden Phase der Membran nicht allein durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der polybasischen Sequenz und den anionischen Lipiden kontrolliert, sondern wahrscheinlich auch durch Interaktionen mit der negativ geladenen Phosphatgruppe zwitterionischer Lipidkopfguppen. Tatsächlich zeigten MD-Simulationsstudien, dass einige Aminogruppen der Lys-Seitenketten in der K-Ras4B-HVR Wasserstoffbrückenbindungen mit den PC-Kopfguppen auch in Gegenwart anionischer Lipide ausbilden.^[146] Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eindeutig, dass anionische PS-Lipide keinen Einfluss auf die charakteristische Clusterbildung von K-Ras4B und die laterale Segregation in phasenseparierten Modellmembranen haben.

4.3.2 Ras-Proteine in GPMVs

Die Lokalisation und laterale Organisation der Ras-Proteine in Membranen wurde bereits in einigen *in vitro*-Studien untersucht.^[132–134,151] Hierbei wurden Modellmembranen eingesetzt, die sich aus einigen wenigen Lipiden oder viralen Lipidextrakten zusammensetzten. Die eukaryotische Plasmamembran, an der die Ras-vermittelte Signalübertragung vorwiegend abläuft, ist jedoch bezüglich der Lipid- und Proteinzusammensetzung viel komplexer aufgebaut (siehe Abschnitt 1.1). Um zu untersuchen, welche Auswirkungen komplexe zelluläre Membransysteme auf die Lokalisation und laterale Organisation der Ras-Proteine haben, wurden riesige Plasmamembranvesikel (*giant plasma membrane vesicles*, GPMVs) aus der Plasmamembran der Zelllinie RBL-2H3 isoliert und in fluoreszenzmikroskopischen Experimenten mit K-Ras4B und N-Ras verwendet.

Die Isolierung der GPMVs erfolgte unter Verwendung der bereits 1976 von SCOTT beschriebenen *Plasma Membrane Vesiculation*-Technik,^[152] bei der adhärenz wachsende Zellen Aldehyden und reduzierenden Reagenzien ausgesetzt werden. Unter diesen Bedingungen stülpt sich die Plasmamembran der Zellen aus und setzt Vesikel in das umgebende Medium frei. Da diese Vesikel direkt von der zellulären Plasmamembran isoliert werden, bestehen sie aus einer komplexen Mischung nativer Lipide und membrangebundener Proteine. Darüber hinaus weisen diese Vesikel im Durchschnitt einen Durchmesser von 10 μm auf, sind unilamellar und enthalten weder Zellkompartimente noch Teile des Zytoskeletts.^[153,154] Demzufolge stellen die GPMVs ein ideales Modell für natürliche Plasmamembranen dar. Für die in dieser Arbeit verwendete adhärenz Zelllinie RBL-2H3 wurde gezeigt, dass die isolierten GPMVs unter bestimmten Zellkultivierungsbedingungen und unter Verwendung bestimmter Aldehyde sowie Reduktionsmittel l_d/l_o -Phasenkoexistenzen aufweisen.^[138,154,155] Mit dem kürzlich etablierten Protokoll von SEELIGER *et al.* können GPMVs generiert werden, in denen ausgedehnte l_d - und l_o -Domänen in einem großen Temperaturbereich (5–70 °C) koexistieren (siehe Abb. 4.2C).^[138] Daher wurde dieses Protokoll für die Herstellung der GPMVs verwendet. Hierfür wurden die RBL-2H3 Zellen zunächst in MEM(–Gln)-

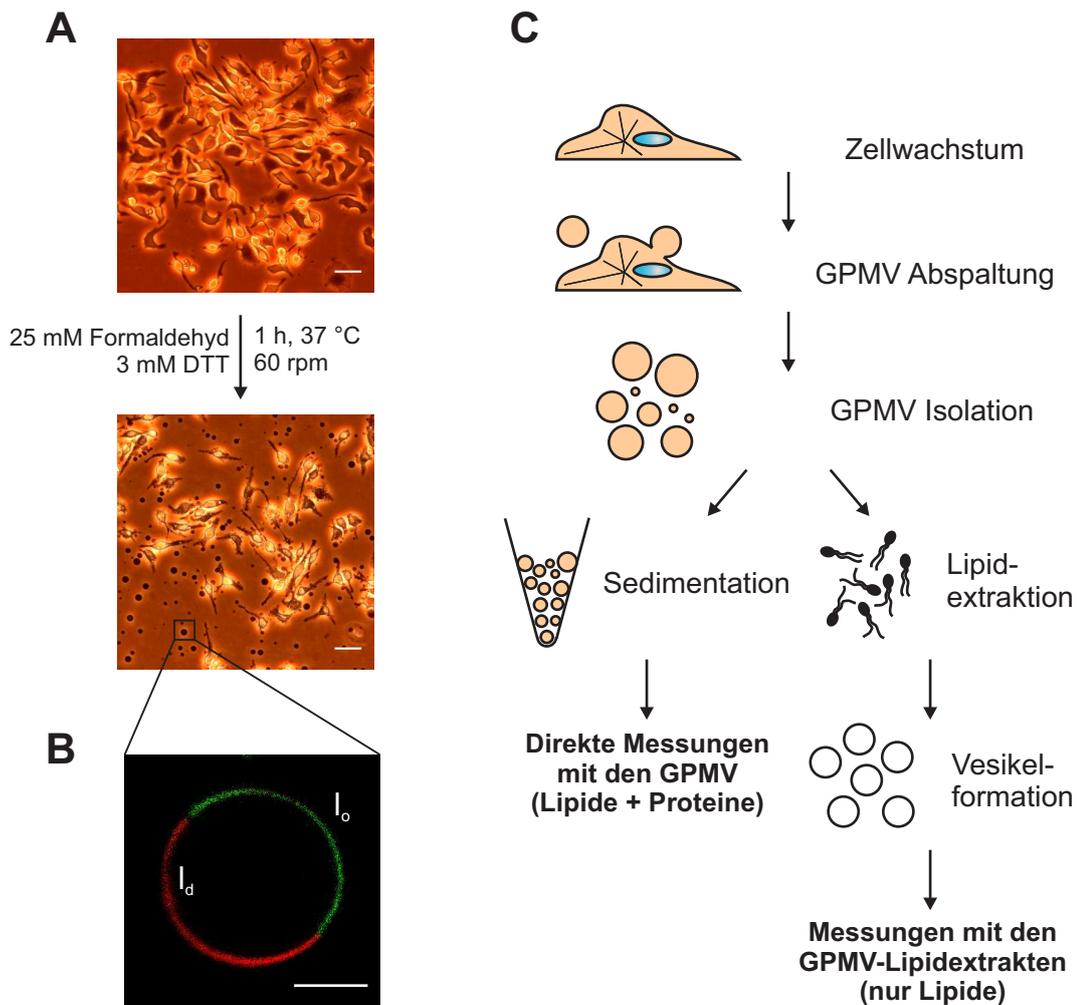


Abb. 4.2: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der RBL-2H3-Zellen vor und nach der Bildung der GPMVs (Maßstab: 50 μm) (A). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der isolierten GPMVs. Die Phasenkoexistenz wurde mithilfe der fluoreszenzmarkierten Lipide *N*-Rh-DHPE (rot, 0,2 mol%) und NBD-DHPE (grün, 0,2 mol%), die sich bevorzugt in die l_d - bzw. l_o -Phase des Membransystems einlagern, visualisiert (Maßstab: 5 μm) (B). Modifizierter Nachdruck aus Ref. [141]. Schematische Darstellung der GPMV-Isolierung und Lipidextraktion (C). Adapted from: J. Seeliger, N. Erwin, C. Rosin, M. Kahse, K. Weise and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 7507 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

Medium kultiviert (siehe Abschnitt 4.2.2). Durch die Zugabe von 25 mM Formaldehyd, der die Membranproteine durch Bindung der Amino- und Sulfhydrylgruppen vernetzt, und 3 mM DTT als Reduktionsmittel (siehe Abschnitt 4.2.3) wurde die Bildung der GPMVs induziert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C konnten die gebildeten GPMVs sowohl frei in Lösung als auch an der Zellmembran phasenkontrastmikroskopisch beobachtet werden (siehe Abb. 4.2A). Vor der weiteren Verwendung wurden die GPMVs über Nacht bei 4 °C sedimentiert. Die Phospholipidkonzentration (siehe Abschnitt 4.2.5) der unteren 20 % dieser Lösung betrug im Durchschnitt $\sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$. Darüber hinaus ist bekannt, dass Membranproteine etwa 40 % (w/w) dieser GPMVs ausmachen.^[138] Zur Visualisierung der l_d -Phase wurden die GPMVs mit dem fluoreszierenden Lipid *N*-Rh-DHPE inkubiert, bevor die BODIPY-markierten Ras-Proteine hinzugegeben wurden (siehe Ab-

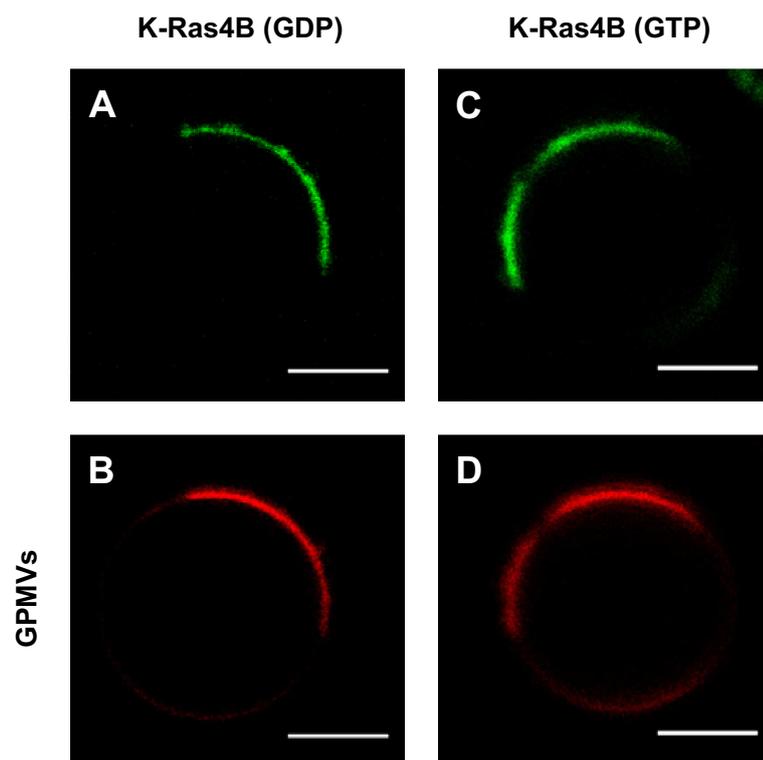


Abb. 4.3: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Bilder des BODIPY-markierten K-Ras4B-Proteins im inaktiven GDP-gebundenen (A) und aktiven GTP-gebundenen (C) Zustand (grün, $c = 2 \mu\text{M}$) in proteinhaltigen GPMVs (B,D) mit *N*-Rh-DHPE (rot, 0,2 mol%) als Marker für die l_d -Phase. Der Maßstab beträgt $5 \mu\text{m}$ in allen Bildern. Adapted from: N. Erwin, B. Sperlich, G. Garivet, H. Waldmann, K. Weise and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 8954 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

schnitt 4.2.8). Diese Proteine wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Herbert Waldmann (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) anhand etablierter Vorschriften^[118,120,134,156] synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Wie bei den vorherigen Experimenten, enthielten die GTPasen anstelle des GTP das nicht-hydrolysierbare GppNHp-Analogon. Zusätzlich wurde die Palmitoylgruppe in N-Ras durch eine Thioether-gebundene Hexadecylgruppe ersetzt, um die Hydrolysestabilität der Lipidmodifikation zu erhöhen.

In den Abbildungen 4.3 und 4.4 ist die laterale Verteilung von K-Ras4B und N-Ras in den phasenseparierten GPMVs nukleotidabhängig dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass sowohl das farnesylierte K-Ras4B als auch das dilipidierte N-Ras unabhängig vom gebundenen Nukleotid bevorzugt in der l_d -Domäne der GPMVs lokalisiert sind. Wie bereits in Abschnitt 4.3.1 erwähnt, wird die Bindung der Proteine in den *raft*-ähnlichen l_o -Phasen vermutlich durch den verzweigten Farnesylanker erschwert. Die Einlagerung dieser Lipidgruppe wird jedoch in der weniger dicht gepackten l_d -Phase begünstigt, ähnlich wie in anderen nicht-komplexen Modellmembranen.^[132–134,151]

Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass die Verteilung von K-Ras4B (GDP/GTP) innerhalb der l_d -Phase heterogen ist (siehe Abb. 4.3A und C), was auf die Bildung von proteinangereicherten Domänen in dieser Membranregion hindeutet. Diese Beobachtung wurde auch in neutralen und anionischen Membransystemen unterschiedlicher Komplexität

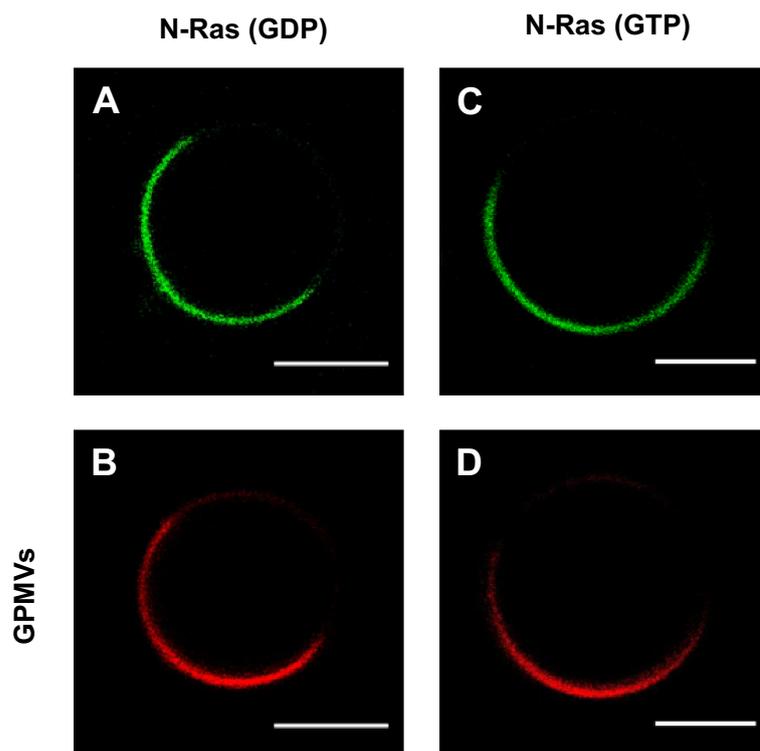


Abb. 4.4: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Bilder des BODIPY-markierten N-Ras-Proteins im inaktiven GDP-gebundenen (A) und aktiven GTP-gebundenen (C) Zustand (grün, $c = 2 \mu\text{M}$) in proteinhaltigen GPMVs (B,D) mit *N*-Rh-DHPE (rot, 0,2 mol%) als Marker für die l_d -Phase. Der Maßstab beträgt $5 \mu\text{m}$ in allen Bildern. Adapted from: N. Erwin, B. Sperlich, G. Garivet, H. Waldmann, K. Weise and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 8954 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

mithilfe von AFM-Experimenten gemacht.^[134] Da die einzelnen Proteindomänen nicht mit dem verwendeten Mikroskopieaufbau aufgelöst werden konnten, war eine quantitative Aussage über die Größe der Proteincluster nicht möglich. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der GPMVs und vor allem wegen der darin enthaltenen Membranproteine konnten keine komplementären hochauflösenden AFM-Messungen durchgeführt werden. Die Verteilung von N-Ras (GDP/GTP) in der l_d -Domäne der GPMVs ist im Gegensatz zu den K-Ras4B-Proteinen deutlich homogener (siehe Abb. 4.4A und C). In Membransystemen, die aus nur einem Lipid bestehen, konnten mithilfe von AFM- und FRET-Experimenten kleine N-Ras-Oligomere bzw. -Dimere beobachtet werden.^[125,157] Mit einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop können Oligomere in einer Größenordnung von wenigen Nanometern nicht aufgelöst werden. In anderen Studien, in denen heterogene Modellmembranen mit l_d/l_o -Phasenkoexistenz eingesetzt wurden, konnte beobachtet werden, dass das farnesylierte und hexadecylierte N-Ras bevorzugt an die l_d -Domäne bindet, anschließend in die l_d/l_o -Phasengrenze diffundiert und dort zu größeren Proteinclustern assoziiert.^[133,151] Es ist bekannt, dass an der Grenzfläche von l_d - und l_o -Domänen in einfachen Lipidsystemen aufgrund von lokalem Krümmungsstress und der Höhendifferenz der Lipidphasen eine hohe Grenzflächenenergie, hier auch Linienspannung genannt, vorliegt.^[158] Durch die Lokalisation von lipidierten Proteinen wie N-Ras an der Grenzfläche der Membrandomänen wird die energetisch ungünstige Linienspannung reduziert, weshalb die Akkumulation und

Clusterbildung von N-Ras in den Domänengrenzflächen begünstigt wird. Ähnlich wie bei K-Ras4B können solche Proteincluster wichtig für die Rekrutierung von Effektorproteinen und die Regulation intrazellulärer Signaltransduktionen sein.^[133]

Überraschenderweise wurde bei den GPMVs anders als bei den einfachen Lipidsystemen keine signifikante Akkumulation von N-Ras in der l_d/l_o -Phasengrenze detektiert (siehe Abb. 4.4A und B). Eine möglich Erklärung hierfür könnte die wesentlich geringere Linienspannung in Membranen mit komplexen Lipidzusammensetzungen sein.^[155,159] Da die GPMVs beinahe aus 300 verschiedenen Lipiden bestehen,^[138] können Lipide mit einem geeigneten Packungsparameter zur Reduktion der Linienspannung an die Phasengrenzen rekrutiert werden. Andererseits enthalten diese GPMVs bereits viele Proteine ($\sim 40\%$ (w/w)), die zum Teil in den Grenzflächen lokalisiert sein können, sodass die dort vorherrschende Linienspannung verringert wird. Um diese Möglichkeit auszuschließen und zu überprüfen, ob die in den GPMVs enthaltenen Proteine einen weiteren Effekt auf die Lokalisation der beiden Proteine N-Ras und K-Ras4B haben, wurden diese Untersuchungen auch in proteinfreien GUVs, die aus den extrahierten Lipiden der GPMVs hergestellt wurden, durchgeführt.

4.3.3 Ras-Proteine in proteinfreien GUVs aus GPMV-Lipidextrakten

Um den Einfluss der in den GPMVs enthaltenen Proteine auf die Verteilung der lipidierten Ras-Proteine in phasenseparierten Membranen abschätzen zu können, wurden die Lipide aus den GPMVs mittels einer Chloroform/Methanol-Mischung, wie in Abschnitt 4.2.4 beschrieben, extrahiert. In der wässrigen Methanol-Phase haben sich hauptsächlich hydrophile Zellkomponenten gelöst, wohingegen die Chloroform-Phase die wasserunlöslichen Lipide und andere hydrophobe Komponenten enthielt. Um den Anteil der Nicht-Lipidkomponenten zu reduzieren, wurden die Chloroform-Phase zusätzlich mit einer hochkonzentrierten KCl-Lösung und anschließend mit Milli-Q-H₂O gewaschen.^[160] Nach der Entfernung des Chloroforms mithilfe eines Rotationsverdampfers wurde die Konzentration der isolierten Phospholipide mit dem BARTLETT-Assay bestimmt (siehe Abschnitt 4.2.5). Mithilfe der Elektroformation konnten GUVs aus der komplexen Lipidmischung nur in geringer Ausbeute hergestellt werden. Aus diesem Grund wurden die GUVs aus den GPMV-Lipidextrakten mittels milder Hydratation (siehe Abschnitt 4.2.6.2) in 10 mM HEPES (pH = 7,4) generiert. Analog zu den Experimenten in Abschnitt 4.3.2 wurde hier *N*-Rh-DHPE zur Visualisierung der l_d -Domäne in den GUVs verwendet und die hinzugegeben Ras-Proteine waren mit BODIPY modifiziert.

Aus dem Vergleich von Abbildung 4.3, 4.4, 4.5 und 4.6 wird ersichtlich, dass die in den GPMVs enthaltenen Membranproteine keinen Einfluss auf die Verteilung der beiden Ras-Proteine in komplexen zellulären Membransystemen mit l_d/l_o -Phasenkoexistenz haben. Unabhängig von dem gebundenen Nukleotid sind N-Ras und K-Ras4B bevorzugt

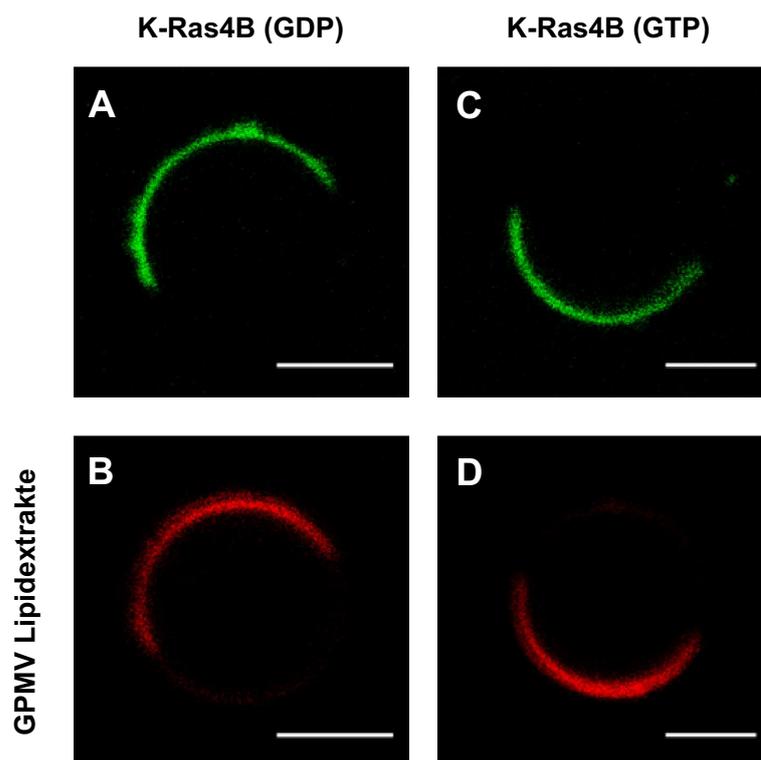


Abb. 4.5: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie Bilder des BODIPY-markierten K-Ras4B-Proteins im inaktiven GDP-gebundenen (A) und aktiven GTP-gebundenen (C) Zustand (grün, $c = 2 \mu\text{M}$) in GUVs, die aus den GPMV-Lipidextrakten hergestellt sind (B,D) und *N*-Rh-DHPE (rot, 0,2 mol%) als Marker für die l_d -Phase enthalten. Der Maßstab beträgt $5 \mu\text{m}$ in allen Bildern. Adapted from: N. Erwin, B. Sperlich, G. Garivet, H. Waldmann, K. Weise and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 8954 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

in der l_d -Domäne der proteinfreien Plasmamembranvesikel lokalisiert. Auch in diesem Membransystem ist eine deutliche Heterogenität der K-Ras4B-Proteinverteilung in der l_d -Domäne zu erkennen (siehe Abb. 4.5), was auf eine Clusterbildung dieses Proteins hindeutet. Die Bildung dieser Nanocluster scheint demnach ein allgemeiner Prozess der membranassoziierten K-Ras4B-Proteine zu sein, da dieser weitestgehend unabhängig von der Membranzusammensetzung abläuft. Dahingegen scheint die Verteilung der N-Ras-Proteine in dieser Lipidphase homogen zu sein. Eine Anreicherung der N-Ras-Proteine in der l_d/l_o -Phasenregion konnte auch in den proteinfreien Plasmamembranvesikeln nicht detektiert werden, was vermutlich auf die geringe Linienspannung in Membranen mit komplexer Lipidzusammensetzung zurückgeführt werden kann (siehe Abschnitt 4.3.2). Die Linienspannung an den Grenzflächen koexistierender l_d - und l_o -Lipidphasen ist folglich eine wichtige Determinante für die räumliche Organisation von Lipoproteinen in Membranen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Proteindomänen in diesem komplexen zellulären Membransystem viel kleiner als in einfachen Modellmembranen sind, sodass sie optisch nicht aufgelöst werden können.

Abschließend lässt sich aus dem Vergleich der Ergebnisse dieser und früherer Studien schlussfolgern, dass selbst relativ einfache Membranmodelle in der Lage sind, viele der Eigenschaften und Funktionen von komplexen biologischen Membranen zu reproduzieren.

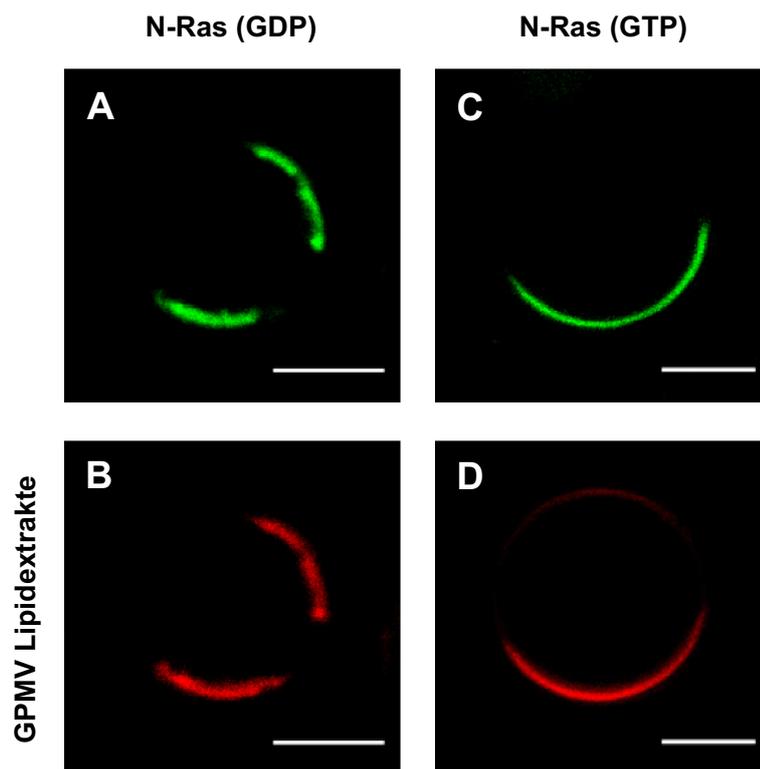


Abb. 4.6: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Bilder des BODIPY-markierten N-Ras-Proteins im inaktiven GDP-gebundenen (A) und aktiven GTP-gebundenen (C) Zustand (grün, $c = 2 \mu\text{M}$) in GUVs, die aus den GPMV-Lipidextrakten hergestellt sind (B,D) und *N*-Rh-DHPE (rot, 0,2 mol%) als Marker für die l_d -Phase enthalten. Der Maßstab beträgt $5 \mu\text{m}$ in allen Bildern. Adapted from: N. Erwin, B. Sperlich, G. Garivet, H. Waldmann, K. Weise and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 8954 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

Aufgrund ihrer geringen Lipiddiversität können einfache Lipidmischungen die Prozesse in der natürlichen Plasmamembran jedoch nicht vollständig beschreiben. Im Vergleich dazu stellen die proteinenthaltenden GPMVs ein gutes Modell für die natürliche Plasmamembran dar, da sie eine ähnlich komplexe Lipid- und Proteinzusammensetzung besitzen, dennoch weisen auch sie einige Einschränkungen als Modellsystem für zelluläre Membranen auf. Offensichtlich werden die Membrankomponenten bei der Herstellung der GPMVs durch den nicht spezifisch vernetzenden Formaldehyd und das Reduktionsmittel DTT teilweise kovalent modifiziert. Neben dieser chemischen Modifikation treten während der Isolierung der GPMVs viele unzählige Prozesse in der Zelle auf, die aufgrund ihrer Komplexität unmöglich vorhergesagt und kontrolliert werden können. Beispielsweise kommt es während der GPMV-Bildung zu einem partiellen Verlust der Lipiddoppelschichtasymmetrie, indem PS von der zytosolischen Seite der Plasmamembran auf die extrazelluläre Seite wechselt, was ein gravierender Unterschied zur Plasmamembran in lebenden Zellen ist. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die lokale Lipid- und Proteinzusammensetzung während des Abschnürungsprozesses ändert, um die auftretende Membrankrümmung zu ermöglichen. Daher entspricht die Zusammensetzung der GPMVs nur bedingt der der Plasmamembran. Schließlich repräsentieren die GPMVs die zelluläre Membran in einem thermodynamischen Gleichgewicht, wohingegen die Plasmamembran einer lebenden Zel-

le aufgrund der ständigen Modifikation der Zusammensetzung durch den vesikulären Transport, Recycling, Enzymaktivitäten oder die Interaktion mit dem Zytoskelett eine hochdynamische Struktur ist.^[154] Hinzu kommt, dass potentielle *raft*-Domänen in der Plasmamembran transient sind und Größen im Nanometerbereich aufweisen, wohingegen die Größe der koexistierenden Lipiddomänen in Modellmembranen im Mikrometerbereich liegt. Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen können GPMVs folglich nur Hinweise zur lateralen Segregation und Organisation lipidierter Proteine in der Plasmamembran lebender Zellen liefern.

4.4 Zusammenfassung

Da der nukleotidgebundene Zustand der G-Domäne sowie die komplexen Wechselwirkungen zwischen der Plasmamembran und den verschiedenen Ras-Lipidankern die räumliche Verteilung und Organisation der Lipoproteine an der Plasmamembran bestimmen, wurden im Rahmen dieser Studie die Einflüsse der Membranzusammensetzung und der daraus resultierenden physikalisch-chemischen Eigenschaften der Membran, wie z.B. Oberflächenladung, Phasentrennung, Fluidität und Packungsdichte, auf die laterale Segregation und das Clusterverhalten der lipidierten Proteine N-Ras und K-Ras4B im membrangebundenen Zustand untersucht. Als Modellmembran mit einer plasmamembranähnlichen Lipid- und Proteinzusammensetzung wurden GPMVs mit l_d/l_o -Phasenkoexistenz verwendet, die von der Plasmamembran der adhären Zelllinie RBL-2H3 isoliert wurden. Zusätzlich wurde der Effekt der in den GPMVs enthaltenen Membranproteine untersucht, indem die fluoreszenzmikroskopischen Messungen in Gegenwart und Abwesenheit dieser Proteine durchgeführt wurden.

In Kombination mit früheren Studien konnten mit den hier erhaltenen Ergebnissen ausgeprägte isoformspezifische Unterschiede hinsichtlich der lateralen Organisation und Clusterbildung von N-Ras und K-Ras4B in PS-haltigen sowie komplexen zellulären Membransystemen in Anwesenheit und Abwesenheit nativer Membranproteine beobachtet werden. In den letzten Jahren rückten die isoformspezifischen Ras-Nanocluster in den Fokus der Forschung, da diese wichtige Signalplattformen für die Rekrutierung und Aktivierung von Effektorproteinen darstellen und daher essentiell für die Signalweiterleitung sind.

Für K-Ras4B scheint die Bildung ausgedehnter Proteincluster ein allgemeiner Prozess bei der Membranbindung zu sein, da diese weitestgehend unabhängig von der Membranzusammensetzung abläuft. Häufig wurden spezifische Bindungen mit PS für die Bildung der K-Ras4B-Cluster diskutiert,^[130,131] was in dieser Studie jedoch nicht bestätigt werden konnte. Vielmehr wurde eindeutig gezeigt, dass unspezifische Wechselwirkungen mit der Membran für die Bildung der Proteincluster verantwortlich sind, da diese auch in reinen DOPC-Membranen und neutralen phasenseparierten Membransystemen detektiert werden konnten.^[125,134] Die selektive Lokalisation und charakteristische Clusterbildung

von K-Ras4B in der l_d -Domäne unterschiedlicher Membransysteme wird dennoch vorwiegend elektrostatisch durch den polybasischen, farnesylierten *C*-Terminus reguliert, da ein monofarnesyliertes Ras-Protein ohne polybasische Sequenz in phasenseparierten Lipiddoppelschichten in die l_d/l_o -Phasengrenzen diffundiert.^[133]

Im Gegensatz dazu wird die räumliche Verteilung und Organisation von N-Ras in Membransystemen mit l_d/l_o -Phasenkoexistenz im Wesentlichen durch die Linienspannung reguliert,^[133,151] die quadratisch von der Höhendifferenz der Lipidphasen abhängt.^[158] Nach der Einlagerung in die l_d -Phase diffundieren die lipidierten N-Ras-Proteine in die Phasengrenze und bilden dort Cluster, wodurch die energetisch ungünstige Linienspannung an der Phasengrenzfläche reduziert wird. In natürlichen Membranen sind solche Linienspannungen vermutlich kleiner,^[155,159] sodass keine ausgeprägte Anreicherung der N-Ras-Proteine in der Phasengrenzregion stattfindet. Dies wurde auch in den GPMVs beobachtet, in denen N-Ras homogen in der l_d -Phase verteilt war (siehe Abb. 4.4 und 4.6).

Abschließend lässt sich ebenfalls schlussfolgern, dass selbst relativ einfache Membranmodelle in der Lage sind, viele Eigenschaften und Funktionen biologischer Membranen zu reproduzieren. Auch wenn die GPMVs angesichts der Lipid- und Proteindiversität ein gutes Modell für die Plasmamembran darstellen, weisen sie einige gravierende Unterschiede zu dieser auf. Unter Berücksichtigung der gegebenen Einschränkungen können mithilfe von Modellmembranen verschiedener Zusammensetzungen und Komplexität trotz alledem die treibenden Kräfte der membranassoziierten Prozesse erkannt werden, was zu einem besseren Verständnis der Abläufe an der Plasmamembran lebender Zelle beitragen kann.

Konformationssubzustände von Calmodulin*

5.1 Einleitung

Aktivierende Mutationen in den *ras*-Genen, vor allem im *K-ras*-Gen, werden in mehr als 20-30 % aller menschlichen Krebserkrankungen identifiziert.^[71,72] Für die Aktivität der lipidierten Ras-Proteine ist die Lokalisation an der zytosolischen Seite der Plasmamembran ein kritischer Parameter, weshalb in der Zelle viele Mechanismen existieren, welche die Membranbindung dieser Signalproteine sowie deren Freisetzung von der Membran regulieren. Kürzlich wurde berichtet, dass Calmodulin (CaM) eine wichtige Rolle bei der Dissoziation von K-Ras4B von der Plasmamembran spielt, was zu einer Unterbrechung der nachgeschalteten Signaltransduktion führt, während die Lokalisation und Aktivität der anderen beiden Ras-Isoformen N-Ras und H-Ras nicht beeinflusst werden (siehe Abschnitt 1.2.4).^[103,104]

Das Ca^{2+} -bindende und hochflexible Protein CaM interagiert in der Zelle mit mehr als 300 verschiedenen Zielproteinen, die an zahlreichen intrazellulären Signalwegen beteiligt sind.^[162,163] Durch die Bindung von Ca^{2+} sowie die Assoziation mit den Zielproteinen durchläuft CaM charakteristische Konformationsänderungen, bei denen verschiedene Interaktionsgrenzflächen zwischen CaM und den Bindungspartnern gebildet und exponiert werden. Das kleine (16,7 kDa) CaM-Protein besteht aus einer *N*- und einer *C*-terminalen globulären Domäne, die über einen flexiblen, α -helikalen Linker verbunden sind. Beide Domänen besitzen jeweils zwei Ca^{2+} -bindende Struktur motive, auch als EF-Hand (Helix-Schleife-Helix) bekannt, weshalb CaM insgesamt vier Ca^{2+} -Ionen komplexieren kann. Die Bindungsstellen in der *C*-terminalen Domäne weisen jedoch eine höhere Bindungsaffinität

*Die Ergebnisse dieser Studie wurden in der Ref. [161] veröffentlicht und werden in diesem Kapitel teilweise wiedergegeben. Adapted from Ref. [161] with permission from the PCCP Owner Societies.

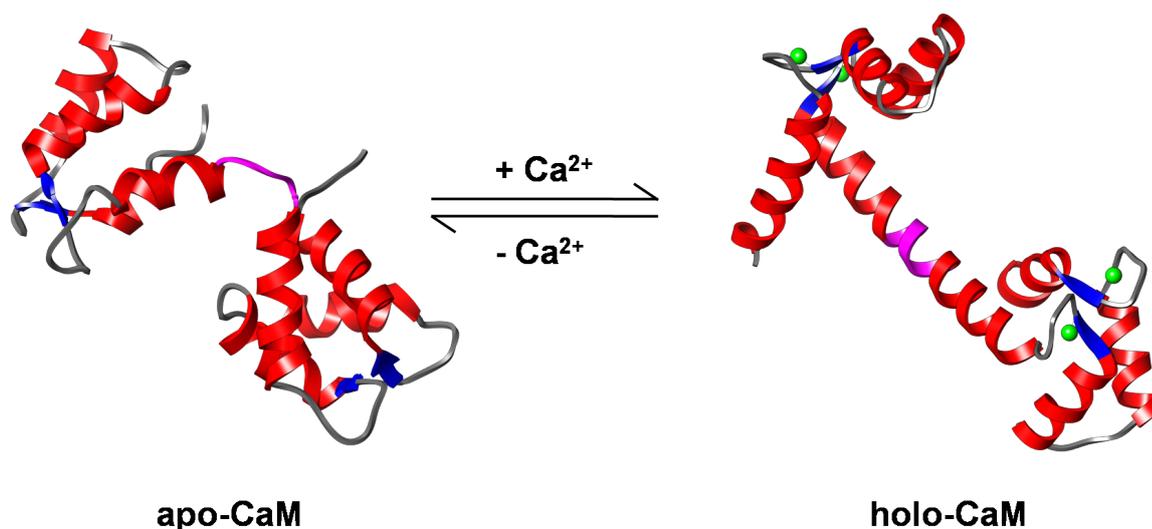


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Konformationsänderungen von CaM bei der Bindung von Ca^{2+} . Die Sekundärstrukturelemente sind wie folgt gefärbt: α -Helices in Rot, β -Faltblätter in Blau, *random coils* und β -Schleifen in Grau, flexible Linkerregion (AS-Reste 77-81)^[167] in Magenta. Die Strukturen (PDB-ID-Codes: 1DMO, 1CLL) wurden mit Chimera^[65] (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) dargestellt und modifiziert. Adapted from: N. Erwin, S. Patra and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 30020 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

für Ca^{2+} als die in der *N*-terminalen Domäne auf.^[164] In Abbildung 5.1 ist die Struktur des Ca^{2+} -freien Proteinzustandes (apo-CaM) zu sehen. In diesem Zustand sind die Helices der beiden EF-Hand-Strukturmodule einer Domäne antiparallel zueinander angeordnet, sodass die globulären Domänen eine relativ kompakte, bündelartige Struktur annehmen. Die Schleifen bleiben dabei jedoch an der Proteinoberfläche, sodass eine Bindung der Ca^{2+} -Ionen ermöglicht wird.^[165,166] Strukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass der kompakte Zustand von apo-CaM („geschlossen“) bei der Bindung von Ca^{2+} in eine längliche Hantelform („offen“) übergeht (siehe Abb. 5.1), was durch die nach außen gerichtete Rotation der beiden globulären Domänen verursacht wird. Im Ca^{2+} -gebundenen Zustand (holo-CaM) sind die hydrophoben Oberflächen und ionischen AS-Reste in den globulären Domänen für die verschiedenen Zielproteine leicht zugänglich.^[168–170] Die hantelförmige Struktur von holo-CaM wurde auch in RÖNTGEN-Kleinwinkelstreuung (*small angle X-ray scattering*, SAXS)-Experimenten beobachtet,^[171] wohingegen mithilfe von Kernspinresonanz (*nuclear magnetic resonance*, NMR)-Spektroskopie und MD-Simulation gezeigt wurde, dass die zentrale α -Helix in Lösung eher flexibel und dynamisch ist.^[167,172–174] Im Laufe der Zeit wurden viele verschiedene Kristallstrukturen von holo-CaM veröffentlicht, in denen auch das Ca^{2+} -gebundene Protein eine kompakte oder sogar längliche Form mit einem partiell entfaltenen, α -helikalen Linker annahm.^[175,176] All diese unterschiedlichen Strukturen von apo- und holo-CaM deuten darauf hin, dass dieses Protein verschiedene Konformationssubzustände (*conformational substates*, CS) annehmen kann, wodurch variable Bindungsflächen für die verschiedenen Zielproteine entstehen.^[177–179] Diese strukturelle Vielseitigkeit von CaM korreliert mit der funktionellen Diversität dieses Proteins *in vivo*.^[180]

Die meisten Bindungspartner von CaM haben nur eine geringe Sequenzhomologie, jedoch weisen sie alle hydrophobe und basische AS in ihrer CaM-Bindungsdomäne auf, die VAN DER WAALS-Kräfte und elektrostatische Wechselwirkungen mit den hydrophoben Regionen bzw. den sauren Seitenketten von CaM ($pI \sim 4,6$) ausbilden können. In den meisten Fällen umwickeln die *N*- und *C*-terminale Domäne von CaM die Bindungssequenz ihrer Zielproteine, was durch die partielle Entfaltung der zentralen α -Helix in CaM ermöglicht wird, sodass ein weitestgehend globulärer Komplex entsteht (siehe Abb. 5.2A).^[181] Die asymmetrische Ladungsverteilung in der Bindungsoberfläche von CaM trägt dazu bei, dass unterschiedliche Zielproteine abhängig von ihrer Polarität gebunden werden können und CaM dabei verschiedenen Konformationsänderungen unterliegt, um eine optimale Anlagerung der Zielproteine zu gewährleisten.^[182,183]

Interessanterweise wurden mit HIV-1 Nef, CAP-23/NAP-22 und MARCKS kürzlich mehrere Proteinsubstrate entdeckt, die Wechselwirkungen mit CaM ausbilden, obwohl diese keine kanonische CaM-Bindungsdomäne aufweisen. Diese enthalten jedoch alle eine Myristoylgruppe sowie eine benachbarte polybasische Sequenz, die in diesem Fall als CaM-Bindungsstellen fungieren.^[107,184,185] Im Gegensatz zu anderen CaM-bindenden Proteinen bilden diese lipidierten Proteine keine amphiphile α -Helix im CaM-Komplex, sondern lagern ihre sperrige Myristoylgruppe in einen großen hydrophoben Hohlraum ein, der durch die hydrophoben Regionen beider CaM-Domänen gebildet wird. CaM nimmt dennoch eine globuläre Form im Komplex mit diesen myristoylierten Peptiden an, die dem kanonischen CaM/Peptid-Komplex ähnelt (siehe Abb. 5.2).^[107]

Wie bereits erwähnt, wurde kürzlich auch das farnesylierte K-Ras4B-Protein als spezifischer CaM-Bindungspartner identifiziert.^[103,104] Neben dem Farnesylanker trägt auch die polybasische Sequenz in der HVR signifikant zur Bindung an CaM bei, da sich auf der Oberfläche von CaM viele negativ geladene AS befinden, die elektrostatische Wechselwirkungen mit den Lys-Resten der polybasischen Sequenz ausbilden können.^[105,106] Aus diesem Grund sind keine spezifischen Interaktionen zwischen CaM und den anderen beiden Ras-Isoformen, deren HVR keine polybasische Sequenz umfasst, bekannt. Mithilfe von NMR-Experimenten wurde gezeigt, dass die HVR von K-Ras4B aufgrund der hohen Dichte von negativ geladenen AS-Resten vorwiegend mit der zentralen α -Helix und der *C*-terminalen Domäne von CaM interagiert. Basierend auf dieser Studie wurde angenommen, dass diese Bindungspartner parallel zueinander angeordnet sind.^[106] Bislang fehlen jedoch detaillierte Strukturinformationen zu dem CaM/K-Ras4B-Komplex.

Dieses promiskuitive Bindungsverhalten führte zu der Annahme, dass verschiedene Konformationssubzustände von CaM in Lösung existieren,^[177–179] die aus intrinsischen Bewegungen und Fluktuationen des Proteins resultieren.^[186] Gemäß dem *conformational selection*-Modell für die Bildung eines Protein/Liganden-Komplexes binden die Liganden an die am meisten bevorzugte Proteinkonformation, wodurch das Gleichgewicht zu Gunsten dieses Konformationszustandes verschoben und somit die Verteilung der Population

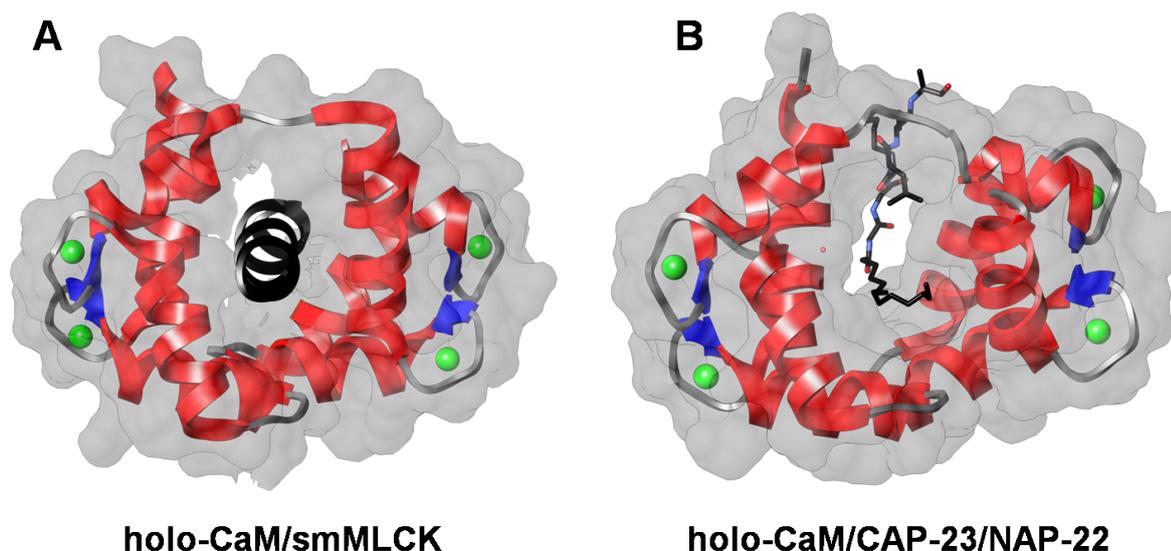


Abb. 5.2: CaM im Komplex mit dem smMLCK-Peptid (kanonische CaM-Bindungsdomäne) (A) und dem myristoylierten CAP-23/NAP-22-Peptid (B). Die Sekundärstrukturelemente sind wie folgt gefärbt: α -Helices in Rot, β -Faltblätter in Blau, *random coils* und β -Schleifen in Grau. Die Strukturen (PDB-ID-Codes: 1CLD und 1L7Z) wurden mit Chimera^[65] (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) dargestellt und modifiziert. Die Peptide sind in schwarz dargestellt.

moduliert wird.^[187] Da solche funktionell relevanten CS unter ungestörten Bedingungen häufig sehr kurzlebig sind und deren Anteil an der Population sehr gering ist, können sie nicht mithilfe von konventionellen spektroskopischen Methoden detektiert werden und bleiben meist unbemerkt.^[188] Um dennoch Einblicke in die Energielandschaft eines Proteins zu erhalten und seltene CS zu charakterisieren, wird die Populationsverteilung häufig chemisch (z.B. kleine Moleküle, pH-Wert, Ionenstärke), physikalisch (z.B. Temperatur, Druck) oder biochemisch (z.B. Liganden) moduliert (siehe Abb. 5.3). Mittels Temperaturänderungen, die sowohl die Energie als auch das Volumen des Systems beeinflussen, ist die Separation von Subzuständen, die sich nur durch geringe Energiedifferenzen unterscheiden, meistens nicht möglich. Im Gegensatz dazu stellt Druck ein effizientes Mittel dar, die Population der Zustände über Volumendifferenzen zu modulieren, ohne die innere Energie des Systems signifikant zu verändern. Bei höheren Drücken werden Zustände mit einem kleineren Partialvolumen nach dem Prinzip von LE CHÂTELIER bevorzugt, sodass deren Populationsanteil unter Druck erhöht wird und diese mittels spektroskopischer Methoden detektiert und charakterisiert werden können.^[189–191] Diese druckinduzierte Volumenabnahme resultiert zum einen aus dem Verlust der Hohlräume, die durch Packungsdefekte in dem nativ gefalteten Proteinensemble entstehen, und zum anderen aus der Elektrostriktion aufgebrochener Salzbrücken und neu exponierter, polarer AS-Reste.^[188,190,191] Im Allgemeinen wird vermutet, dass diese Zustände funktionell relevant sind und eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Bindung von Liganden spielen.^[192–194]

Um neue Einblicke in die Energielandschaft des hochflexiblen CaM-Proteins zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit druckabhängige FOURIER-Transform-Infrarot (FT-IR)-

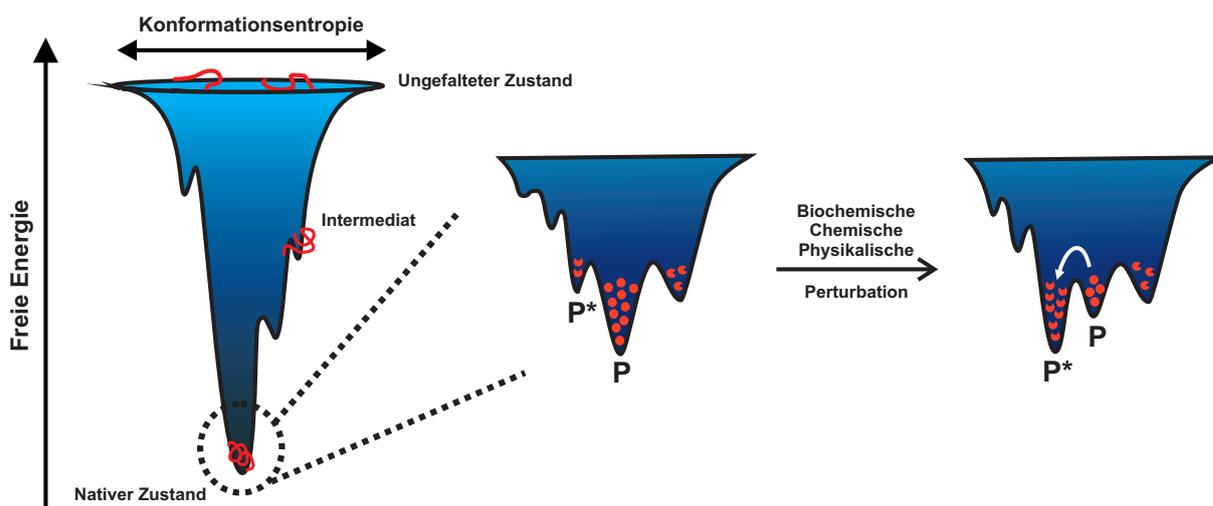


Abb. 5.3: Schematische Darstellung der Energielandschaft eines Proteinfaltungstrichters. Die Proteinfaltung wird durch die freie Energie als eine Funktion der Proteinkonformationen in Form eines Faltungstrichters dargestellt. Die lokalen Minima entlang der Faltungsrouten stellen Intermediate dar, deren hohe energetische Barriere überwunden werden muss, um das globale Minimum der nativen Konformation zu erreichen (links). Energielandschaft für das Ensemble der gefalteten Proteinzustände mit Minima, die verschiedenen CS entsprechen. Die Population kann biochemisch, chemisch oder physikalisch moduliert werden, sodass das Konformationsgleichgewicht zu energetisch höher liegenden Zuständen (P^*) verschoben und deren Anteil an der Population erhöht wird (rechts).

spektroskopische Studien durchgeführt. Zusätzlich wurde untersucht, welche Auswirkungen Ca^{2+} sowie die K-Ras4B-HVR auf die Konformationsdynamik und Auswahl der CS von CaM haben. Komplementäre SAXS-Experimente wurden durchgeführt, um die strukturellen Änderungen von CaM bei der Bindung des C-terminalen K-Ras4B-Peptids zu untersuchen. Diese Studie kann dazu beitragen, den zugrunde liegenden Bindungsmechanismus von CaM mit dem Signalprotein K-Ras4B besser zu verstehen und neue Erkenntnisse über Druckeffekte auf Proteinkonformationen zu gewinnen.

5.2 Material & Methoden

5.2.1 Material & Probenvorbereitung

In Tabelle 5.1 sind die in dieser Studie verwendeten Chemikalien, Proteine und Peptide sowie wie ihre Bezugsquellen zusammengefasst.

Tab. 5.1: Bezugsquellen der Chemikalien, Proteine und Peptide für die Untersuchungen der CaM-Konformationszustände.

Chemikalien, Proteine und Peptide	Bezugsquelle
BaSO ₄	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Calmodulin (Bovine brain, Calbiochem [®])	Merck (Darmstadt, Deutschland)
CaCl ₂	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DCl	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
D ₂ O	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
K-Ras4B-Peptid (NH ₂ -C(StBu)KKKKKKSKTKC(Far)-OCH ₃)	Eurogentec (Seraing, Belgien)
NaCl	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (Trizma [®])	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Trifluoressigsäure (TFA)	Carl Roth (Karlsruhe Deutschland)

Um das Ca²⁺ aus CaM zu entfernen, wurden 2 mg Protein ($c = 4 \text{ mg/mL}$) gegen 500 mL Dialysepuffer (50 mM TRIS (pH = 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM EGTA) bei 4 °C in einer Dialysekassette (Slide-a-LyzerTM 3.5K, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit einem Volumen von 0,5 mL für 2 Tage dialysiert. Da die Carboxylgruppen von EGTA ausgeprägte IR-Banden in der Region von 1630-1570 cm⁻¹ zeigen, die zum Teil die Amid-I'-Proteinbande (1700-1600 cm⁻¹) überlagern, wurde EGTA durch anschließende Dialyse gegen 500 mL Milli-Q-H₂O bei 4 °C für 2 Tage entfernt. In beiden Fällen wurden der Dialysepuffer und das Wasser alle 9-12 h gewechselt. Die Konzentrationen von CaM wurden mittels Absorptionmessungen bei 276 nm mit $\epsilon_{276} = 3006 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.5.1). Um das H₂O zu entfernen, wurden die Proteine in den für die Messung benötigten Mengen im Vakuum getrocknet. Alle Messungen wurden in D₂O-Puffer, der 50 mM TRIS (pD = 7,4), 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ enthielt, durchgeführt. Die Ausnahme stellten die apo-CaM-Experimente dar, in denen CaCl₂ im Puffer fehlte. Der pD-Wert wurde mit einer herkömmlichen pH-Elektrode eingestellt, wobei der gemessene pH-Wert um +0,4 korrigiert wurde.^[195] Die *S-tert*-Butylthio (StBu)-Schutzgruppe am *N*-terminalen Cys des K-Ras4B-Peptids wurde vor allen Experimenten durch Reduktion mit TCEP entfernt. Da das gekaufte Peptid als Gegenion TFA⁻ enthielt, das bei 1673 cm⁻¹

eine starke Absorptionsbande im IR-Spektrum zeigt und somit mit der Amid-I'-Bande des Protein/Peptid-Komplexes bzw. Peptids überlappt, wurde das Peptid in 0,1 M DCl gelöst und im Vakuum für mindestens 2 h getrocknet. Dies wurde ein weiteres Mal wiederholt, um TFA^- durch Cl^- als Gegenion auszutauschen.

5.2.2 Fluorescein-Markierung des K-Ras4B-Peptids

Nach der Entfernung der StBu-Schutzgruppe, wurde das K-Ras4B-Peptid in 20 mM TRIS (pH = 7,0) und 3 mM TCEP gelöst und mit 1,5 Äquivalenten des Farbstoffs Fluorescein-5-Maleimid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) ($c = 10$ mM, DMSO) gemischt. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt. Überschüssiger Farbstoff wurde anschließend unter Verwendung einer HiTrapTM Desalting-Säule (5 mL, GE Healthcare, Solingen, Deutschland) entfernt. Als Äquilibrierungs- und Elutionspuffer diente dabei 50 mM TRIS (pH = 7,4), 150 mM NaCl und 10 mM CaCl_2 .

5.2.3 Hochdruck-FT-IR-Spektroskopie

Für die FT-IR-Spektroskopie-Experimente von holo- und apo-CaM wurde das im Vakuum getrocknete Protein in einer Konzentration von 30 mg/mL in dem oben erwähnten Puffer entweder in Gegenwart oder in Abwesenheit von CaCl_2 gelöst. Die FT-IR-Spektroskopie-Messungen des K-Ras4B-Peptids in Abwesenheit von CaM wurden ebenfalls mit einer Konzentration von 30 mg/mL in Ca^{2+} -haltigen Puffer durchgeführt. Für die Untersuchungen des Protein/Peptid-Komplexes wurde das Protein in einem molaren Verhältnis von 1:10 mit dem K-Ras4B-Peptid versetzt, um eine Sättigung des CaM-Proteins sicherzustellen. Die Mischung wurde für 30 min inkubiert, um die Bildung des Protein/Peptid-Komplexes zu gewährleisten.

Die Hochdruck-FT-IR-Experimente wurden in einer membrangetriebenen Diamantstempelzelle (Diacell[®] Vivo DAC, Almax easyLab, Diskmuide, Belgien) durchgeführt. In die Zelle wurde ein Diamantfenster des Typs-IIa ($\varnothing = 4$ mm, Dicke 730 μm , Almax easyLab, Diskmuide, Belgien) gelegt, worauf schließlich ein Dichtungsring ($\varnothing = 4$ mm, Dicke 50 μm) aus Messing mit einer zentrierten Bohrung ($\varnothing = 0,5$ mm) als Probenraum ($V \sim 10$ nL) und Abstandshalter platziert wurde. In diese Bohrung wurden 3 μL der jeweiligen Probe sowie BaSO_4 als interner Druckindikator gegeben. Die Verschiebung der Absorptionsbande von BaSO_4 bei 983 cm^{-1} , die der symmetrischen Streckschwingung des Sulfats zugeordnet werden kann, ist proportional zum angewendeten Druck^[196] und wurde daher zur Druckbestimmung (± 20 MPa) benutzt.

Nach dem Zusammenbau wurde die Druckzelle in ein Nicolet Magna 550 FT-IR-Spektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) implementiert, das mit einem Stickstoff gekühlten MCT-Detektor (HgCdTe) ausgestattet ist und Spektren in einem Wellenzahlbereich von $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ aufnimmt. Das Spektrometer wurde kontinuierlich mit trockener

Luft gespült, um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis sicherzustellen. Durch einen automatisierten, pneumatischen Druckregler (PACE 5000, GE Sensing & Inspection Technologies, Hürth, Deutschland) konnte ein kontrollierter Druckaufbau zwischen 0,1 und 1200 MPa erzielt werden. Während der Messungen wurde die Temperatur in der Zelle mit einem digitalen Thermometer verfolgt und mithilfe eines externen Thermostaten konstant auf 25 °C ($\pm 0,2$ °C) gehalten. Nach jeder Druckänderung wurde die Probe für 7 min äquilibriert, bevor die Aufnahme des Absorptionsspektrums mithilfe der Software OMNICTM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) erfolgte. Jedes erhaltene Spektrum stellte das Mittel aus 256 einzelnen Interferometer-Scans mit einer spektralen Auflösung von 2 cm⁻¹ dar. Zur Apodisierung wurde eine HAPP-GENZEL-Funktion verwendet. Ein Hintergrundspektrum ohne Messzelle diente während der gesamten Messreihe als internes Referenzspektrum. Die erhaltenen FT-IR-Spektren wurden mit der Software GRAMS/AITM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ausgewertet. Hierfür wurden zunächst von allen Spektren der Probe die jeweiligen Pufferspektren subtrahiert. Daraufhin erfolgte eine Basislinienkorrektur und Flächennormierung der Spektren in der Wellenzahlregion von 1700-1525 cm⁻¹. Anschließend wurde die 2. Ableitung gebildet, um die Bandenauflösung zu verstärken. Dadurch konnte außerdem die Lage und Anzahl der Subbanden, die der Amid-I'-Bande zugrunde liegen und den unterschiedlichen Sekundärstrukturelementen zugeordnet werden können, bestimmt werden.^[197] Für die quantitative Sekundärstrukturanalyse wurden alle Spektren zunächst im Bereich der Amid-I'-Bande (1700-1600 cm⁻¹) basislinienkorrigiert, flächennormiert und anschließend mit vier Subbanden, die durch GAUSS-Kurven beschrieben wurden, angepasst. Bei der quantitativen Bandenanalyse wird vorausgesetzt, dass die verschiedenen Sekundärstrukturelemente ähnlich große Extinktionskoeffizienten besitzen und demzufolge die Flächeninhalte der einzelnen Subbanden den Anteil der Sekundärstruktur an der gesamten Proteinstruktur repräsentieren.

Aus der Auftragung der Sekundärstrukturanteile als Funktion des Drucks konnte die Änderung des Standard-Volumens ΔV^\ominus zwischen zwei Konformationssubzuständen, CS₁ und CS₂, unter der Annahme eines thermodynamischen Gleichgewichts ermittelt werden, denn die Volumenänderungen, die mit diesen Konformationsänderungen einhergehen, können bei einer gegebenen Temperatur T wie folgt beschrieben werden:

$$\Delta V^\ominus = V_2^\ominus - V_1^\ominus = \left(\frac{\partial \Delta G^\ominus(p)}{\partial p} \right)_T \quad (5.1)$$

Wie in Gleichung 5.2 beschrieben, ergibt sich die Änderung der Standard-GIBBS-Energie $\Delta G^\ominus(p)$ bei dem Druck p aus der Gleichgewichtskonstanten $K(p)$, die aus den Anteilen der Sekundärstrukturanteile der beiden CS bestimmt werden kann:

$$\Delta G^\ominus(p) = -RT \ln K(p) = -RT \ln \left(\frac{x_1 - x(p)}{x(p) - x_2} \right) \quad (5.2)$$

$x(p)$ beschreibt dabei den Sekundärstrukturanteil bei dem Druck p , x_1 sowie x_2 die asymptotischen Anteile der Sekundärstrukturelemente von CS₁ bzw. CS₂ und R die Gaskonstante. Die BOLTZMANN-Gleichung (siehe Gl. 5.3) wurde schließlich verwendet, um den druckabhängigen Kurvenverlauf der Sekundärstrukturanteile anzupassen

$$x(p) = \frac{x_1 - x_2}{1 + e^{-(p-p_m)(\Delta V^\ddagger/RT)}} + x_2 \quad (5.3)$$

Der Übergangsdruck p_m kann aus dem Wendepunkt dieser Funktion bestimmt werden.

5.2.4 RÖNTGEN-Kleinwinkelstreuung

Die SAXS-Experimente wurden an dem Instrument SAXSess mc² (Anton Paar, Graz, Österreich), welches eine Röntgenröhre mit einer Kupferanode enthielt, durchgeführt. Mithilfe eines BRAGG-Gitters wurde ein monochromatischer Strahl mit einer Wellenlänge von 1,54 Å erzeugt. CaM wurde entweder in Abwesenheit oder in Gegenwart eines zehnfachen molaren Überschusses des K-Ras4B-Peptids in dem oben genannten Puffer einschließlich CaCl₂ gelöst, sodass eine Proteinkonzentration von 10 mg/mL erhalten wurde. Um die Bildung des Protein/Peptid-Komplexes sicherzustellen, wurden die Proben bei Raumtemperatur für 15 min äquilibriert. Die jeweilige Probe wurde in einer Quarzkapillare mit einem Durchmesser von 1 mm und einem Probenvolumen von 10 µL vermessen. Zur Detektion des Streulichts wurden Bildplatten eingesetzt und die Streumuster mit einer Belichtungszeit von 30 min pro Bild aufgenommen. Die Temperatur betrug 25 °C während der Experimente und wurde über einen externen Thermostat kontrolliert. Die Rohdaten wurden auf die Primärstrahlintensität normiert und um den Streubeitrag des Puffers korrigiert. Unter Verwendung von SAXSquant 3.1 (Anton Paar, Graz, Österreich) wurden die 2D-Streubilder integriert, um 1D-Streukurven mit Streuintensitäten $I(q)$ in Abhängigkeit des Streuvektors $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta)$ zu erhalten, wobei θ der halbe Streuwinkel ist. Die Entschmierung und Berechnung der Abstandsverteilungsfunktion $P(r)$ wurden mit der Software GNOM^[198] durchgeführt.

5.2.5 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS)-Messungen wurden unter Verwendung eines konfokalen Fluoreszenzmikroskop-Systems (MicroTime 200, PicoQuant, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Dieses wurde um ein inverses Mikroskop (IX71, Olympus, Tokio, Japan) erweitert, welches mit einem Wasserimmersionsobjektiv (UpplansApo, 60×, NA 1,2, Olympus, Tokio, Japan) ausgestattet war. Die Anregung von Fluorescein erfolgte mithilfe eines gepulsten Diodenlaser bei 485 nm (FWHM = 600 ps, Impulsfrequenz 20 MHz). Durch eine gekoppelte polarisationserhaltende Einmodenfaser wurde der Laserstrahl von dem Diodenlaser zur optischen

Haupteinheit geführt, in der das Anregungslicht durch einen dichroitischen Spiegel zur Eintrittsöffnung des Mikroskops reflektiert wurde. Die Objektivlinse fokussierte den Laserstrahl in den Proben tropfen, der auf einem Deckglas platziert war. Die von der Probe emittierte Fluoreszenz folgte dem gleichen Pfad durch den dichroitischen Spiegel, passierte dann einen 510 nm Langpass-Emissionsfilter sowie eine Lochblende (Durchmesser 50 μm), bevor das emittierte Licht auf die Single-Photon-Avalanche-Dioden (SPCM-AQR series SPAD) im Einzelphotonen-Zählmodus traf. Die Autokorrelationskurven wurden unter Verwendung der Fluoreszenzlebensdauerkorrelationsspektroskopie (*fluorescence lifetime correlation spectroscopy*, FLCS)-Methode generiert, um die gebundenen und ungebundenen Peptide, die sich aufgrund der unterschiedlichen molekularen Umgebung in ihrer Abklingzeit unterscheiden, im FCS-Experiment separieren zu können. Die Fluoreszenzsignale wurden dabei bezüglich der Lebensdauer getrennt, sodass die Autokorrelationskurve für jede Lebensdauerkomponente einzeln berechnet werden konnte. Zudem kann mittels FLCS das Nachpulsen der Detektoren größtenteils unterdrückt werden, das bei herkömmlichen FCS-Messungen üblicherweise zu Artefakten in der Autokorrelationskurve bei kürzeren Korrelationszeiten führt.^[199] Die Signalausgabe des Detektors wurde von einem TCSPC (*time-correlated single photon counting*)-Modul (TimeHarp 200, PicoQuant, Berlin, Deutschland) im TTTR (*time-tagged time-resolved*)-Modus erfasst. Die anschließende Analyse der Autokorrelationskurven wurde mit der SymPhoTime-Software (PicoQuant, Berlin, Deutschland) durchgeführt.

Die erhaltene Autokorrelationskurve $G(\tau)$ für das K-Ras4B-Peptid in Abwesenheit von CaM wurde an ein einfaches 3D-Diffusionsmodell mit einer Komponente gemäß Gleichung 5.4 ($i = 1$) angepasst. In Gegenwart von CaM wurde das Modell um einen weiteren exponentiellen Term erweitert, um eine bestmögliche Anpassung an die Daten zu erzielen.

$$G(\tau) = \left(1 - T + T \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_f}}\right) \sum_{i=1}^k \rho_i \left(1 + \frac{\tau}{\tau_i}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_i \kappa_w^2}\right)^{-\frac{1}{2}} \quad (5.4)$$

In dieser Gleichung beschreibt die Diffusionszeit τ_i die durchschnittliche Zeit, die ein Fluorophor im Detektionsvolumen verbleibt, wohingegen T und τ_f den Anteil der Moleküle, die schnelleren Fluktuationen unterliegen, bzw. die Zeitdauer der schnelleren Fluktuationen bezeichnen. τ repräsentiert die Verzögerungszeit und ρ_i ist gegeben durch

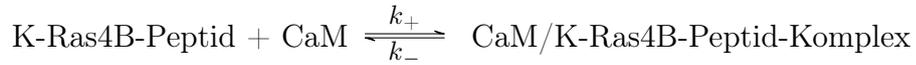
$$\rho_i = \frac{\alpha_i}{\langle N \rangle (1 - T)} \quad (5.5)$$

Dabei wird der Anteil der Moleküle α_i mit der Diffusionszeit τ_i und die mittlere Anzahl $\langle N \rangle$ der Moleküle im Detektionsvolumen berücksichtigt. κ_w stellt den Strukturparameter des Beobachtungsvolumens dar und ist gegeben durch $\kappa_w = \frac{w_z}{w_{xy}}$ mit w_z und w_{xy} als axialen und lateralen Radius des Beobachtungsvolumens. κ_w wurde unter Verwendung von Atto 488 (ATTO-TEC, Siegen, Deutschland) mit dem bekannten Diffusionskoeffizienten von

400 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ in Wasser^[200] kalibriert, woraus ein Beobachtungsvolumen von 6 fL ermittelt werden konnte. Der Diffusionskoeffizient D wurde schließlich aus τ_i mittels folgender Gleichung berechnet:

$$\tau_i = \frac{w_{xy}^2}{4D} \quad (5.6)$$

Bei allen FCS-Messungen wurde die Konzentration des Fluorescein-markierten K-Ras4B-Peptids konstant bei ~ 16 nM gehalten, wohingegen die Konzentration von CaM von 0-1000 μM variiert wurde. Nach dem Mischen des Peptids mit dem Protein, wurden die Proben für mindestens 15 min inkubiert, um die Bildung des Protein/Peptid-Komplexes sicherzustellen. Alle Messungen wurden 5-10 Mal bei Raumtemperatur in dem oben erwähnten Puffer einschließlich 10 mM CaCl_2 durchgeführt. Da die Assoziation der K-Ras4B-HVR mit CaM relativ schwach ist, könnte der Austausch des Fluorescein-markierten Peptids zwischen dem freien und dem CaM-gebundenen Zustand schneller als die Diffusionszeit durch das Beobachtungsvolumen sein. Aus diesem Grund stellt der ermittelte Diffusionskoeffizient einen mittleren Wert dar, der die Beiträge des freien sowie des CaM-gebundenen K-Ras4B-Peptids berücksichtigt. AL-SOUFI *et al.* haben den Zusammenhang zwischen der mittleren Diffusionszeit $\bar{\tau}_i$ und der Bindungskonstante K_b unter Berücksichtigung der schnellen Austauschdynamik von Molekülen ausführlich hergeleitet.^[201] Die Assoziation des Fluorescein-markierten K-Ras4B-Peptids mit CaM resultiert in einem fluoreszierenden CaM/K-Ras4B-Peptid-Komplex und kann wie folgt dargestellt werden:



Dabei bezeichnen k_+ und k_- die Assoziations- bzw. Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, deren Quotient der Bindungskonstante $K_b = \frac{k_+}{k_-}$ entspricht. Wie in Gleichung 5.7 gezeigt, kann der mittlere Diffusionskoeffizient \bar{D} als Summe der einzelnen Diffusionskoeffizienten D_{Pep} und $D_{\text{CaM/Pep}}$ sowie der jeweiligen Stoffmengenanteile x_{Pep} und $x_{\text{CaM/Pep}}$ beschrieben werden:

$$\bar{D} = x_{\text{Pep}} \cdot D_{\text{Pep}} + x_{\text{CaM/Pep}} \cdot D_{\text{CaM/Pep}} \quad (5.7)$$

Mit den Gleichungen 5.6 und 5.7 kann die mittlere Diffusionszeit τ_i direkt als Funktion der Bindungskonstante und der CaM-Konzentration $[\text{CaM}]$ ausgedrückt werden:

$$\bar{\tau}_i = \frac{\tau_{\text{Pep}}(1 + K_b[\text{CaM}])}{1 + \frac{\tau_{\text{Pep}}}{\tau_{\text{CaM/Pep}}} K_b[\text{CaM}]} \quad (5.8)$$

τ_{Pep} und $\tau_{\text{CaM/Pep}}$ repräsentieren die Diffusionszeit des Peptids in Abwesenheit von CaM und bei derjenigen CaM-Konzentration, bei der alle in Lösung verfügbaren Peptide gebunden sind. Mit steigender $[\text{CaM}]$ verschiebt sich die beobachtete Diffusionszeit von τ_{Pep} zu $\tau_{\text{CaM/Pep}}$.

5.3 Ergebnisse & Diskussion

5.3.1 Einfluss von Ca^{2+} auf die druckabhängigen CS von CaM

Um neue Einblicke in die Energielandschaft von CaM zu bekommen, wurden FT-IR-spektroskopische Messungen unter hohen hydrostatischen Drücken durchgeführt (siehe Abschnitt 5.2.3). Bezüglich der Sekundärstruktur weisen apo- und holo-CaM eine hohe Druckstabilität in einem Bereich von 0,1-1200 MPa auf (siehe Abb. A.4). Bei Atmosphärendruck liegen die Maxima der Amid-I'-Banden ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) in den Absorptionsspektren von apo- und holo-CaM jeweils bei 1643 cm^{-1} und 1644 cm^{-1} (siehe Abb. 5.4A (i) und (ii)). Die Amid-I'-Banden in den Absorptionsspektren der beiden CaM-Zustände unterscheiden sich kaum voneinander, jedoch konnten durch die Bildung der 2. Ableitung der entsprechenden Spektren einige Unterschiede deutlich sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 5.4B (i) und (ii)). Neben den Minima bei $1676/1675\text{ cm}^{-1}$ und $1643/1644\text{ cm}^{-1}$, die für beide Formen auftreten, weist die 2. Ableitung des Absorptionsspektrum von holo-CaM ein ausgeprägtes Minimum bei 1662 cm^{-1} auf, das bei apo-CaM weniger intensiv ist. Dahingegen hat das breite Minimum um 1644 cm^{-1} in der 2. Ableitung von apo-CaM bei etwa 1648 cm^{-1} und 1643 cm^{-1} zwei Schultern, die charakteristisch für die C- bzw. N-terminale Domäne von apo-CaM sind.^[202] Darüber hinaus kann in der 2. Ableitung von apo-CaM eine kleine Schulter bei etwa 1631 cm^{-1} beobachtet werden, die bei holo-CaM kaum sichtbar ist.

Die Zuordnung dieser Banden zu Sekundärstrukturelementen ist nicht einfach, da die Amid-I'-Bande von CaM um 1644 cm^{-1} zentriert ist, was normalerweise auf ungeordnete Strukturen hindeutet.^[203] Kristallstrukturanalysen^[169] und andere Strukturuntersuchungen mittels Circular dichroismus (CD)-^[204] oder NMR-Spektroskopie^[165] zeigten dahingegen, dass CaM einen hohen Anteil an α -Helices besitzt. Folglich haben TREWHELLA *et al.* vorgeschlagen, dass die für CaM charakteristische Verschiebung der IR-Bande zu niedrigeren Wellenzahlen auf die starken Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carbonylgruppen im Peptidrückgrat der exponierten Helices und den Lösungsmittelmolekülen zurückzuführen ist.^[205] Daher tragen sowohl ungeordnete als auch helikale Strukturen zu der Bande bei 1644 cm^{-1} bei, weshalb die Unterscheidung zwischen diesen Strukturelementen erschwert wird. Die IR-Bande bei $1676\text{ cm}^{-1}/1675\text{ cm}^{-1}$ kann den β -turns und -Schleifen zugeordnet werden, während die Bande bei 1662 cm^{-1} sowohl Beiträge von den β -turns/-Schleifen als auch von den Helices enthält.^[202,205,206] Im Allgemeinen wird die Subbande bei ungefähr 1631 cm^{-1} den β -Faltblättern zugeordnet, die in CaM jedoch nur zu geringen Anteilen ($\sim 4\text{-}6\%$) zwischen den beiden Ca^{2+} -bindenden Schleifen gefunden werden können (siehe Abb. 5.1). Diese Bande kann jedoch auch längliche Ketten, die α -helikale Zylinder verbinden und häufig in Proteinen mit hohem helikalen Inhalt gefunden werden, repräsentieren.^[205,207,208] Neueste FT-IR-Studien haben gezeigt, dass

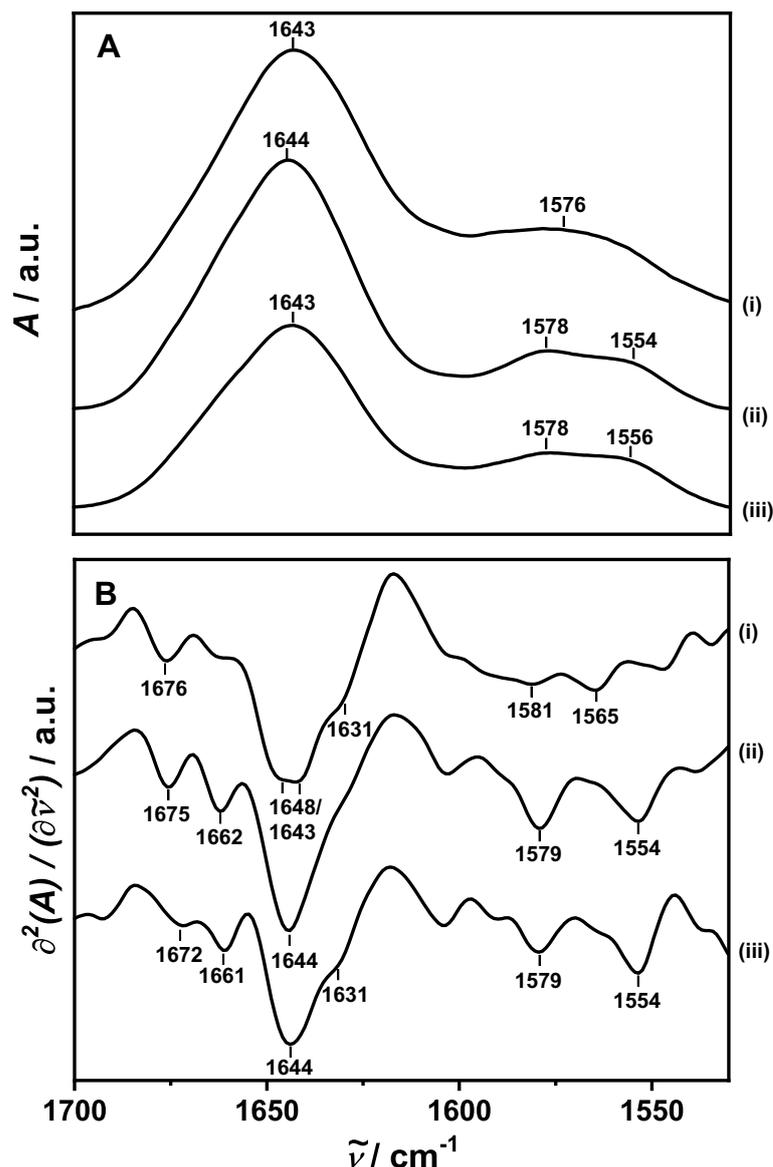


Abb. 5.4: FT-IR-Absorptionsspektren von apo-CaM (i), holo-CaM (ii) und holo-CaM/K-Ras4B-Peptid (1:10) (iii) in den jeweiligen D_2O -Puffern bei 25°C , $0,1\text{ MPa}$ und $c_{\text{Protein}} = 10\text{ mg/mL}$ (A). Die jeweilige 2. Ableitung dieser Spektren (B). Adapted from: N. Erwin, S. Patra and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 30020 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

lösungsmittlexponierte α -Helices in Alanin-basierten und *coiled coil*-Peptiden ebenfalls zu der IR-Bande bei $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$ beitragen können. Diese Helices wurden interessanterweise mit zunehmendem Druck stabilisiert.^[209,210]

Die Anwendung von hohen hydrostatischen Drücken führte nur zu kleinen Änderungen in den resultierenden Spektren, was darauf hindeutet, dass CaM sowohl im Ca^{2+} -freien als auch im Ca^{2+} -gebundenen Zustand gleichmäßigen Drücken bis zu 1200 MPa standhält, weshalb beide Zustände für eine solche Analyse von CS geeignet sind. Diese Druckstabilität scheint für EF-Hand-Proteine nicht ungewöhnlich zu sein, da z.B. Troponin C unter Druck nur bei der Verwendung von hohen Harnstoffkonzentrationen denaturiert.^[211] In Abbildung 5.5 sind die Differenzspektren beider CaM-Formen, bei denen das jeweilige puffer-, basislinienkorrigierte und flächennormierte Spektrum bei $0,1\text{ MPa}$ von den Spektren bei

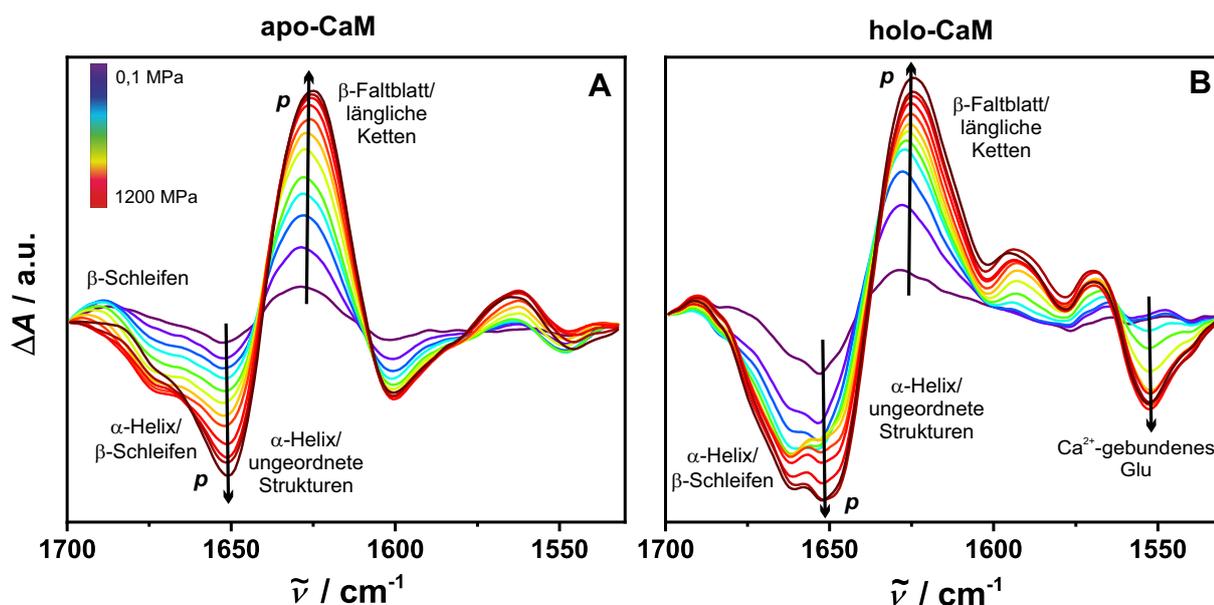


Abb. 5.5: Druckabhängige Differenzspektren von apo-CaM (A) und holo-CaM (B). Die jeweiligen puffer-, baselinienkorrigierten und flächennormierten Spektren bei 0,1 MPa werden dabei von den Spektren bei höheren Drücken subtrahiert. Adapted from: N. Erwin, S. Patra and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 30020 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

höheren Drücken subtrahiert wurde, dargestellt. Hier wird deutlich, dass die größten druckinduzierten Änderungen in den Amid-I-Banden zwischen 1674 cm^{-1} und 1652 cm^{-1} sowie bei $1631\text{--}1628\text{ cm}^{-1}$ auftreten, wobei die Intensitätsabnahme bei 1662 cm^{-1} für holo-CaM deutlich stärker ausgeprägt ist als für apo-CaM.

Diese Änderungen sind in den Spektren der 2. Ableitung deutlicher sichtbar (siehe Abb. 5.6). Für holo-CaM nimmt das Minimum bei 1644 cm^{-1} mit zunehmendem Druck ab, während gleichzeitig eine Schulter bei 1631 cm^{-1} erscheint. Diese spektralen Änderungen resultieren vermutlich aus einer partiellen Entfaltung der α -Helices und der damit einhergehenden Bildung länglicher Kettensegmente zwischen den verbleibenden α -Helices^[208] oder aus der Exposition α -helikaler Segmente.^[209,210] In Abbildung 5.6B ist ab 300 MPa außerdem eine Aufspaltung des Minimums bei ungefähr 1662 cm^{-1} in die zwei Banden bei 1665 cm^{-1} und 1657 cm^{-1} zu sehen, die jeweils den β -Schleifen und α -helikalen Strukturen zugeordnet werden können. Solch eine druckinduzierte Spaltung von FT-IR-Banden wurde auch für andere Proteine, wie z.B. N-Ras, beobachtet.^[193] Die Verschiebung der Bande zu niedrigeren Wellenzahlen kann auf die Exposition α -helikaler Strukturen zurückgeführt werden, weil dadurch ein H/D-Austausch für die Reste, die zuvor ins Proteininnere gerichtet waren und keinen Zugang zu dem deuterierten Lösungsmittel hatten, ermöglicht wird.^[212] Der H/D-Austausch wird im Allgemeinen durch Druck verstärkt, da Wassermoleküle mit zunehmendem Druck ins Proteininnere eindringen.^[191] Für apo-CaM verschiebt sich das Minimum bei 1644 cm^{-1} mit steigendem Druck zu niedrigeren Wellenzahlen, was darauf hindeutet, dass die helikalen Strukturen dem Lösungsmittel stärker ausgesetzt werden und die α -Helices sich teilweise durch Bildung länglicher Ketten entfalten, auch wenn die Schulter bei 1631 cm^{-1} weniger ausgeprägt ist als für holo-CaM (siehe Abb. 5.6A).

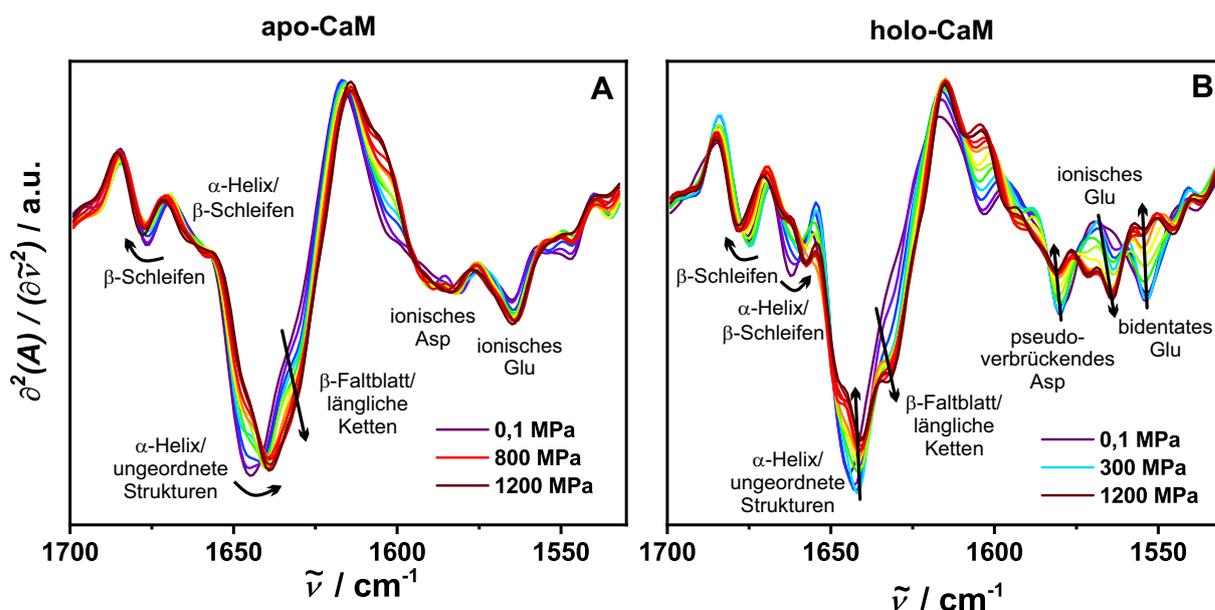


Abb. 5.6: 2. Ableitung der druckabhängigen, puffer- und basislinienkorrigierten sowie flächennormierten FT-IR Absorptionsspektren von apo-CaM (A) und holo-CaM (B). Adapted from: N. Erwin, S. Patra and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 30020 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

Eine quantitative Analyse der Sekundärstrukturanteile erfolgte durch die Anpassung der gemessenen Amid-I'-Banden mit den vier zugrunde liegenden Subbanden unter Verwendung von GAUSS-Funktionen (exemplarisch für holo-CaM in Abbildung A.5 dargestellt). Dadurch konnten zum einen die druckinduzierten Änderungen in der Sekundärstruktur verfolgt und zum anderen Konformationsgleichgewichte zwischen den CS aufgedeckt werden. Wie aus Abbildung 5.7 hervorgeht, existieren bei Atmosphärendruck nur geringe Unterschiede in der Sekundärstruktur von apo- und holo-CaM, was mit den früheren NMR-spektroskopischen und röntgenkristallographischen Daten übereinstimmt.^[166,169] Obwohl beide Proteinformen ihre gefaltete Struktur über den gesamten Druckbereich beibehalten, unterscheiden sich die druckinduzierten Konformationsumwandlungen deutlich voneinander. Für apo-CaM nehmen die Subbanden bei 1662 cm^{-1} und 1644 cm^{-1} kontinuierlich um insgesamt 4 % bzw. 6 % ab, wohingegen der Anteil der Subbande bei 1631 cm^{-1} bis 800 MPa stetig um 8 % ansteigt (siehe Abb. 5.7A). Demzufolge liegt der Konformationsumwandlungsdruck bei 400 MPa. Diese Ergebnisse deuten auf die Bildung von stärker lösungsmittlexponierten helikalen Strukturen hin. Darüber hinaus kann auch eine partielle Entfaltung stattfinden, da sich bei höheren Drücken mehr längliche Ketten auf Kosten der helikalen Strukturen im Ca^{2+} -freien CaM ausbilden. Im Allgemeinen ist die *N*-terminale Domäne von Proteinen mit EF-Hand-Motiven im Ca^{2+} -freien Zustand stabiler gegenüber hohen Temperaturen und Drücken als die *C*-terminale Domäne.^[211,213] Dies führt zu der Annahme, dass die detektierten strukturellen Änderungen von apo-CaM ebenfalls in der *C*-terminalen Domäne oder der Linkerregion ablaufen.

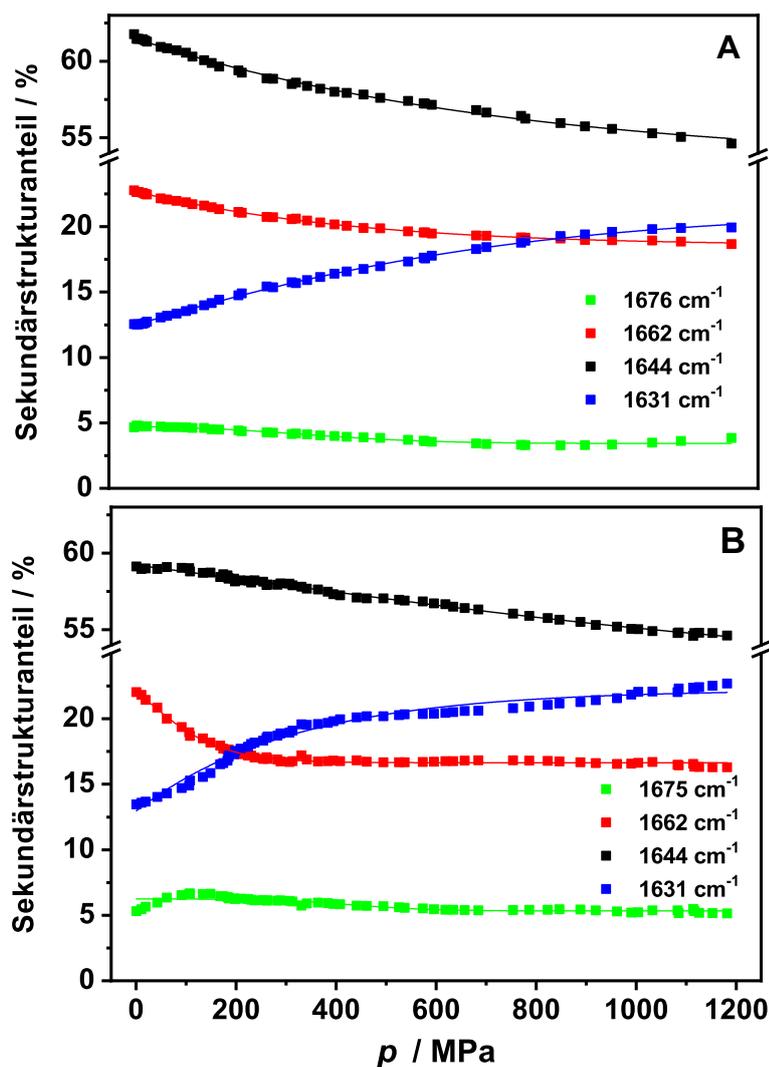


Abb. 5.7: Aus der Bandenanpassung ermittelte Änderungen der Sekundärstrukturelemente von apo-CaM (A) und holo-CaM (B) in Abhängigkeit des Druckes. An die Datenpunkte ist die BOLTZMANN-Funktion (siehe Gl. 5.3) angepasst (durchgehende Linie). Adapted from: N. Erwin, S. Patra and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 30020 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

Im Gegensatz dazu treten die größten Strukturänderungen in holo-CaM bis 400 MPa auf, weshalb der Übergangsdruck bei etwa 200 MPa liegt. Dies weist auf eine geringere strukturelle Stabilität von CaM in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen hin. Bis 400 MPa verringert sich das Flächenintegral unter der Subbande bei 1662 cm⁻¹ um etwa 6 %, während jenes bei 1631 cm⁻¹ um den gleichen Beitrag zunimmt. Oberhalb von 400 MPa weist holo-CaM nur geringe Änderungen in der Sekundärstruktur auf. Bis 1200 MPa erhöht sich die Fläche der Subbande bei 1631 cm⁻¹ um weitere 3 %, wohingegen die Subbandenfläche bei 1644 cm⁻¹ im gesamten Druckbereich um 4 % sinkt. In Bezug auf die Anteile der Sekundärstrukturelemente ähnelt der Subzustand von holo-CaM bei etwa 300 MPa dem von apo-CaM bei 1200 MPa. Unter der Annahme eines thermodynamischen Gleichgewichts zwischen diesen beiden CS von apo- und holo-CaM konnten die Volumenänderungen ΔV^\ominus , die mit diesen Konformationsänderungen einhergehen, direkt aus der Anpassung des druckabhängigen Kurvenverlaufs der Sekundärstrukturanteile unter Verwendung der

BOLTZMANN-Gleichung (siehe Gl. 5.3) ermittelt werden. Für apo- und holo-CaM ergab sich eine Volumenänderung von -10 mL mol^{-1} bzw. -24 mL mol^{-1} . Diese ΔV^\ominus -Werte liegen in einer ähnlichen Größenordnung wie die von GIBRAT *et al.* publizierten Werte, die mittels intrinsischer Fluoreszenzmessungen für apo- und holo-CaM bis 700 MPa ermittelt wurden.^[214] Für gewöhnlich sind die Volumenänderungen, die bei der druckinduzierten Entfaltung von Proteinen gefunden werden, um den Faktor 2-6 größer.^[215]

Ca^{2+} -bindende Proteine mit EF-Hand-Motiven wie CaM, Troponin C und Parvalbumin, weisen im IR-Spektrum zwischen 1590 cm^{-1} und 1550 cm^{-1} charakteristische antisymmetrische COO^- -Streckschwingungen auf. Diese Banden sind auf die Carboxylatgruppen der an der Ca^{2+} -Koordinierung beteiligten Asparaginsäure (Asp)- und Glutaminsäure (Glu)-Seitenketten zurückzuführen.^[216] Beim Vergleich der FT-IR-Absorptionsspektren von apo- und holo-CaM sind signifikante Unterschiede in diesem Bereich erkennbar (siehe Abb. 5.4A (i) und (ii)). Im IR-Absorptionsspektrum von holo-CaM können die beiden charakteristischen Banden der Ca^{2+} -koordinierenden Carboxylatgruppen von Asp und Glu bei 1578 cm^{-1} bzw. 1554 cm^{-1} beobachtet werden, wohingegen im Spektrum von apo-CaM nur eine breite Bande bei 1576 cm^{-1} zu sehen ist. Diese Bande konnte durch die Bildung der 2. Ableitung besser aufgelöst werden, sodass zwei Minima bei 1581 cm^{-1} und 1565 cm^{-1} erscheinen (siehe Abb. 5.4B (i)), denen die antisymmetrische Schwingung der ionischen Carboxylatgruppen zugrunde liegt.

Für holo-CaM nimmt mit zunehmendem Druck die Intensität der Banden bei 1579 cm^{-1} und 1554 cm^{-1} ab, während gleichzeitig die Bandenintensität bei 1563 cm^{-1} steigt, wie in Abbildung 5.6B zu erkennen ist. Dies weist auf eine Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen aus dem Protein hin, was zur Bildung eines anderen Zustandes führt. Anhand der Auftragung der aus der 2. Ableitung erhaltenen Bandenintensitäten bei 1579 cm^{-1} und 1554 cm^{-1} als Funktion des Drucks (siehe Abb. 5.8) wird deutlich, dass bei holo-CaM die Dissoziation von Ca^{2+} zwischen 300 und 800 MPa abläuft. Solch eine druckinduzierte Ca^{2+} -Freisetzung wurde auch für andere Ca^{2+} -bindende Proteine wie Parvalbumin und α -Lactalbumin beobachtet.^[217,218] Die Ca^{2+} -Freisetzung steht hier jedoch nicht im Zusammenhang mit Änderungen in der Sekundärstruktur, da die Ca^{2+} -Ionen in einem Druckbereich dissoziieren, in dem keine markanten Sekundärstrukturänderungen festgestellt werden konnten.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Ca^{2+} einen beträchtlichen Einfluss auf die druckinduzierten Konformationsänderungen von CaM hat, obwohl die Sekundärstrukturen von apo- und holo-CaM bei Atmosphärendruck kaum Unterschiede aufweisen. In beiden CaM-Zuständen bewirken hohe hydrostatische Drücke eine Verschiebung des Konformationsgleichgewichtes zu einem stärker solvatisierten Subzustand mit einem geringeren helikalen Anteil bei 400 MPa für apo-CaM und bei 200 MPa für holo-CaM. Der zugrunde liegende Mechanismus hängt wahrscheinlich mit den bekannten Druckeffekten zusammen, wie z.B. dem Brechen von im Proteininneren verborgenen Ionenbindungen und dem Schwächen hydrophober Wechselwirkungen.^[190,191] Dies führt vermutlich zur

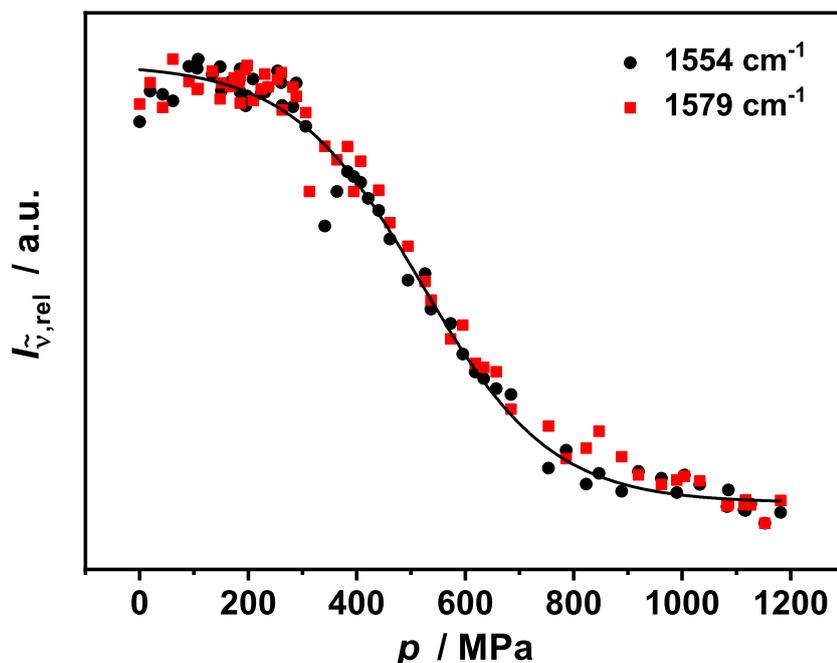


Abb. 5.8: Druckinduzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus holo-CaM. Normierte Intensität aus dem Spektrum der 2. Ableitung von holo-CaM bei 1554 cm^{-1} und 1579 cm^{-1} . An die experimentellen Daten ist eine sigmoidale Kurve (durchgehende Linie) angepasst. Adapted from: N. Erwin, S. Patra and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 30020 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

Umorientierung und partiellen Entfaltung der Helices in den EF-Hand-Motiven beider Domänen, wobei die stärkere Solvatisierung wahrscheinlich aus dem druckinduzierten Eindringen der Wassermoleküle ins Proteininnere resultiert.

Wie bereits beschrieben, wird im Allgemeinen angenommen, dass apo-CaM in Lösung eine „geschlossene“ Konformation mit einer bündelartigen Struktur, die aus den vier α -Helices der EF-Hand-Motive gebildet wird, annimmt. Dadurch werden die für die Bindung von Zielproteinen essentiellen hydrophoben Regionen im Inneren des Proteins verborgen. Nach der Ca^{2+} -Bindung geht CaM in einen „offenen“ Zustand über, in dem die hydrophoben Bindungsflächen durch die Umlagerung der Helices in den EF-Hand-Motiven zugänglicher gemacht werden, ohne dass die Sekundärstruktur des Proteins erheblich beeinflusst wird.^[166]

Kürzlich veröffentlichte NMR- und MD-Simulationsstudien haben gezeigt, dass diese „geschlossene“ Struktur der C-terminalen Domäne von apo-CaM in Lösung zwar dominiert, aber im Gleichgewicht mit einem „offenen“ holo-ähnlichen Zustand liegt, der die Bindung von Ca^{2+} -Ionen und Zielproteinen erleichtert.^[177,219] Interessanterweise wurde in Neutronen-Kleinwinkelstreuung (*small angle neutron scattering*, SANS)- und Fluoreszenzspektroskopie-Experimenten eine stärkere Solvatisierung der hydrophoben Bereiche sowie eine Ausdehnung der apo-CaM-Domänen unter Hochdruck beobachtet, was auf eine druckinduzierte „Öffnung“ von apo-CaM hinweist.^[214] Diese Ergebnisse stimmen mit den hier erhaltenen FT-IR-Daten überein, die bei höheren Drücken eine vermehrte Bildung lösungsmittel-exponierter α -Helices in apo-CaM zeigen. Tatsächlich wurde in einer ähnlichen Studie mit der

N-terminalen Domäne von Troponin C festgestellt, dass Druckanwendungen in Kombination mit niedrigen Temperaturen in der Freilegung unpolarer Oberflächen resultieren, was an den „offenen“, Ca^{2+} -gebundenen Zustand dieser Domäne erinnert.^[220]

Darüber hinaus haben MD-Simulationen gezeigt, dass eine Entfaltung für den Übergang vom apo- zum holo-ähnlichen Zustand weitestgehend irrelevant ist, jedoch wurde ein Intermediat bei dieser Konformationsumwandlung entdeckt, das eine partiell entfaltete Helix im EF-Hand-Motiv und folglich eine deformierte Ca^{2+} -Bindungsstelle aufweist.^[177] Solche strukturellen Änderungen stimmen mit unseren experimentellen Ergebnissen (siehe Abb. 5.7A) überein, die eine Zunahme von länglichen Ketten (8 %) auf Kosten von β -turns und helikalen Strukturelementen (10 %) in dem CS von apo-CaM bei höheren Drücken zeigen. Komplementäre druckabhängige multidimensionale NMR-Spektroskopiedaten könnten helfen, ortsspezifische Fluktuationen und Konformationsänderungen im Protein genauer zu lokalisieren.

Für holo-CaM konnte durch Druckanwendung eindeutig ein bei 200 MPa auftretender Subzustand mit vollständig gesättigten Ca^{2+} -Bindungsstellen und einer partiell entfalteten Helix nachgewiesen werden. Da die Entfaltung einer Helix im EF-Hand-Motiv sofort eine Ca^{2+} -Freisetzung verursachen würde, erfolgt die hier detektierte partielle Entfaltung der Helix wahrscheinlich im Linkerbereich, wodurch das zuvor hantelförmige CaM-Protein eine eher kompakte Form annehmen würde. Diese Vermutung wird durch eine frühere Hochdruck-SANS-Studie mit holo-CaM unterstützt, die von einer Verdichtung des Proteins in einem Druckbereich von 0,1-250 MPa berichtet.^[214] Der hier bei 200 MPa entdeckte kompakte CS weist dennoch eine höhere Solvatisierung als der Grundzustand auf, da zusätzlich helikale Strukturen bei höheren Drücken exponiert wurden. Solch ein kompakter Zustand von holo-CaM würde sicherlich die Bildung eines globulären CaM/Zielprotein-Komplexes erleichtern. Dieser Zustand muss jedoch offen genug sein, um den Zugang der Liganden weiterhin zu ermöglichen. Diese Anforderungen werden durch den für holo-CaM detektierten CS bei 200 MPa erfüllt, weshalb dieser Subzustand von großer Bedeutung für die Zielproteinerkennung und -bindung sein könnte. Darüber hinaus zeigen die in dieser Studie erhaltenen Ergebnisse deutlich, dass hohe hydrostatische Drücke zu strukturellen Umlagerungen führen, die eine Ca^{2+} -Dissoziation oberhalb von 300 MPa ohne weitere Änderungen der Sekundärstruktur verursachen. Obwohl die Kurve in Abbildung 5.8 ein Plateau bei 800 MPa erreicht, könnte es möglich sein, dass nur eine der Domänen ihre Ca^{2+} -Ionen freigesetzt hat. Diese Annahme wird durch die unterschiedlichen Ca^{2+} -Bindungsaffinitäten der beiden Domänen unterstützt.^[164] Es wird vermutet, dass solch ein partiell Ca^{2+} -beladenes CaM-Protein ein stabiles Intermediat im Ca^{2+} -Bindungsprozess ist und eine wichtige Rolle bei der Zielproteinbindung spielt.^[221] Beispielsweise zeigte eine Röntgenkristallstruktur ein an Adenylylcyclase gebundenes CaM mit einer Ca^{2+} -gesättigten *C*-terminalen Domäne und einer Ca^{2+} -freien *N*-terminalen Domäne.^[222]

5.3.2 Einfluss der K-Ras4B-HVR auf die druckabhängigen CS von CaM

CaM durchläuft nicht nur Konformationsänderungen in Abhängigkeit von Ca^{2+} , sondern auch bei der Bindung von Zielproteinen. Das hantelförmige holo-CaM-Protein wickelt sich dabei normalerweise um die CaM-Bindungssequenz des Zielproteins, sodass sich ein kugelförmiger und kompakter Komplex bildet. Druckabhängige FT-IR-Spektroskopie-Experimente wurden in Gegenwart der K-Ras4B-HVR durchgeführt, die neben dem Farnesylanker eine polybasische Sequenz enthält, die beide für die Assoziation mit CaM erforderlich sind. Mittels FCS wurde überprüft, ob die aus 12 AS bestehende K-Ras4B-Peptidsequenz tatsächlich an CaM bindet.

Zu diesem Zweck wurde die freie Thiolgruppe des *N*-terminalen Cys im Peptid mit einem Maleimid-funktionalisiertem Fluorescein markiert (siehe Abschnitt 5.2.2). Daraufhin wurden die Autokorrelationskurven der fluoreszierenden K-Ras4B-HVR in Gegenwart unterschiedlicher CaM-Mengen aufgezeichnet (siehe Abschnitt 5.2.5). Die experimentelle Durchführung der FCS-Messungen erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Satyajit Patra (Postdoktorand am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I, TU Dortmund). Die Diffusionskoeffizienten D und mittleren Diffusionszeiten τ_i des Peptids, die aus der Auswertung der gemessenen Autokorrelationskurven abgeleitet wurden, sind in Abbildung 5.9 als Funktion der CaM-Konzentration dargestellt. Daraus konnte eine Dissoziationskonstante von $12,9 \mu\text{M}$ gemäß Gleichung 5.8 ermittelt werden. Ein vergleichbarer K_d -Wert wurde in einer anderen Studie mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry*, ITC) bestimmt.^[106]

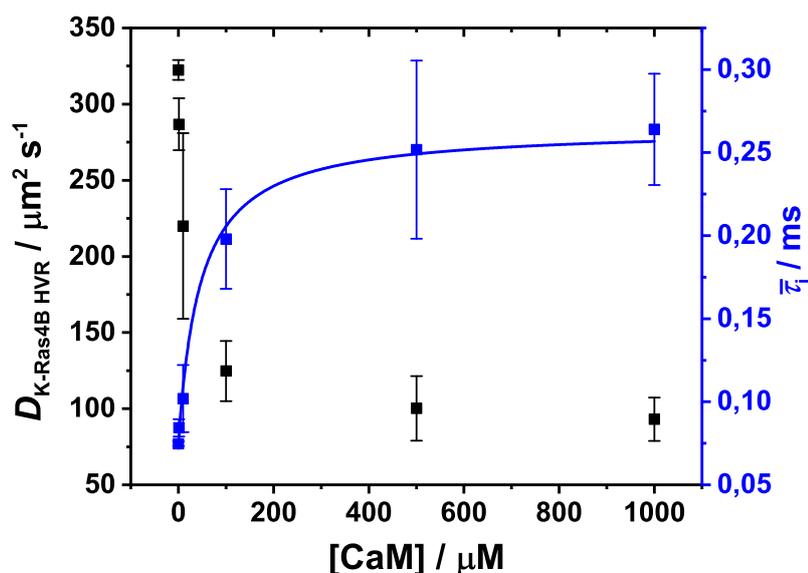


Abb. 5.9: Diffusionskoeffizient (schwarz) und mittlere Diffusionszeit (blau) des Fluorescein-markierten K-Ras4B-Peptids als Funktion der CaM-Konzentration. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus 5-10 Messungen. Die Linie stellt die Anpassung an die experimentell erhaltenen Daten unter Verwendung von Gleichung 5.8 dar. Adapted from: N. Erwin, S. Patra and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 30020 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

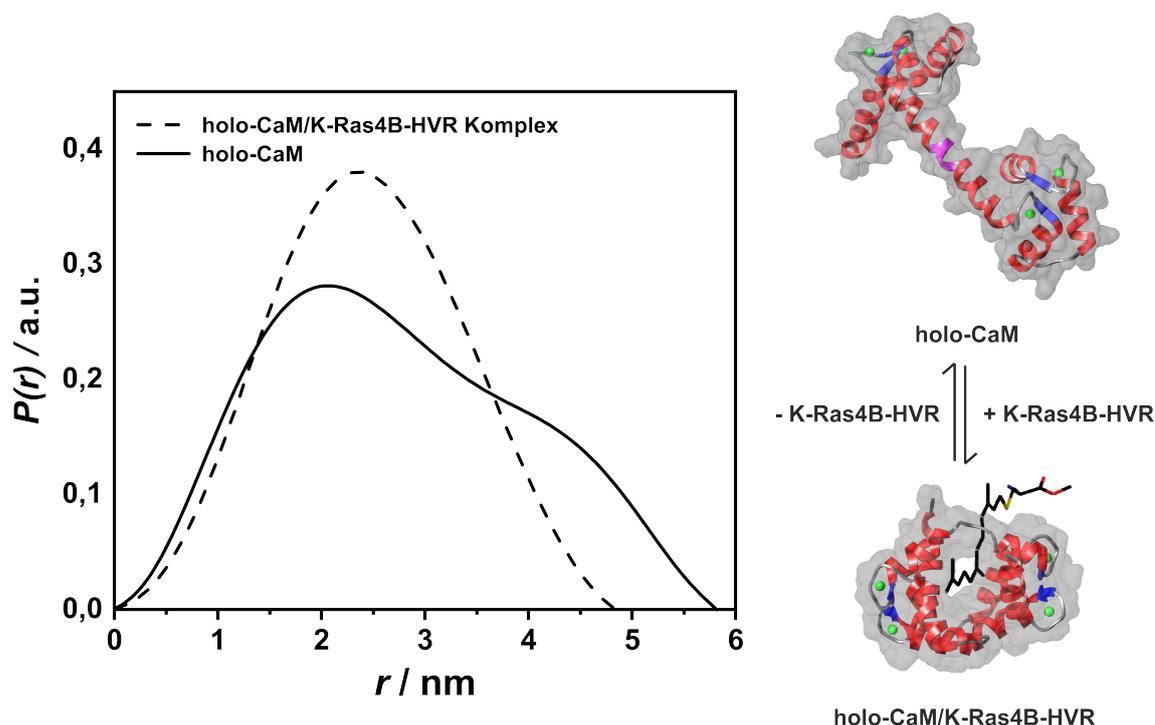


Abb. 5.10: Aus SAXS-Experimenten ermittelte Abstandsverteilungsfunktion für holo-CaM in Abwesenheit (durchgezogene Linie) und in Gegenwart der K-Ras4B-HVR (gestrichelte Linie) in Ca^{2+} -haltigen Puffer bei 25 °C. Die hantelförmige Struktur von holo-CaM geht bei der Bindung der K-Ras4B-HVR in eine kompakte, globuläre Form über. Das molare Verhältnis von Protein zu Peptid beträgt 1:10. Adapted from: N. Erwin, S. Patra and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 30020 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

Um die strukturellen Eigenschaften des holo-CaM/K-Ras4B-HVR-Komplexes zu erforschen, wurden komplementäre SAXS-Experimente für holo-CaM in An- und Abwesenheit des K-Ras4B-Peptids durchgeführt (siehe Abschnitt 5.2.4). Die aus den SAXS-Daten bestimmte Abstandsverteilungsfunktion $P(r)$ (siehe Abb. 5.10) zeigt, dass das Ca^{2+} -gebundene CaM-Protein eine hantelförmige Struktur in Lösung aufweist, aber im Komplex mit dem K-Ras4B-Peptid eine globuläre Form annimmt. Dies wird auch durch den bestimmten Gyrationradius R_g , der für holo-CaM 2,17 nm und für den Protein/Peptid-Komplex 1,96 nm beträgt, unterstützt. Ähnliche Abstandsverteilungsfunktionen und R_g -Werte wurden für holo-CaM-Komplexe mit verschiedenen myristoylierten Peptiden gefunden.^[184,223] Die Bindung dieser lipidierten Peptide unterscheidet sich von der der anderen CaM-bindenden, nicht-lipidierten Peptide, die im Komplex mit CaM eine helikale Struktur annehmen (siehe Abb. 5.2). Obwohl bei der Bindung von holo-CaM und den myristoylierten Peptiden ebenfalls ein globulärer Komplex entsteht, bilden diese Peptide keine α -Helix, sondern verbergen ihren Lipidanker in den hydrophoben Kavitäten von CaM.^[107] Dies führt zu der Annahme, dass die farnesylierte K-Ras4B-Sequenz bei der Bindung an holo-CaM ebenfalls ihre überwiegend unstrukturierte Form beibehält und den Lipidanker in die hydrophoben Taschen von CaM einlagert. Tatsächlich wurde diese Vermutung kürzlich durch eine MD-Simulationsstudie bestätigt.^[224]

Das K-Ras4B-Peptid selbst unterliegt bei Druckerhöhung keinen sichtbaren strukturellen Änderungen, wie in den FT-IR-Spektren der Amid-I'-Bande zu sehen ist (siehe Abb. A.6). Das Intensitätsmaximum der Amid-I'-Bande liegt bei 1647 cm^{-1} , was auf einen großen Anteil ungeordneter Strukturen hindeutet. In den nachfolgenden Studien des holo-CaM/K-Ras4B-HVR-Komplexes wurde der geringe Beitrag des Peptids zu der Amid-I'-Bande von CaM vernachlässigt.

Beim Vergleich der FT-IR-Spektren von holo-CaM in Ab- und Anwesenheit des K-Ras4B-Peptids (siehe Abb. 5.4 (ii) und (iii)) fallen deutliche Unterschiede auf, wie z.B. die Verschiebung der Minima bei 1675 cm^{-1} und 1662 cm^{-1} zu niedrigeren Wellenzahlen. Dies wird höchstwahrscheinlich durch die Umorientierung der β -Schleifen verursacht, damit die hydrophoben Bindungsregionen der beiden Domänen die Farnesylgruppe des Peptids besser aufnehmen können (siehe Abb. 5.10). Des Weiteren ist die Schulter bei 1631 cm^{-1} für den Protein/Peptid-Komplex stärker ausgeprägt als für holo-CaM allein, was auf eine partielle Entfaltung der zentralen Helix zurückgeführt werden kann, wodurch die Bindung des Peptids durch Bildung eines globulären Komplexes ermöglicht wird. Diese Vermutung wird zusätzlich durch den Vergleich der Sekundärstrukturen von holo-CaM allein und im Komplex mit der K-Ras4B-HVR bei Atmosphärendruck unterstützt (siehe Abb. 5.7B und 5.11C). Im Vergleich zu holo-CaM ist die Fläche der Subbanden bei 1661 cm^{-1} und 1644 cm^{-1} , die u.a. den α -helikalen Strukturen zugeordnet werden, um 4 % bzw. 6 % für den Protein/Peptid-Komplex reduziert, während die Anteile der länglichen Ketten (1631 cm^{-1}) und β -Schleifen (1672 cm^{-1}) jeweils um 5 % erhöht sind. Diese Strukturänderungen stimmen sehr gut mit den Röntgenkristallstrukturdaten für CaM im Komplex mit dem myristoylierten Peptid CAP-23/NAP-22 überein.^[107]

Aus den Differenzspektren und den Spektren der 2. Ableitung des holo-CaM/K-Ras4B-HVR-Komplexes (siehe Abb. 5.11A und B) ist ersichtlich, dass sich die Intensitäten bei 1661 cm^{-1} und 1644 cm^{-1} mit zunehmendem Druck verringern, wohingegen die Intensität bei 1631 cm^{-1} gleichzeitig steigt. Diese druckinduzierten Änderungen ähneln denen von apo- und holo-CaM. Anders als bei holo-CaM nimmt die Bande bei 1661 cm^{-1} für den Protein/Peptid-Komplex ohne Bandenaufspaltung bei höheren Drücken ab. Dies weist darauf hin, dass in holo-CaM im Gegensatz zum Protein/Peptid-Komplex die zuvor im Proteininneren verborgen Helices unter Druck exponiert werden.

Im Vergleich zu holo-CaM sind die druckabhängigen Sekundärstrukturänderungen, insbesondere die Strukturelemente, die mit den Subbanden bei 1644 cm^{-1} und 1631 cm^{-1} im Zusammenhang stehen, im Protein/Peptid-Komplex ausgeprägter (siehe Abb. 5.11C) und erreichen Plateauwerte bei höheren Drücken ($\sim 600\text{ MPa}$). Die helikalen Strukturen, die zu den Subbanden bei 1644 cm^{-1} und 1661 cm^{-1} beitragen, werden um 6 % bzw. 4 % bis zu einem Druck von 600 MPa reduziert. In diesem Druckbereich nimmt die Fläche der Subbande bei 1631 cm^{-1} , welche die länglichen Ketten repräsentiert, um 10 % zu. Oberhalb von 600 MPa werden keine weiteren Änderungen in der Sekundärstruktur des

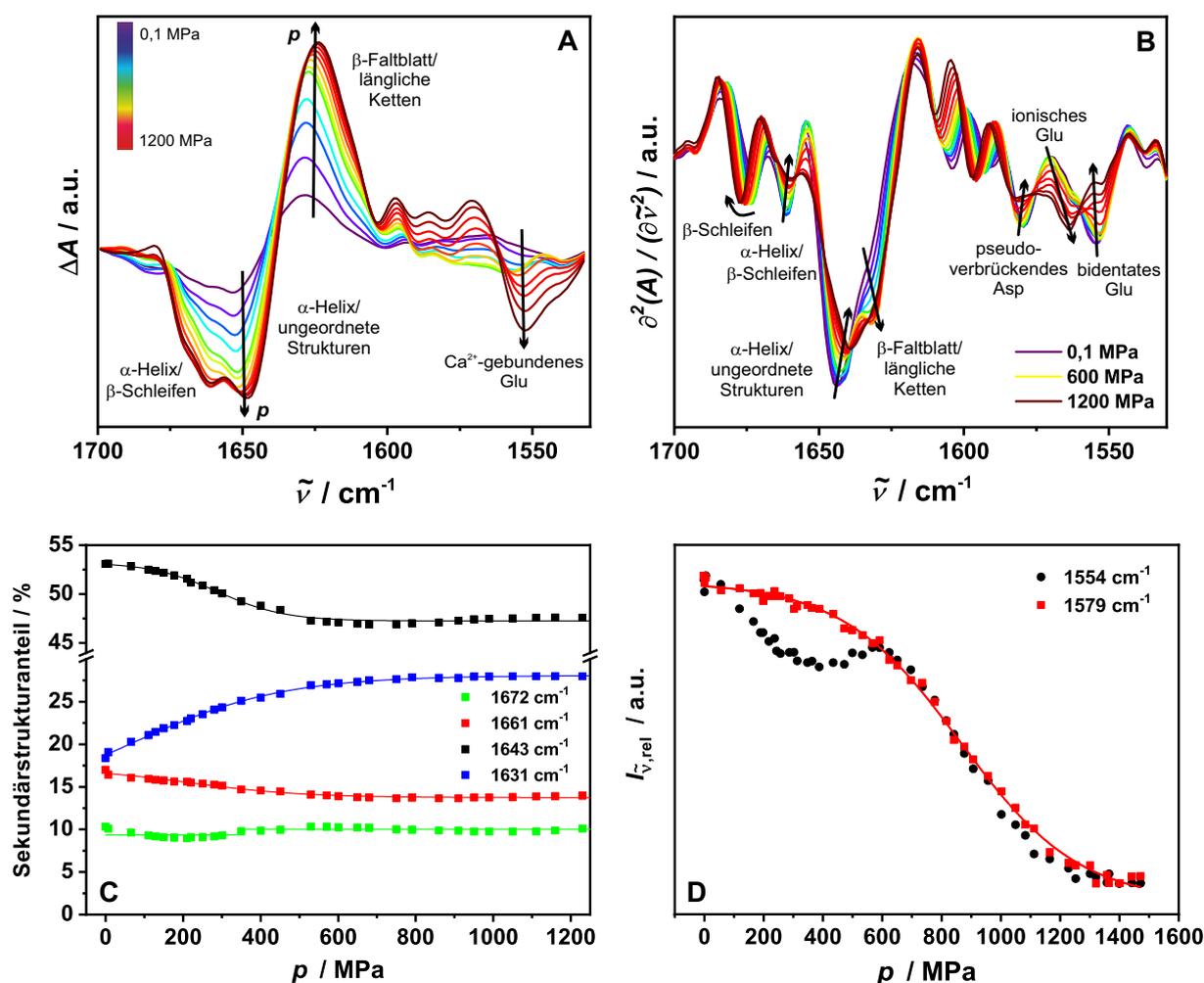


Abb. 5.11: Druckabhängige FT-IR-spektroskopische Analyse von holo-CaM/K-Ras4B-Peptid in D_2O -Puffer (20 mM TRIS (pD = 7,4), 150 mM NaCl, 10 mM CaCl_2) bei 25 °C zwischen 0,1 und 1200 MPa. Differenzspektrum (A) und 2. Ableitung (B) der puffer- und basislinienkorrigierten sowie flächennormierten Spektren. Aus der Bandenanpassung ermittelte Änderung der Sekundärstrukturelemente in Abhängigkeit des Drucks. An die Datenpunkte ist die BOLTZMANN-Funktion (siehe Gl. 5.3) angepasst (durchgehende Linie) (C). Normierte Intensität aus dem Spektrum der 2. Ableitung bei 1554 und 1579 cm^{-1} . An die experimentellen Daten ist eine sigmoide Kurve (durchgehende Linie) angepasst (D). Adapted from: N. Erwin, S. Patra and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 30020 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

holo-CaM/K-Ras4B-Peptid-Komplexes detektiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CaM im Komplex mit dem K-Ras4B-Peptid einen Konformationszustand annimmt, in dem aufgrund der druckinduzierten Reorganisation des Protein/Peptid-Komplexes weitere α -helikale Strukturen entfalten. WAND *et al.* haben gezeigt, dass solche Reorganisationen in CaM/Zielpeptid-Komplexen unter Anwendung von Druck stattfinden, da intermolekulare Ionenpaare in der Bindungsstelle gespalten werden können, ohne dass das Zielpeptid dissoziiert.^[225,226] Dass elektrostatische Wechselwirkungen essentiell für die spezifische Bindung von K-Ras4B an CaM sind, wurde bereits mehrmals erwähnt, denn die anderen Ras-Isoformen, die keine polybasische Domäne besitzen, interagieren nicht mit CaM.^[103,105] Aus den druckinduzierten Sekundärstrukturänderungen wurde eine Volumenänderung von -13 mL mol^{-1} für den Konformationszustand bei 300 MPa bestimmt. Solch eine kleine,

negative Volumenänderung könnte eine Folge von Elektrostriktion sein, die sich aus der Hydratation von separierten Ionenpaaren ergibt.

Ähnlich wie bei holo-CaM sind im FT-IR-Absorptionsspektrum des holo-CaM/K-Ras4B-Peptid-Komplexes die Banden bei 1579 cm^{-1} und 1554 cm^{-1} zu sehen, die charakteristisch für die Ca^{2+} -koordinierenden Asp- und Glu-COO⁻-Gruppen sind (siehe Abb. 5.4A und B (iii)). Mit zunehmendem Druck verringern sich die Intensitäten dieser Banden, während die Bande bei 1665 cm^{-1} zunimmt. Anders als bei holo-CaM verläuft die Bandenintensität bei 1554 cm^{-1} als Funktion des Drucks (siehe Abb. 5.11D) für den Protein/Peptid-Komplex nicht sigmoidal. Unmittelbar nach der Druckerhöhung nimmt die Kurve ab, erreicht zwischen 300-600 MPa ein Plateau und sinkt dann weiter bis 1200 MPa. Dies weist auf einen zweistufigen Mechanismus der Ca^{2+} -Freisetzung mit einem dazwischen liegenden Zustand hin. Da das K-Ras4B-Peptid alleine keine Banden in dieser Region aufweist (siehe Abb. A.6), stammen diese Banden ausschließlich von dem Peptid-gebundenen CaM-Protein. Die initiale Ca^{2+} -Freisetzung bis 300 MPa könnte durch eine Reorganisation im Protein/Peptid-Komplex verursacht werden, da in diesem Druckbereich typischerweise ionische Wechselwirkungen durch Druck gestört und Hohlräume im Protein/Peptid-Komplex mit Wassermolekülen gefüllt werden.^[191] Interessanterweise korreliert diese initiale Ca^{2+} -Dissoziation mit Änderungen in der Sekundärstruktur. In der Druckregion von 600-1200 MPa wird die Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen ohne deutliche Sekundärstrukturänderungen fortgesetzt und resultiert in einem Zustand, der weitestgehend frei von Ca^{2+} -Ionen ist.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass das K-Ras4B-Peptid als Bindungspartner sowohl die Konformationsdynamik von CaM bei Atmosphärendruck als auch die druckinduzierten Strukturänderungen dieses Proteins deutlich beeinflusst. Geringere Drücke führen zu einer Reorganisation des holo-CaM/K-Ras4B-Peptid-Komplexes durch die Störung und Brechung intermolekularer Bindungen, die nicht nur mit einer partiellen Entfaltung α -helikaler Strukturen, sondern auch mit der Freisetzung von Ca^{2+} einhergehen. Dies deutet daraufhin, dass es sich bei den partiell entfalteten Strukturen um die Helices in den EF-Hand-Motiven handelt. Aufgrund der geringeren Ca^{2+} -Bindungsaffinität und thermischen Stabilität^[164,213] finden die beobachteten Änderungen im unteren Druckbereich (0,1-600 MPa) vermutlich in der *N*-terminalen Domäne statt. Folglich kann die anschließende Ca^{2+} -Freisetzung bei höheren Drücken (600-1200 MPa) der *C*-terminalen Domäne zugeschrieben werden. In vorherigen NMR-Untersuchungen von CaM in Gegenwart unterschiedlicher Peptide wurde ein durch den Druck begünstigter Wasserstoffaustausch in den Peptiden als Folge einer „offenen“ CaM-Struktur beobachtet.^[225,226] Unter dieser Annahme könnte CaM in Gegenwart des hier verwendeten Zielpeptids in einen stärker solvatisierten und „offenen“ Zustand unter Druck übergehen. Der bei 600 MPa stabilisierte Zustand könnte daher eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Bindung eines Zielproteins spielen, da er im Vergleich zur hantelförmigen Struktur eine bereits teilweise geschlossene Konformation aufweist, die für einen Liganden jedoch noch zugänglich ist.

Darüber hinaus ist in diesem Zustand die erforderliche Bindungsfläche exponiert und steht den initialen Interaktionen mit der Zielsequenz zur Verfügung, dennoch durchläuft dieser CS nach der Bindung der Zielsequenz einen weiteren Übergang zu einem kompakten globulären Komplex.

5.4 Zusammenfassung

Um das einzigartig promiskuitive Bindungsverhalten von CaM und die damit einhergehende funktionelle und strukturelle Diversität des Proteins besser zu verstehen, wurde die Energielandschaft von CaM in Lösung erforscht. Es wird angenommen, dass energetisch tiefliegende, angeregte Proteinzustände nahe dem nativen Zustand, die aufgrund von intrinsischer Dynamik und Fluktuationen kleine Konformationsänderungen aufweisen, eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Bindung von Zielmolekülen spielen.^[178,187] Der Populationsanteil dieser funktionell relevanten CS kann unter ungestörten Bedingungen so niedrig sein, dass diese nur schwer mit spektroskopischen Methoden detektiert werden können und daher unentdeckt bleiben. In dieser Studie wurde Druck in Kombination mit FT-IR-Spektroskopie verwendet, um die volumensensitiven Konformationsgleichgewichte von CaM in Richtung dieser energetisch tiefliegenden angeregten Zustände zu verschieben und die strukturellen Änderungen zu analysieren, die beim Übergang von einem CS zu einem anderen auftreten. Diese Studie zeigt, dass die Verwendung von hohen hydrostatischen Drücken eine gute Möglichkeit bietet, den von CaM aufgespannten Konformationsraum näher zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Konformationsdynamik und die Auswahl der CS von CaM stark von der Ca^{2+} -Bindung und weiteren Bindungspartnern, wie der K-Ras4B-HVR, beeinflusst werden. Die unterschiedlichen CS von CaM sind in Abbildung 5.12 dargestellt. Durch Druck verschiebt sich das Konformationsgleichgewicht im Allgemeinen in Richtung der stärker solvatisierten Subzustände, in denen die helikalen Strukturen partiell entfaltet sind.

In Lösung liegt apo-CaM vorwiegend in einer „geschlossenen“ Konformation vor, in der die hydrophoben Regionen, die wichtige Interaktionsoberflächen für die Zielproteine darstellen, im Proteininnern verborgen sind. Unter Druck bilden sich mehr lösungsmittel-exponierte helikale Strukturen, was mit einer Ausdehnung der globulären apo-CaM-Domänen einhergehen kann, wie in früheren Hochdruck-SANS-Experimenten gezeigt wurde.^[214] Durch diese druckinduzierte „Öffnung“ nimmt apo-CaM möglicherweise einen holo-ähnlichen Zustand an,^[177,219] der die Bindung von Ca^{2+} -Ionen und Zielproteinen erleichtert.

Für holo-CaM wurden mehrere CS in Abhängigkeit des Drucks beobachtet. Bei 200 MPa entsteht ein Subzustand mit vollständig gesättigten Ca^{2+} -Bindungsstellen und einer partiell entfalteten Helix, bei der es sich vermutlich um die zentrale α -Helix handelt. Dadurch geht holo-CaM von der länglichen Hantelform in eine eher kompakte globuläre Struktur über, die darüber hinaus einen höheren Anteil an solvatisierten Helices aufweist. Dieser

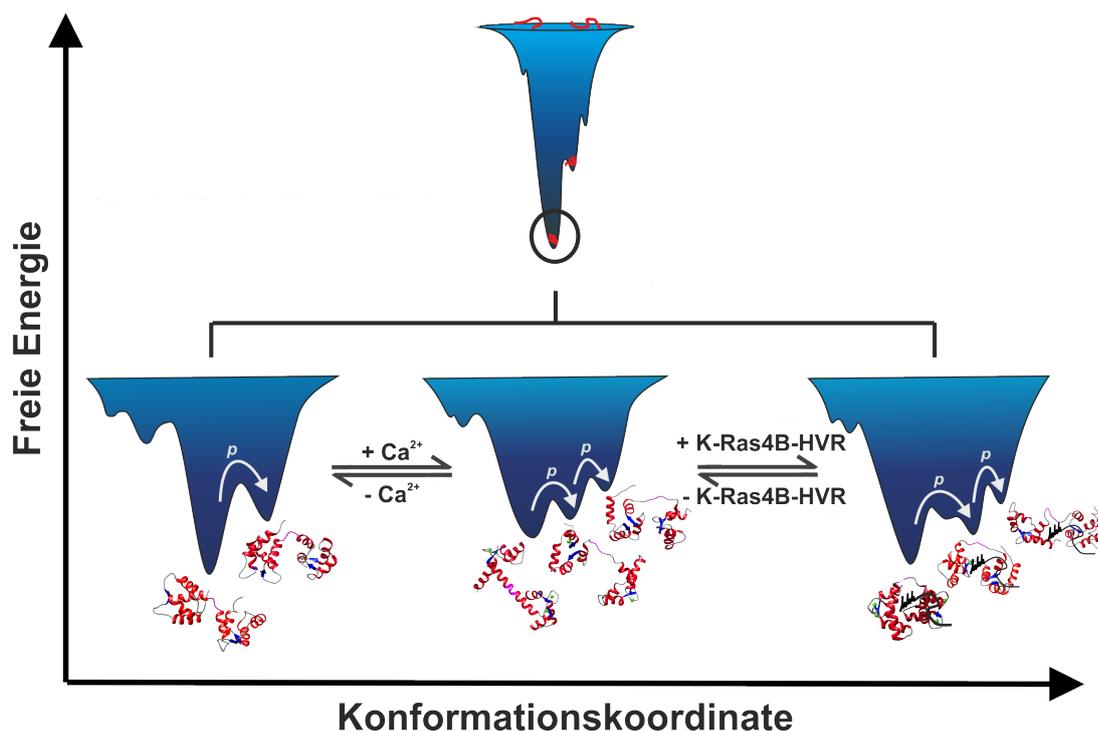


Abb. 5.12: Schematische Darstellung der CS von CaM in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} und dem K-Ras4B-Peptid als Bindungspartner unter dem Einfluss von Druck. Während für apo-CaM nur ein CS anhand der druckabhängigen IR-Daten identifiziert wurde, führt die Bindung von Ca^{2+} zu zwei energetisch tief liegenden angeregten CS, wobei der bei höheren Drücken beobachtete Zustand teilweise frei von Ca^{2+} ist. Nach der Bindung des lipidierten K-Ras4B-Peptids werden drei verschiedene globuläre Konformationen mit unterschiedlichen volumetrischen Eigenschaften besetzt. Der bei tiefen Drücken stabilisierte CS weist eine offenere und hydratisierte globuläre Struktur auf, die besonders dazu neigt, das lipidierte Peptid zu binden. Die Proteinstrukturen (PDB-ID-Codes: 1DMO, 1CLL, 1PRW, 1CFF und 1L7Z) wurden mit Chimera^[65] (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) erstellt und modifiziert. Adapted from: N. Erwin, S. Patra and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 30020 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

kompakte und teilweise geschlossene Subzustand könnte von großer Bedeutung für die Zielproteinerkennung und -bindung sein, da der Bildung eines globulären CaM/Zielprotein-Komplexes die partielle Entfaltung des helikalen Linkers zugrunde liegt. Ein weiterer Ca^{2+} -freier Zustand konnte bei höheren Drücken nachgewiesen werden.

Des Weiteren ließ sich aus den Ergebnissen der SAXS-Experimente ableiten, dass holo-CaM mit dem farnesylierten und polybasischen K-Ras-4B-Peptid einen globulären Komplex bildet, sodass sich der Lipidanker in den hydrophoben Taschen von CaM einlagern kann, während die Peptidsequenz weiterhin in einer ungeordneten Struktur vorliegt. Dies wurde kürzlich durch MD-Simulationen bestätigt.^[224] Eine Druckerhöhung bis 600 MPa verursacht vermutlich durch die Brechung intermolekularer Bindungen eine Reorganisation des holo-CaM/K-Ras4B-Peptid-Komplexes. Dies führt nicht nur zur partiellen Entfaltung der Helices in den EF-Hand-Motiven, sondern auch gleichzeitig zur Freisetzung von Ca^{2+} . Die Dissoziation der Ca^{2+} -Ionen läuft dabei in einem zweistufigen Mechanismus ab. Bei höheren Drücken (600-1200 MPa) dissoziieren die Ca^{2+} -Ionen, ohne weitere Änderungen in der Sekundärstruktur zu verursachen. Der bei 600 MPa stabilisierte CS stellt im Vergleich zum

kompakten globulären Protein/Peptid-Komplex eine „offene“ CaM-Struktur dar, die auch in Gegenwart anderer Peptide mithilfe von Hochdruck-NMR-Spektroskopie beobachtet werden konnte.^[225,226] In diesem „offenen“ CaM-CS sind die für ein lipidiertes und polybasisches Peptid erforderlichen Bindungsoberflächen exponiert und stehen für Interaktionen zur Verfügung. Daher spielt dieser CS vermutlich eine große Rolle für die Erkennung und Bindung von K-Ras-4B sowie wie für andere lipidierte und polybasische Signalproteine. Im Allgemeinen kann der hier verwendete Ansatz zur Identifizierung energetisch tiefliegender angeregter CS unter Verwendung von hohen hydrostatischen Drücken auch für die Identifizierung und Charakterisierung von Konformationssubzuständen verwendet werden, die für die Wirkstoffbindung relevant sind und nicht einfach aus Kristallstrukturdaten abgeleitet werden können. Eine atomare Auflösung lässt sich mithilfe der Hochdruck-NMR-Spektroskopie erreichen.

Einfluss von UNC119A auf den Membranbindungsprozess von c-Src*

6.1 Einleitung

Wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben, gehören zu den peripheren Membranproteinen auch die lipidierten SFKs, die die Signaltransduktionen von aktivierten Rezeptorproteinen verstärken und aufrechterhalten, was ihr onkogenes Potential erklärt. Der bekannteste Vertreter dieser Familie ist das ubiquitär exprimierte c-Src-Protein.^[74,75] Eine erhöhte Kinaseaktivität und/oder Expression dieses Proteins wurde in einer Vielzahl menschlicher Krebserkrankungen beobachtet.^[84,228] Die Lokalisation der SFKs an der zytosolischen Seite der Plasmamembran ist entscheidend für die Aktivität der Kinasen in der Signalweiterleitung, da dadurch zum einen die autokatalytische Aktivierung durch die Phosphorylierung von Tyr419 und zum anderen die Wechselwirkungen mit den spezifischen Effektoren begünstigt werden.^[75,229] Die Assoziation von c-Src mit Membranen wird über das *N*-terminale SH4-Segment, das einen permanenten Myristoylanker am *N*-Terminus sowie eine benachbarte Sequenz basischer AS umfasst, vermittelt.^[80,230] Neben der Insertion des Myristoylankers in die Membran wird die Bindung durch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den basischen AS und den negativ geladenen Phospholipiden in der zytosolischen Seite der Plasmamembran verstärkt. Beide Bindungsmotive sind für eine stabile, aber dennoch reversible Insertion von c-Src in der Membran erforderlich.^[52] Die verschiedenen GIBBS-Energiebeiträge zur Membranbindung lipidierter Proteine werden im Allgemeinen durch Gleichung 6.1 beschrieben:^[231]

$$\Delta G_{\text{bind}}^{\ominus} = \Delta G_{\text{hydrophob}}^{\ominus} + \Delta G_{\text{mism}}^{\ominus} + \Delta G_{\text{electr}}^{\ominus} + \Delta G_{\text{dom}}^{\ominus} + \Delta G_{\text{curve}}^{\ominus} + \Delta G_{\text{prot-prot}}^{\ominus} + \dots \quad (6.1)$$

*Die Ergebnisse dieser Studie wurden in der Ref. [227] veröffentlicht und werden in diesem Kapitel teilweise wiedergegeben.

Neben den bereits erwähnten Beiträgen, die aus der Lipidinsertion ($\Delta G_{\text{hydrophob}}^{\ominus}$) und den elektrostatischen Wechselwirkungen ($G_{\text{electr}}^{\ominus}$) resultieren, tragen auch die Kettenlängendifferenz des Protein-Lipidankers und der Acylketten der umgebenden Membranlipide ($\Delta G_{\text{mism}}^{\ominus}$) zur GIBBS-Energie des Membranbindungsprozesses bei. Darüber hinaus haben auch die hohe Grenzflächenenergie an Lipidphasengrenzen heterogener Membranen, die aus den Höhenunterschieden der Domänen ($\Delta G_{\text{dom}}^{\ominus}$) resultiert, und der Krümmungsstress ($\Delta G_{\text{curve}}^{\ominus}$) in Membranen einen Einfluss auf Membranbindungsenergie lipidierter Proteine. Des Weiteren tragen auch Protein-Protein-Interaktionen ($\Delta G_{\text{prot-prot}}^{\ominus}$) sowie spezifische Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und Lipiden zur GIBBS-Energie des Bindungsprozesses bei. Die Größenordnung der einzelnen Beiträge hängt dabei von der molekularen Struktur des lipidierten Proteins und der Membran ab.^[231]

Die subzelluläre Lokalisation der SFKs reguliert nicht nur deren Aktivität, sondern scheint zudem die Funktion der lipidieren Kinasen zu beeinflussen. Ähnlich wie bei den Ras-Proteinen wird vermutet, dass die divergenten Lipidierungsmuster der SFKs die Lokalisation in der Zelle und folglich die Auswahl der nachgeschalteten Effektorproteine modulieren.^[78,81] Darüber hinaus wurde in früheren Studien gezeigt, dass die Assoziation von c-Src mit der Plasmamembran ausschlaggebend für die zelluläre Transformation ist.^[85,86] Dies legt nahe, dass die Lokalisation von c-Src in der Zelle streng reguliert wird, um eine ordnungsgemäße Signalweiterleitung sicherzustellen.

Vor kurzem wurden die beiden Proteine UNC119A und UNC119B identifiziert, die am zytosolischen Transport von *N*-terminal myristoylierten Proteinen wie c-Src beteiligt sind.^[93,94] UNC119A/B sind strukturell mit dem farnesylbindenden Protein PDE δ verwandt.^[232] Wie in Abbildung 6.1A gezeigt, enthält UNC119A ein Immunglobulin-ähnliches β -Sandwich, das eine hydrophobe Tasche bildet, in der Myristoylgruppen gebunden werden können

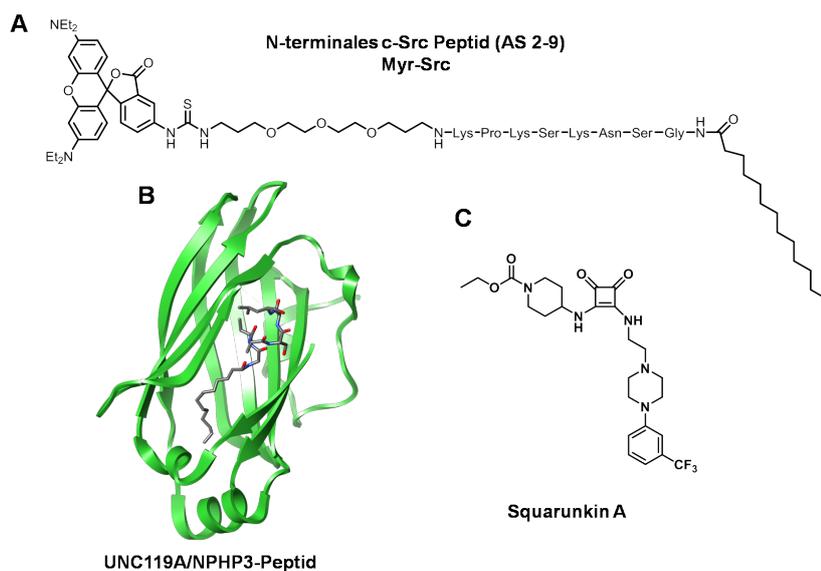


Abb. 6.1: Chemische Struktur von Myr-Src (A). Kristallstruktur von UNC119A im Komplex mit dem myristoylierten NPHP3-Peptid (B). Chemische Struktur von Squarunkin A (C).

(siehe Abb. 6.1A).^[93,233] Dadurch wird der hydrophobe Lipidanker vom wässrigen Medium abgeschirmt und die Diffusion der lipidierten Proteine im Zytosol erleichtert. Auf diese Weise assistiert der molekulare Chaperon UNC119A beim Transfer der Lipoproteine zwischen den Membrankompartimenten in der Zelle. Zelluläre Studien haben kürzlich gezeigt, dass UNC119A die Lokalisation der myristoylierten SFKs an der Plasmamembran aufrechterhält.^[94] Daher würde die Inhibierung der UNC119A/*c*-Src-Wechselwirkungen einen neuen potentiellen Ansatz darstellen, um onkogenen *c*-Src-vermittelten Signaltransduktionen entgegenzuwirken. Der zugrunde liegende Mechanismus, nach dem UNC119A die Membranbindung myristoylierter Proteine reguliert, ist jedoch wenig charakterisiert, da die meisten Studien mit UNC119A entweder in Abwesenheit von Membranen^[234,235] oder in Zellen^[93,94,236,237] durchgeführt wurden. Um detaillierte mechanistische Einblicke in den Membranbindungsprozess von *c*-Src in Gegenwart von UNC119A zu erhalten, wurde eine kinetische Analyse der Interaktionen eines myristoylierten Peptids, das vom *N*-Terminus des *c*-Src-Proteins (AS 2-9, Myr-Src) abgeleitet wurde, mit anionischen Modellmembranen in An- und Abwesenheit von UNC119A durchgeführt. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Squarunkin A, einem niedermolekularen Inhibitor der Wechselwirkung zwischen UNC119A und myristoylierten Liganden,^[238] auf den Membranbindungsprozess von Myr-Src in Gegenwart von UNC119A untersucht.

6.2 Material & Methoden

6.2.1 Material & Probenpräparation

Die in dieser Studie verwendeten Chemikalien und Lipide sowie wie ihre Bezugsquellen sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Tab. 6.1: Bezugsquellen der Chemikalien und Lipide für die kinetischen Untersuchungen zur Membranbindung von Myr-Src in Gegenwart von UNC119A.

Chemikalien und Lipide	Bezugsquelle
Atto 647-markiertes DOPE	ATTO-TEC (Siegen, Deutschland)
(1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin)	
Chloroform	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Cholesterol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DOPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DOPG	
(1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol))	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPG	
(1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol))	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
MgCl ₂	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
TRIS	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Die in Pulverform erhaltenen Lipide wurden zur Herstellung von Stammlösungen in Chloroform gelöst ($c = 10 \text{ mg/mL}$). Diese wurden verwendet, um die gewünschten Lipidmischungen in den erforderlichen Mengen zu erhalten. Nachdem das meiste Lösungsmittel durch einen Stickstoffstrom verdampft worden war, wurde das restliche Chloroform durch Trocknen im Vakuum für mindestens 2 h entfernt. Die getrockneten Lipidfilme wurden mit der entsprechenden Menge an Puffer (20 mM TRIS (pH = 7,4) und 5 mM MgCl_2) hydratisiert. Nach ausgiebigem Durchmischen erfolgte eine Ultraschallbehandlung der Proben für 5 min im Wasserbad bei einer Temperatur oberhalb der Phasenübergangstemperatur der jeweiligen Lipidmischung (homogene Lipidmischungen bei Raumtemperatur, heterogene *raft*-ähnliche Lipidmischung $\geq 65 \text{ }^\circ\text{C}$). Große multilamellare Vesikel wurden durch fünf *freeze-thaw*-Zyklen^[239] und eine anschließende Ultraschallbehandlung für 5 min im temperierten Wasserbad erzeugt. Hierfür wurden die Proben abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren und für 15 min im Wasserbad bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Mittels Extrusion (21 Wiederholungen) durch eine Polycarbonatmembran (WhatmanTM NucleoporeTM) mit einer Porengröße von 100 nm und oberhalb der Phasenübergangstemperatur der jeweiligen Lipidmischung wurden die multilamellaren Vesikel in große unilamellare Vesikel (*large unilamellar vesicles*, LUVs) mit einer homogenen Größenverteilung überführt.

6.2.2 *Stopped-flow*-Fluoreszenzspektroskopie

Die kinetischen Messungen wurden unter Verwendung einer Hi-Tech Scientific KinetAsyst SF-61SX2 *stopped-flow*-Apparatur (TgK Scientific, Bradford-on-Avon, UK) durchgeführt. Die Bindung von Myr-Src an die LUVs wurde mithilfe eines FRET-basierten Assays untersucht. Als Donorfluorophor diente Rhodamin B (RhB), das mit dem C-Terminus des c-Src-Peptids verknüpft war, und als Akzeptorfluorophor wurde Atto 647-markiertes DOPE eingesetzt. Die Berechnung des FÖRSTER-Radius R_0 für dieses FRET-Paar erfolgte gemäß Gleichung 6.2.^[240]

$$R_0 = \frac{9(\ln 10) \cdot \kappa^2 Q_d J(\lambda)}{128\pi^5 N_A n_b^4} \quad (6.2)$$

Dabei ist κ der Orientierungsfaktor ($\kappa^2 = 2/3$ für eine statistische Orientierung der Übergangsdipolmomente für Donor und Akzeptor), Q_d die Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors (0,65 für RhB)^[241] und n_b der Brechungsindex des Mediums (1,33 für Wasser). Die spektrale Überlappung der Donoremission und Akzeptorabsorption wurde mit der a|e-UV-Vis-IR Spectral Software (FluorTools) berechnet und beträgt $J(\lambda) = 4,385 \cdot 10^{15} \text{ nm}^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Die Donorvesikel enthielten 0,4 mol% Atto 647-DOPE, während die Akzeptorvesikel, welche die gleiche Lipidzusammensetzung und Größe aufweisen, frei von Fluorophoren waren. In Tabelle 6.2 sind die experimentellen Bedingungen für

die Assoziations- und Dissoziationsexperimente zusammengetragen, wobei die angegebenen Lipidkonzentrationen die der zugänglichen Lipide in der äußeren Lipiddoppelschicht repräsentieren. Näherungsweise entspricht dies der Hälfte der gesamten Lipidkonzentration. Des Weiteren muss beachtet werden, dass die gezeigten Probenkonzentrationen die nach dem Mischen in der Mischkammer darstellen.

Tab. 6.2: Experimentelle Bedingungen für die Assoziations- und Dissoziationsexperimente von Myr-Src mit Membranen. Die Lipidkonzentration repräsentiert die der zugänglichen Lipide. Angegebene Probenkonzentrationen entsprechen denen in der Mischkammer.

	Reaktionsspritze 1	Reaktionsspritze 2
Assoziation	0,5 μM RhB-Myr-Src	Donorvesikel ($c_{\text{Lipid}} = 1-75 \mu\text{M}$)
Dissoziation	0,5 μM RhB-Myr-Src + Donorvesikel ($c_{\text{Lipid}} = 40 \mu\text{M}$)	Akzeptorvesikel ($c_{\text{Lipid}} = 400 \mu\text{M}$)

Für die Dissoziationsexperimente wurden die Donorvesikel mit RhB-markiertem Myr-Src gemischt und für etwa 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Aus den Assoziationsexperimenten war bekannt, dass eine Lipidkonzentration von 40 μM ausreicht, um den größten Anteil des Peptids zu binden.

Zur Studie des Einflusses von UNC119A auf die Membranbindungskinetik von Myr-Src wurden die Assoziationsexperimente zunächst mit zunehmenden Mengen an UNC119A (1) und anschließend analog zu den vorherigen Experimenten mit variierenden Lipidkonzentrationen der Donorvesikel (2) durchgeführt (siehe Tab. 6.3).

Tab. 6.3: Experimentelle Bedingungen für die Assoziations- und Dissoziationsexperimente von Myr-Src mit Membranen in Anwesenheit von UNC119A. Die Lipidkonzentration repräsentiert die der zugänglichen Lipide. Angegebene Probenkonzentrationen entsprechen denen in der Mischkammer.

	Reaktionsspritze 1	Reaktionsspritze 2
Assoziation 1	0,5 μM RhB-Myr-Src + 0-2,5 μM UNC119A	Donorvesikel ($c_{\text{Lipid}} = 40 \mu\text{M}$)
Dissoziation 1	0,5 μM RhB-Myr-Src + Donorvesikel ($c_{\text{Lipid}} = 40 \mu\text{M}$)	0-2,5 μM UNC119A
Assoziation 2	0,5 μM RhB-Myr-Src + 2,5 μM UNC119A	Donorvesikel ($c_{\text{Lipid}} = 2,5 - 50 \mu\text{M}$)
Dissoziation 2	0,5 μM RhB-Myr-Src + Donorvesikel ($c_{\text{Lipid}} = 40 \mu\text{M}$)	2,5 μM UNC119A + Akzeptorvesikel ($c_{\text{Lipid}} = 400 \mu\text{M}$)

In beiden Fällen wurde Myr-Src vorher mit UNC119A für ungefähr 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bildung des Protein/Peptid-Komplexes zu gewährleisten, bevor die Mischung mit den Donorvesikeln in der *stopped-flow*-Apparatur erfolgte. Der Einfluss von UNC119A auf die Dissoziation von Myr-Src von der Modellmembran wurde in Ge-

genwart (2) und Abwesenheit (1) von Akzeptorvesikeln untersucht. Analoge Experimente wurden mit dem niedermolekularen Inhibitor Squarunkin A durchgeführt (siehe Tab. 6.4)

Tab. 6.4: Experimentelle Bedingungen für die Assoziations- und Dissoziationsexperimente von Myr-Src mit Membranen in Anwesenheit von UNC119A und Squarunkin A. Die Lipidkonzentration repräsentiert die der zugänglichen Lipide. Angegebene Probenkonzentrationen entsprechen denen in der Mischkammer.

	Reaktionsspritze 1	Reaktionsspritze 2
Assoziation 1	0,5 μM RhB-Myr-Src + 2,5 μM UNC119A + 2,5-6,25 μM Squarunkin A	Donorvesikel ($c_{\text{Lipid}} = 40 \mu\text{M}$)
Dissoziation 1	0,5 μM RhB-Myr-Src + Donorvesikel ($c_{\text{Lipid}} = 40 \mu\text{M}$)	2,5 μM UNC119A + 2,5-6,25 μM Squarunkin A
Assoziation 2	0,5 μM RhB-Myr-Src + 2,5 μM UNC119A + 2,5 μM Squarunkin A	Donorvesikel ($c_{\text{Lipid}} = 2,5 - 50 \mu\text{M}$)
Dissoziation 2	0,5 μM RhB-Myr-Src + Donorvesikel ($c_{\text{Lipid}} = 40 \mu\text{M}$)	2,5 μM UNC119A + 2,5 μM Squarunkin A + Akzeptorvesikel ($c_{\text{Lipid}} = 400 \mu\text{M}$)

Die Konzentration von UNC119A wurde so gewählt, dass zu Beginn des Experiments der größte Anteil des Peptids an das Protein gebunden war. Gemäß Gleichung 6.3 entspricht der Anteil des an UNC119A gebundenen Peptids (θ_{Pep}) bei einer UNC119A-Konzentration von 2,5 μM und einem K_d -Wert von 91 nM^[234] 96 %.

$$\theta_{\text{Pep}} = \frac{[\text{UNC119A}]}{[\text{UNC119A}] + K_d} \quad (6.3)$$

In allen Experimenten wurde das RhB-markierte Myr-Src bei 546 nm unter Verwendung einer XeHg-Bogenlampe angeregt. Für die Aufzeichnung der Fluoreszenzemission von Atto 647-DOPE in den Donorvesikels, die aus dem Energietransfer nach Donorstimulation resultiert, wurde ein Langpassfilter 650LP (*cut-on* 650nm/ ± 2 nm, Omega Optical, Brattleboro, USA) eingesetzt. Im Allgemeinen wurden 5-10 Einzelmessungen für jedes Experiment akkumuliert, wobei mindestens drei unabhängige Messungen für jede Bedingung durchgeführt wurden. Abhängig von der Kinetik variierte die Messzeit von 2-60 s. Alle Messungen wurden bei 25 °C im Puffer (20 mM TRIS (pH = 7,4), 5 mM MgCl₂) durchgeführt. An die Daten der Assoziations- und Dissoziationsexperimente wurde eine biexponentielle Gleichung (siehe Gl. 6.4) angepasst, die einen zweistufigen Bindungsprozess beschreibt:

$$F(t) = F_0 + A_1(1 - e^{-k_{\text{obs},1}t}) + A_2(1 - e^{-k_{\text{obs},2}t}) \quad (6.4)$$

Hier ist $F(t)$ das Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt t . Die Amplituden A_1 und A_2 für die erste bzw. zweite Bindungsphase können positiv für Assoziationsexperimente (exponentieller Anstieg) oder negativ für Dissoziationsexperimente (exponentieller Abfall) sein. $k_{\text{obs},1}$ und $k_{\text{obs},2}$ stellen die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten für den ersten bzw. zweiten Bindungsschritt dar und F_0 ist die Fluoreszenzintensität einschließlich des Hintergrundsignals zum Zeitpunkt $t = 0$. Da die Bindung in zwei Schritten erfolgt, kann die Kinetik anhand des folgenden Mechanismus erklärt werden:



Unter den Bedingungen einer Reaktion pseudo-erster Ordnung, d.h. bei einer geringen Peptidkonzentration $[P]$ und einem Überschuss an Lipiden ($[P] \ll [L]$), wird die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der ersten Bindungsphase $k_{\text{obs},1}$ durch die folgende Gleichung beschrieben:

$$k_{\text{obs},1} = k_{-1} + k_{+1}[L] + k_{+2} + k_{-2} \quad (6.5)$$

Wenn die erste Gleichgewichtsreaktion sehr viel schneller als die zweite abläuft, kann Gleichung 6.5 wie folgt vereinfacht werden:^[242]

$$k_{\text{obs},1} = k_{-1} + k_{+1}[L] \quad (6.6)$$

Die Bezeichnungen k_{+1} und k_{-1} stellen die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung bzw. die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante erster Ordnung dar. Durch die Variation der Lipidkonzentration $[L]$ kann k_{+1} aus der Steigung der Auftragung von $k_{\text{obs},1}$ als Funktion von $[L]$ ermittelt werden. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass das Peptid im Vesikel von etwa 60 Lipidmolekülen umgeben ist,^[243] anstatt einen 1:1-Komplex mit einem Lipid zu bilden. Daher wird die Steigung dieser Kurve mit 60 multipliziert, um den korrigierten Wert für k_{+1} zu erhalten. Obwohl sich k_{-1} aus dem y-Achsenschnittpunkt dieses Diagramms ableiten lässt, ist dieser extrapolierte Wert oft nicht so genau wie der direkt aus einem Dissoziationsexperiment erhaltene Wert für k_{-1} , insbesondere wenn dieser in der Nähe des Ursprungs des Graphen liegt.^[242] Da in den Dissoziationsexperimenten ein großer Überschuss an Akzeptorvesikeln in Bezug auf die Donorvesikel verwendet wurde, kann der Beitrag der erneuten Bindung in den beobachteten Geschwindigkeitskonstanten eliminiert werden, d.h. die aus den Dissoziationsmessungen erhaltenen Werte für $k_{\text{obs},1}$ und $k_{\text{obs},2}$ entsprechen direkt den Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1} und k_{-2} . Für die zweite beobachtete Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{obs},2}$ gilt Gleichung 6.7, die eine hyperbolische Funktion beschreibt.

$$k_{\text{obs},2} = k_{+2} \frac{K_{\text{b},1}[L]}{1 + K_{\text{b},1}[L]} + k_{-2} \quad (6.7)$$

$K_{b,1} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}}$ stellt die Bindungskonstante des ersten Bindungsschrittes dar. Unter der Annahme, dass die Bildung des ersten Zustandes stark begünstigt ist, kann $k_{obs,2}$ näherungsweise durch Gleichung 6.8 wiedergegeben werden:

$$k_{obs,2} = k_{+2} + k_{-2} \quad (6.8)$$

Mithilfe aller Geschwindigkeitskonstanten können die Dissoziationskonstanten für jeden Bindungsschritt sowie für die Gesamtreaktion gemäß den Gleichungen 6.9 bzw. 6.10 berechnet werden:

$$K_{d,i} = \frac{1}{K_{b,i}} = \frac{k_{-i}}{k_{+i}} \quad (6.9)$$

$$K_d = K_{d,1} \cdot K_{d,2} \quad (6.10)$$

Die Änderung der Standard-GIBBS-Energie ΔG° für die Bindungsreaktion steht im folgenden Zusammenhang mit der Bindungskonstanten K_b :

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad (6.11)$$

R ist hier die Gaskonstante und T ist die Temperatur (in K).

6.3 Ergebnisse & Diskussion

6.3.1 Bindungsmechanismus von c-Src an Membranen

Das Peptid Myr-Src,^[243] das Protein UNC119A^[244] und der Inhibitor Squarunkin A^[238] wurden von Dr. Tom Mejuch (Postdoktorand, Abteilung Chemische Biologie, MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) gemäß bekannten Protokollen hergestellt und für diese Studie zur Verfügung gestellt. Um mechanistische Einblicke in den Membranbindungsprozess von Myr-Src in An- und Abwesenheit von UNC119A zu erhalten, wurde ein FRET-basierter Bindungsassay entwickelt, der in den kinetischen Studien unter Verwendung der *stopped-flow*-Technik eingesetzt wurde. Das am C-Terminus von Myr-Src gebundene RhB bildete dabei mit Atto 647, das mit der Kopfgruppe von DOPE verknüpft war, ein FRET-Paar. Die Überlappung des Emissions- und Absorptionsspektrums von RhB und Atto 647 (siehe Abb. 6.2) deutet auf einen möglichen Energietransfer zwischen diesen Fluorophoren in räumlicher Nähe hin. Der FÖRSTER-Radius für diese beiden Fluorophore wurde gemäß Gleichung 6.2 berechnet und beträgt 6,13 nm, weshalb diese Fluorophore als FRET-Paar verwendet werden können, um die Bindung des Peptids an die Membran zu beobachten. Bei den Assoziationsexperimenten (siehe Abb. 6.3) wurde das RhB-markierte

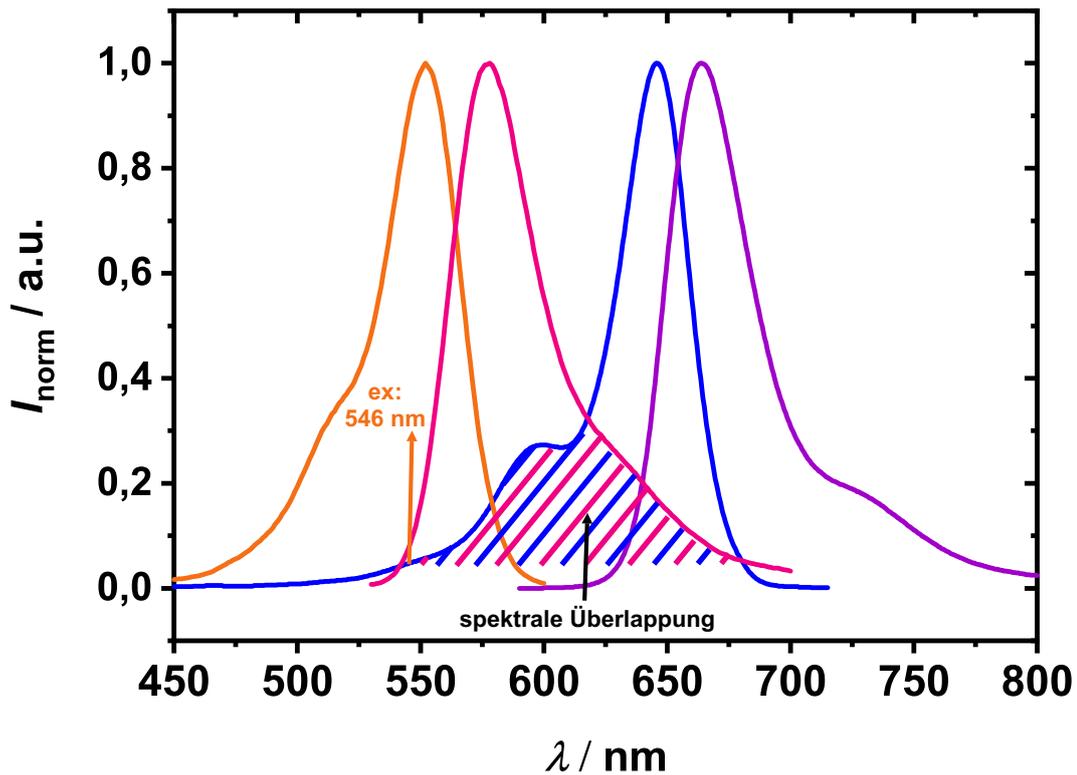


Abb. 6.2: Spektrale Charakterisierung von Rhodamin B (Absorption: orange, Emission: pink) und Atto 647-DOPE (Absorption: blau, Emission: violett).

c-Src-Peptid mit den Atto 647-DOPE enthaltenden Donorvesikeln in einer *stopped-flow*-Apparatur gemischt, was zu einem deutlichen Anstieg des FRET-Signals (Anregung: 546 nm, Emission: oberhalb von 650 nm) führte. Dahingegen nahm das FRET-Signal ab, wenn Myr-Src von den Donorvesikeln dissoziierte und auf einen zehnfachen molaren Überschuss an unmarkierten Akzeptorvesikeln gleicher Größe und Lipidzusammensetzung transferiert wurde. In Abbildung 6.3B und C ist der zeitliche Verlauf der Assoziations- und Dissoziationsexperimente exemplarisch für die Lipidzusammensetzung DOPC/DOPG (80:20 mol%) dargestellt. Diese Kurven ließen sich bestmöglich durch biexponentielle Funktionen (siehe Gl. 6.4) anpassen, was auf einen zweistufigen Bindungsprozess hinweist. Dies steht im Einklang mit einer kürzlich durchgeführten SPR (Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*))-Studie, in der ein zweistufiger Membranbindungsmechanismus für das c-Src-Peptid vorgeschlagen wurde.^[245] Solch ein zweistufiger Bindungsprozess wurde auch für andere lipidierte Proteine berichtet, wie z.B. für das myristoylierte Nef-Protein^[246] und die farnesylierten sowie palmitoylierten Ras-Proteine.^[247,248] Die aus der Anpassung erhaltene beobachtete Geschwindigkeitskonstante des schnellen Bindungsschritts $k_{\text{obs},1}$ zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Lipidkonzentration, wohingegen die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der langsamen Bindungsphase $k_{\text{obs},2}$ weitestgehend konstant ist (siehe Abb. 6.3D). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass dem initialen konzentrationsabhängigen Assoziationsschritt ein von der Lipidkonzentration unabhängiger Prozess erster Ordnung folgt. Wie im Methodenteil (siehe Abschnitt 6.2.2) beschrieben, können

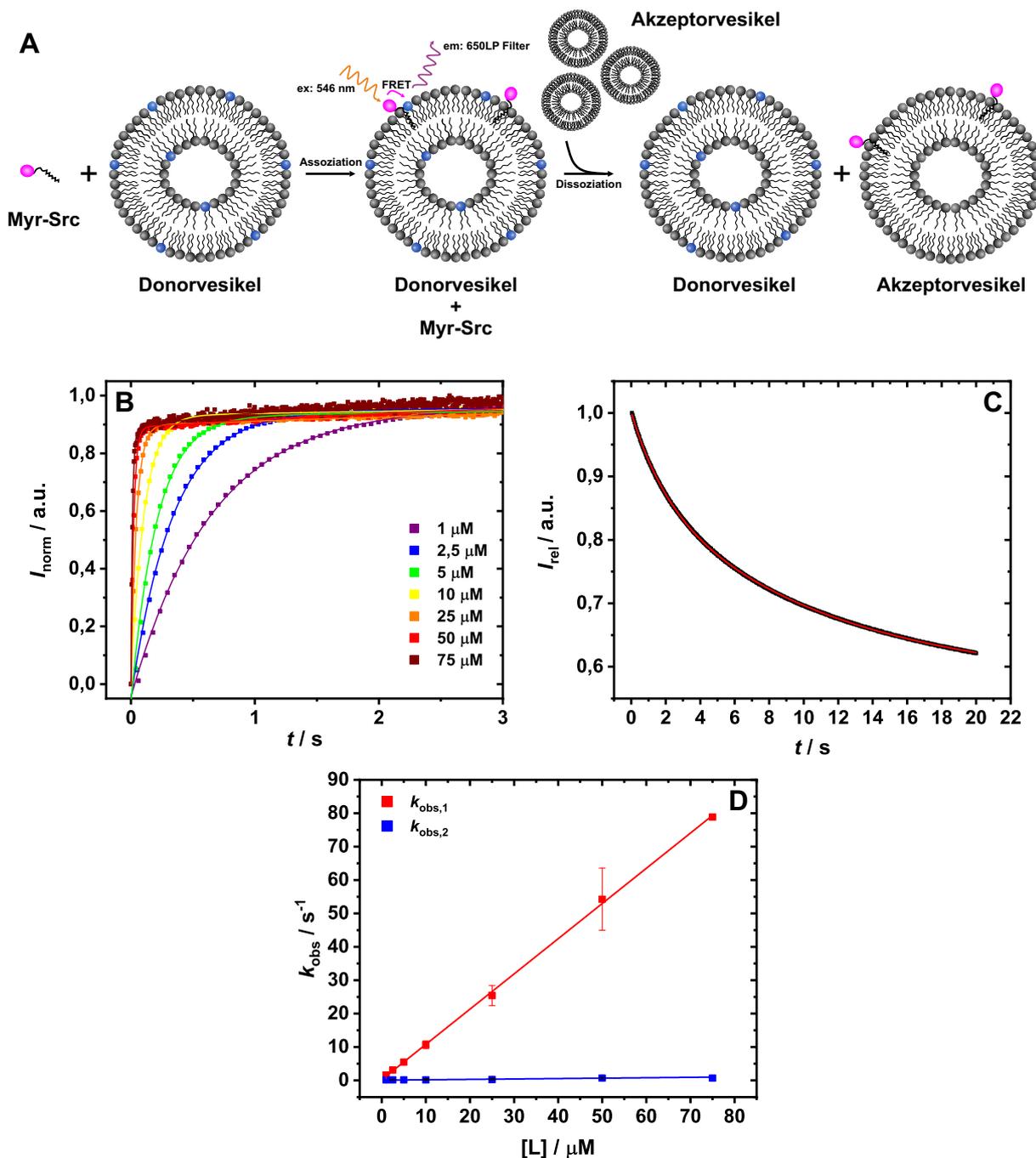


Abb. 6.3: FRET-basierter Assay für die Assoziations- und Dissoziationsexperimente von Myr-Src mit Membranen (A) bei 25 °C in Puffer (20 mM TRIS und 5 mM MgCl₂). Normierte Assoziationskurven von 0,5 μM Myr-Src mit Donorvesikeln (1-75 μM) aus DOPC/DOPG (80:20 mol%). Biexponentielle Funktionen (durchgehende Linie) sind an die experimentellen Datenpunkte angepasst (B). Dissoziation von 0,5 μM Myr-Src von Donorvesikeln ($c_{\text{Lipid}} = 40 \mu\text{M}$) durch den Transfer auf einen zehnfachen molaren Überschuss an Akzeptorvesikeln ($c_{\text{Lipid}} = 400 \mu\text{M}$) (C). Auftragung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit der Lipikonzentration. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen (D).

mithilfe dieser Experimente die Geschwindigkeitskonstanten für die zugrunde liegende Hin- und Rückreaktion beider Bindungsschritte abgeleitet werden. Aus diesen ergeben sich schließlich thermodynamische Parameter, wie die Dissoziationskonstante und die Änderung der Standard-GIBBS-Energie für diese Bindungsreaktion.

6.3.2 Einfluss negativ geladener Lipide auf die Membranbindung von c-Src

Um die Beiträge elektrostatischer Wechselwirkungen zur Membranbindung von c-Src zu erforschen, wurden für die kinetischen Untersuchungen von Myr-Src Membranen aus DOPC und unterschiedlichen Mengen an negativ geladenen PG-Lipiden (0-30 mol%) verwendet. In Abbildung 6.4A sind die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten beider Bindungsschritte in Abhängigkeit der Lipidkonzentration dargestellt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass der erste Bindungsprozess mit zunehmendem PG-Anteil in der Membran schneller abläuft, wohingegen $k_{\text{obs},2}$ keine sichtbaren Änderungen zeigt. Die Dissoziationsexperimente zeigen hingegen, dass die Dissoziation von Myr-Src bei höheren PG-Anteilen verlangsamt wird (siehe Abb. 6.4B).

Aus der quantitativen Auswertung dieser kinetischen Studie (siehe Abschnitt 6.2.2) ergeben sich die in Abbildung 6.5 gezeigten Geschwindigkeitskonstanten für die beiden Bindungsschritte von Myr-Src an Membranen. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante der ersten Bindungsphase, k_{+1} , steigt von $3,6 \cdot 10^{-7} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ auf $8,4 \cdot 10^{-7} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, wenn der PG-Gehalt von 0 auf 30 mol% erhöht wird, wohingegen sich die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante dieser Bindungsphase, k_{-1} , von $1,18 \text{s}^{-1}$ auf $0,25 \text{s}^{-1}$ verringert. Dies führt dazu, dass die Dissoziationskonstante des ersten Bindungsschrittes $K_{d,1}$ um mehr als eine Größenordnung, von $\sim 33 \text{nM}$ auf $\sim 3 \text{nM}$, reduziert wird, was mit einer erhöhten Bindungsaffinität von Myr-Src gegenüber negativ geladenen Membranen einhergeht (siehe Tab. 6.5). Im Gegensatz dazu sinkt sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der zweiten Bindungsphase in Anwesenheit von 10 mol% DOPG. Höhere PG-Mengen wirken sich hingegen nur minimal auf k_{+2} und k_{-2} aus (siehe Abb. 6.5C und D).

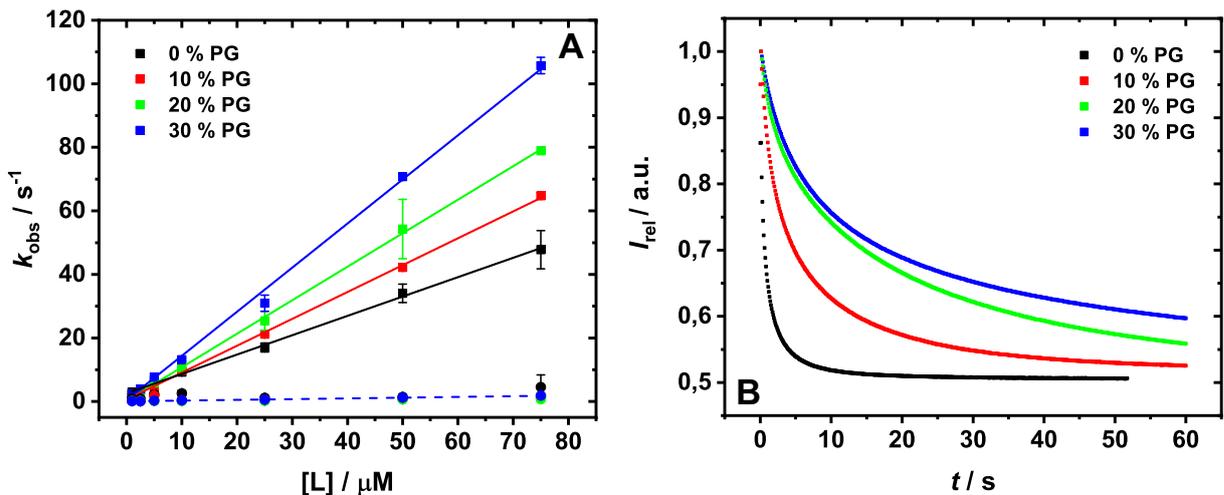


Abb. 6.4: Assoziations- und Dissoziationsexperimente von Myr-Src ($c = 0,5 \mu\text{M}$) mit Membranen aus DOPC und unterschiedlichen Anteilen an PG (0-30 mol%). Aus den Assoziationsexperimenten abgeleitete, beobachtete Geschwindigkeitskonstanten für den ersten (■) und zweiten (●) Bindungsschritt in Abhängigkeit der Lipidkonzentration (A). Dissoziation von Myr-Src von Donorvesikeln ($c_{\text{Lipid}} = 40 \mu\text{M}$) durch den Transfer auf einen zehnfachen molaren Überschuss an Akzeptorvesikeln ($c_{\text{Lipid}} = 400 \mu\text{M}$) gleicher Lipidzusammensetzung und Größe (B).

Aus früheren CD- und NMR-spektroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass das c-Src-Peptid bei der Membranbindung keine erkennbaren Strukturänderungen durchläuft, sondern in dessen membrangebundenen Zustand eine ungeordnete längliche Konformation annimmt.^[52,249,250] Dies führt zu der Annahme, dass beim zweiten Bindungsschritt, der unabhängig von der Lipidkonzentration einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung folgt, weitere laterale Umlagerungen und Reorientierungen von Myr-Src in der Membran stattfinden. Durch die Ausbildung von starken elektrostatischen Interaktionen zwischen dem Peptid und der negativ geladenen Membran können diese Prozesse stark retardiert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass elektrostatische Wechselwirkungen hauptsächlich zum ersten Bindungsschritt beitragen, aber auch Auswirkungen auf den nachfolgenden membranassoziierten Prozess haben.

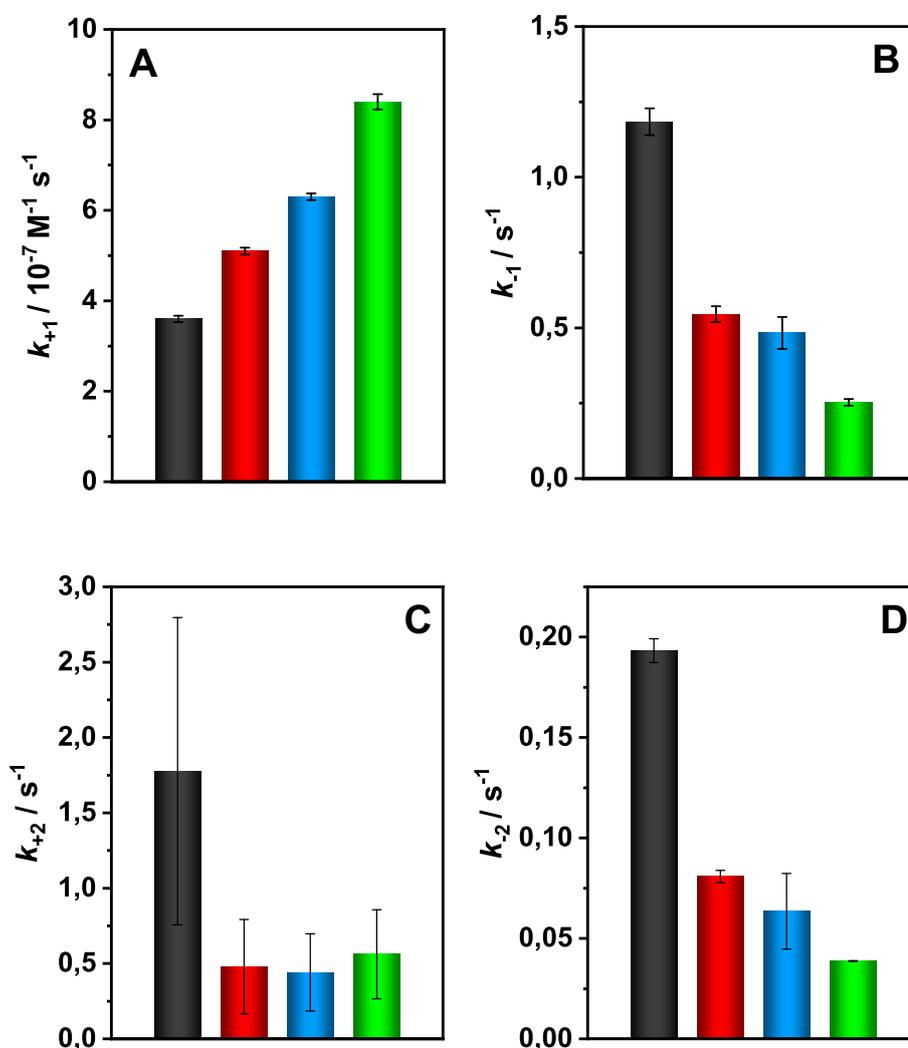


Abb. 6.5: Die Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} (A), k_{-1} (B), k_{+2} (C) und k_{-2} (D) für die Bindungsreaktion von Myr-Src an Membranen aus DOPC und unterschiedlichen Anteilen an PG (0-30 mol%). Alle Werte sind aus den Assoziations- und Dissoziationsexperimenten in 20 mM TRIS (pH = 7,4) mit 5 mM MgCl₂ bei 25 °C abgeleitet. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen.

Insgesamt sinkt ΔG^\ominus der Membranbindung (siehe Gl. 6.11) mit zunehmendem PG-Anteil, was bestätigt, dass die basischen Aminosäuren in der Nähe des Myristoylankers mit den sauren Lipidkopfguppen interagieren und zur stabilen Membranbindung beitragen.^[52] Erstaunlicherweise liegt der ermittelte K_d -Wert für den gesamten Bindungsprozess in Abwesenheit negativ geladener Lipide bereits im nanomolaren Bereich, was auf eine ausgedehnte Clusterbildung dieses Peptids hinweist.^[248] Tatsächlich haben neuere Studien gezeigt, dass die *N*-terminale Sequenz von c-Src im membrangebundenen Zustand Oligomere bzw. Cluster bilden kann.^[243,245,251]

Tab. 6.5: Dissoziationskonstanten des schnellen und langsamen Bindungsschrittes sowie des gesamten Bindungsprozess von Myr-Src mit Membranen aus DOPC mit verschiedenen PG-Anteilen (0-30 mol%). ΔG^\ominus ist für den gesamten Membranbindungsprozess von Myr-Src angegeben.

	$K_{d,1}$ / nM	$K_{d,2}$	K_d / nM	ΔG^\ominus / kJ mol ⁻¹
0 mol% PG	32,9±1,4	0,11±0,06	3,58±2,06	-48,2±1,4
10 mol% PG	10,7±0,5	0,17±0,11	1,80±1,18	-49,9±1,6
20 mol% PG	7,7±0,8	0,14±0,09	1,11±0,73	-51,1±1,6
30 mol% PG	3,0±0,1	0,07±0,04	0,21±0,11	-55,3±1,3

6.3.3 Einfluss von l_d/l_o -Phasenkoexistenzen auf die Membranbindung von c-Src

Um den Einfluss von l_d/l_o -Phasenkoexistenzen in Membranen, die die heterogene Organisation natürlicher Membranen nachahmen, auf die Bindung von Myr-Src zu analysieren, wurden für die kinetischen Studien homogene und heterogene Membransysteme mit gleichen Mengen an negativ geladenen Lipiden verwendet. Während die Lipide der Mischung DOPC/DOPG (80:20 mol%) homogen verteilt sind und in einer vollständig fluiden l_d -Phase vorliegen, entmischen sich die Lipide der Fünf-Komponenten-Mischung DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Chol (15:10:40:10:25 mol%) bei 25 °C in flüssig-ungeordnete und flüssig-geordnete Phasen.

In Abbildung 6.6 sind die Assoziations- und Dissoziationsexperimente von Myr-Src in beiden Membransystemen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Dissoziation von Myr-Src in beiden Membransystemen mit einer ähnlichen Geschwindigkeit abläuft, während die Assoziation in der heterogenen *raft*-ähnlichen Membran wesentlich langsamer als in der homogenen Membran ist. Anhand der quantitativen Auswertung dieser Experimente (siehe Abb. 6.7B) wird bestätigt, dass die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1} und k_{-2} in der phasenseparierten Membran vergleichsweise geringfügig reduziert sind (siehe Abb. 6.7C und D), was auf eine ähnliche Verweilzeit von Myr-Src in beiden Membransystemen hindeutet. Dahingegen können signifikante Unterschiede für die

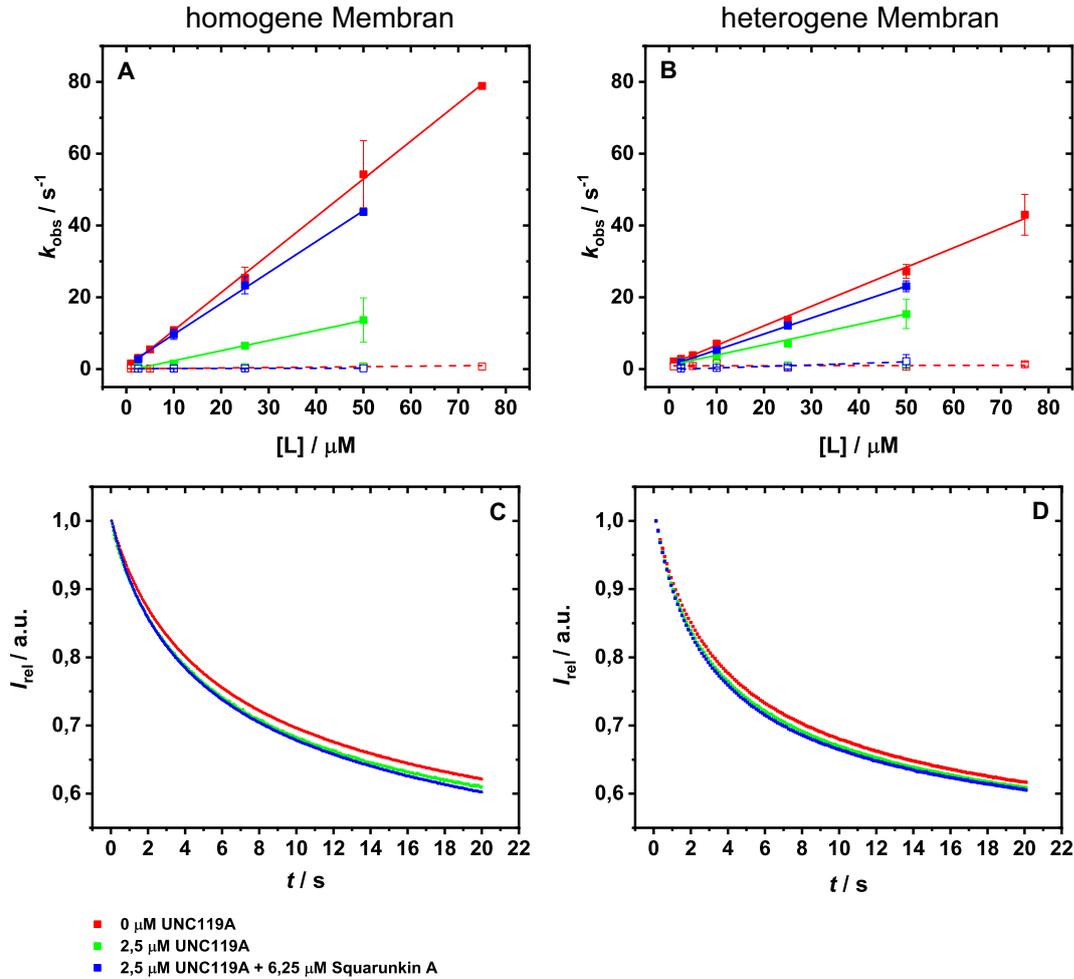


Abb. 6.6: Beobachtete Geschwindigkeitskonstanten für den schnellen (■) und langsamen (●) Membranbindungsschritt von Myr-Src ($c = 0,5 \mu\text{M}$) mit homogenen (A) und heterogenen (B) Membranen mit 20 mol% PG in An- und Abwesenheit von UNC119A ($c = 2,5 \mu\text{M}$) sowie Squarunkin A ($c = 6,25 \mu\text{M}$) als Funktion der Lipidkonzentration. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Messungen, die alle bei 25 °C in 20 mM TRIS (pH = 7,4) mit 5 mM MgCl_2 durchgeführt sind. Die Dissoziation von Myr-Src ($c = 0,5 \mu\text{M}$) von Donorvesikeln ($c = 40 \mu\text{M}$) wird durch den Transfer auf Akzeptorvesikel ($c = 400 \mu\text{M}$) gleicher Lipidzusammensetzung und Größe mit homogenen (C) und heterogenen (D) Membransystemen initiiert.

Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten beobachtet werden, da k_{+1} für das heterogene *raft*-ähnliche Membransystem im Vergleich zur homogenen Membran von $6,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auf $3,1 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ sinkt (siehe Abb. 6.7A). Dies könnte auf mehr dichter gepackte Lipide in der Membran zurückgeführt werden, welche die Insertion des Myristoylankers in die Lipiddoppelschicht erschweren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der erste Bindungsschritt von Myr-Src an die Membran sowohl die Ausbildung elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den basischen AS-Resten und den negativ geladenen Lipiden als auch die Insertion des Lipidankers in die Membran umfasst. Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch für andere myristoylierte Proteine wie Nef beobachtet.^[246] Diese Annahme wird zudem durch die berechnete Standard-GIBBS-Energie des ersten Bindungsschritts von Myr-Src an die homogene Membran mit 20 mol% PG bestätigt, die etwa -46 kJ/mol beträgt und 90 % der Standard-GIBBS-Energie des gesamten Bindungsprozesses ausmacht

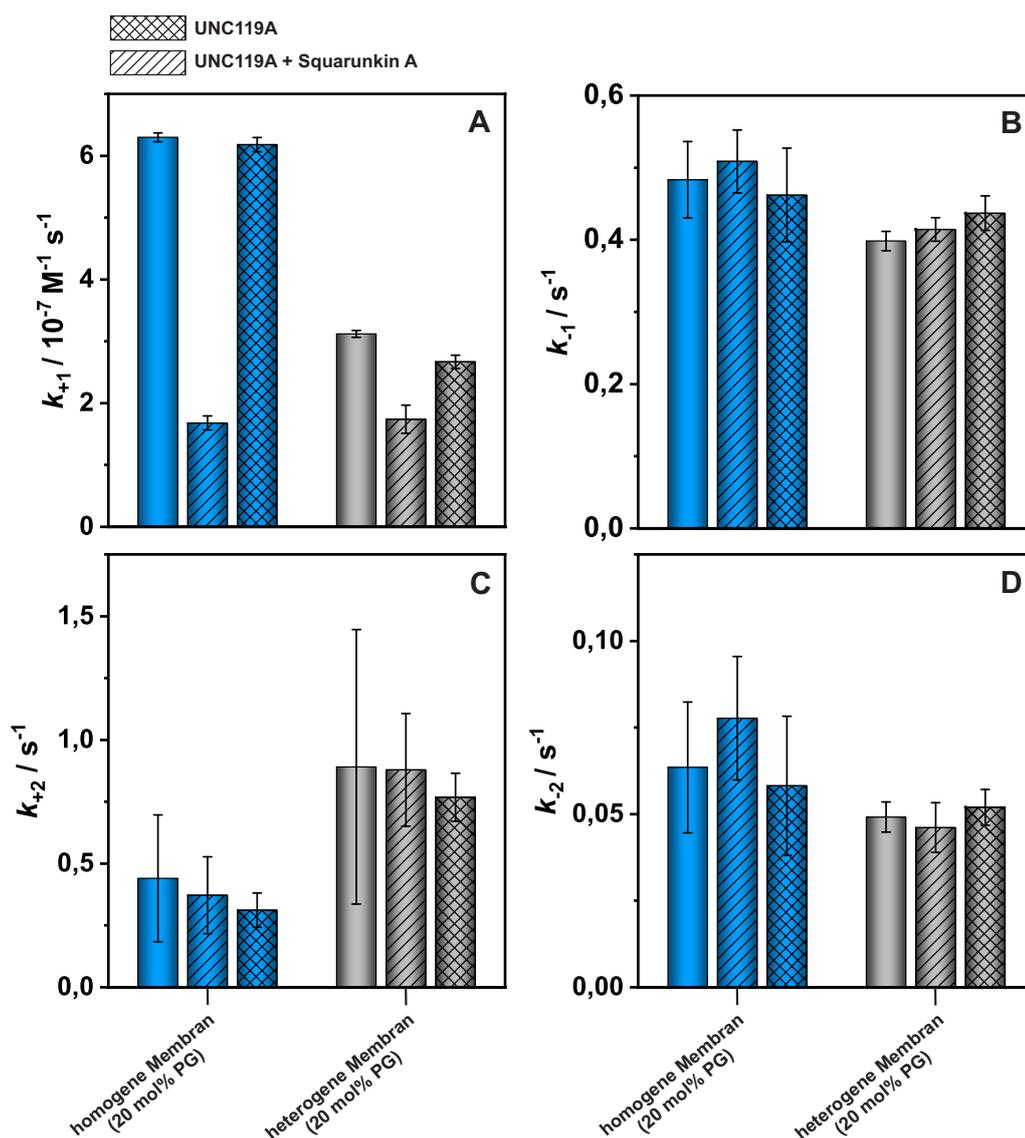


Abb. 6.7: Die Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} (A), k_{-1} (B), k_{+2} (C) und k_{-2} (D) für die Bindungsreaktion von Myr-Src mit homogenen und heterogenen Membranen mit 20 mol% PG. Die Geschwindigkeitskonstanten sind in An- und Abwesenheit von UNC119A und Squarunkin A bestimmt. Alle Werte sind aus den Assoziations- und Dissoziationsexperimenten in 20 mM TRIS (pH = 7,4) mit 5 mM MgCl₂ bei 25 °C abgeleitet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Messungen.

(siehe Tab. 6.6). Andererseits steigt k_{+2} signifikant von 0,44 s⁻¹ in homogenen Membranen auf 0,89 s⁻¹ in Membranen mit l_d/l_o-Phasenkoexistenz (siehe Abb. 6.7B). Aufgrund der energetisch ungünstigen Kettenlängendifferenz des Myristoylankers und der Alkylketten der umgebenden Phospholipide^[250,252] kann in heterogenen Membranen eine effektive Sortierung der Lipide induziert werden, um solche Packungsdefekte zu vermeiden. DWIVEDI *et al.* haben kürzlich in einer umfangreichen Studie gezeigt, dass sich die laterale Organisation einer *raft*-ähnlichen Membran mit einem 10 %-igen Anteil negativ geladener Lipide durch die Bindung von Myr-Src signifikant verändert.^[243] Dieser Lipidsortierungseffekt kann dazu beitragen, die Reorientierungen sowie laterale Umlagerungen von Myr-Src in *raft*-ähnlichen Membranen zu beschleunigen. Innerhalb des experimentellen Fehlers sind keine signifi-

kanten Unterschiede in der Bindungsaffinität von Myr-Src für homogene und heterogene Membrane bei gleichem PG-Anteil ersichtlich, die beide im nanomolaren Bereich liegen (siehe Tab. 6.6).

Um die Bindung von Myr-Src an diese *raft*-ähnliche Membrane mit 20 mol% PG zu visualisieren, wurden im Rahmen dieser Studie AFM-Messungen von Dr. Mridula Dwivedi (Postdoktorandin am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I, TU Dortmund) durchgeführt. In Übereinstimmung mit der früheren Studie^[243] können hier strukturelle Änderungen in der heterogenen Membran vermutlich als Folge der Lipidsortierung, die durch die starken elektrostatischen Wechselwirkungen und die Kettenlängendifferenz induziert wird, beobachtet werden, was die aus den kinetischen Messungen abgeleiteten Schlüsse bestätigt. Durch die Insertion von Myr-Src wird außerdem die energetisch ungünstige Linienspannung an den Phasengrenzen reduziert, sodass die l_d/l_o -Phasenseparation in der Membran weitestgehend aufgehoben wird. Obwohl die Analyse der *stopped-flow*-Daten durch die Unabhängigkeit des zweiten Bindungsschritts von der Lipidkonzentration keinen direkten Hinweis auf die Bildung von Oligomeren liefert, sind in den hochauflösenden AFM-Bildern Nanocluster mit einer Höhe von 0,2-0,6 μm in den l_d -Phasen und im geringeren Ausmaß auch in den l_o -Phasen deutlich sichtbar.^[227]

Tab. 6.6: Dissoziationskonstante für den schnellen und langsamen Bindungsschritt sowie den gesamten Bindungsprozess von Myr-Src mit homogenen und heterogenen Membranen mit 20 mol% PG. ΔG^\ominus ist für den gesamten Membranbindungsprozess von Myr-Src angegeben.

		$K_{d,1}$ / nM	$K_{d,2}$	K_d / nM	ΔG^\ominus / kJ mol ⁻¹
homogene Membran	ohne	7,7±0,8	0,14±0,09	1,11±0,73	-51,1±1,6
	+UNC119A	30,3±3,3	0,21±0,10	6,31±3,09	-46,8±1,2
	+Squarunkin A	7,5±1,1	0,52±0,37	3,90±2,82	-48,0±1,8
heterogene Membran	ohne	12,8±0,5	0,06±0,03	0,70±0,44	-52,2±1,6
	+UNC119A	23,8±3,3	0,05±0,02	1,25±0,41	-50,8±0,8
	+Squarunkin A	16,4±1,0	0,07±0,01	1,12±3,58	-51,1±0,4

6.3.4 Einfluss von UNC119A auf die Membranbindung von c-Src

Um aufzuklären, wie UNC119A die Membranbindung von c-Src reguliert, wurden die Assoziations- und Dissoziationsexperimente mit Myr-Src und den homogenen bzw. heterogenen *raft*-ähnlichen Membransystemen mit 20 mol% PG-Lipiden in Gegenwart von UNC119A durchgeführt. Vor den Assoziationsexperimenten wurde Myr-Src mit UNC119A in verschiedenen molaren Verhältnissen zur Bildung eines Protein/Peptid-Komplexes gemischt. Beim Mischen dieses Komplexes mit einer konstanten Menge an Donorvesikeln in der *stopped-flow*-Apparatur konnte unabhängig von der Lipidzusammensetzung eine Zunahme des FRET-Signals beobachtet werden (siehe Abb. 6.8A und B), was auf eine Frei-

setzung von Myr-Src aus dem Komplex und die anschließende Bindung an die Donorvesikel hinweist. Mit zunehmender UNC119A-Konzentration scheint der Membranbindungsprozess von Myr-Src jedoch langsamer zu werden.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass UNC119 bei der Dissoziation myristoylierter Proteine eine wichtige Rolle spielt.^[93] Um festzustellen, ob UNC119A auch an der Freisetzung von c-Src aus Membranen beteiligt ist, wurde überprüft, ob das zuvor mit einer konstanten Menge an Donorvesikeln äquilibrierte Myr-Src beim Mischen mit UNC119A von der Membran dissoziiert. Wie in Abbildung 6.8C und D zu sehen ist, verbleibt das Peptid in Abwesenheit von UNC119A im gemessenen Zeitrahmen an den Donorvesikeln, was in der hohen Bindungsaffinität ($K_d = 1 \text{ nM}$) von Myr-Src gegenüber den verwendeten Membransystemen begründet ist. Unabhängig vom Membransystem führte die Zugabe

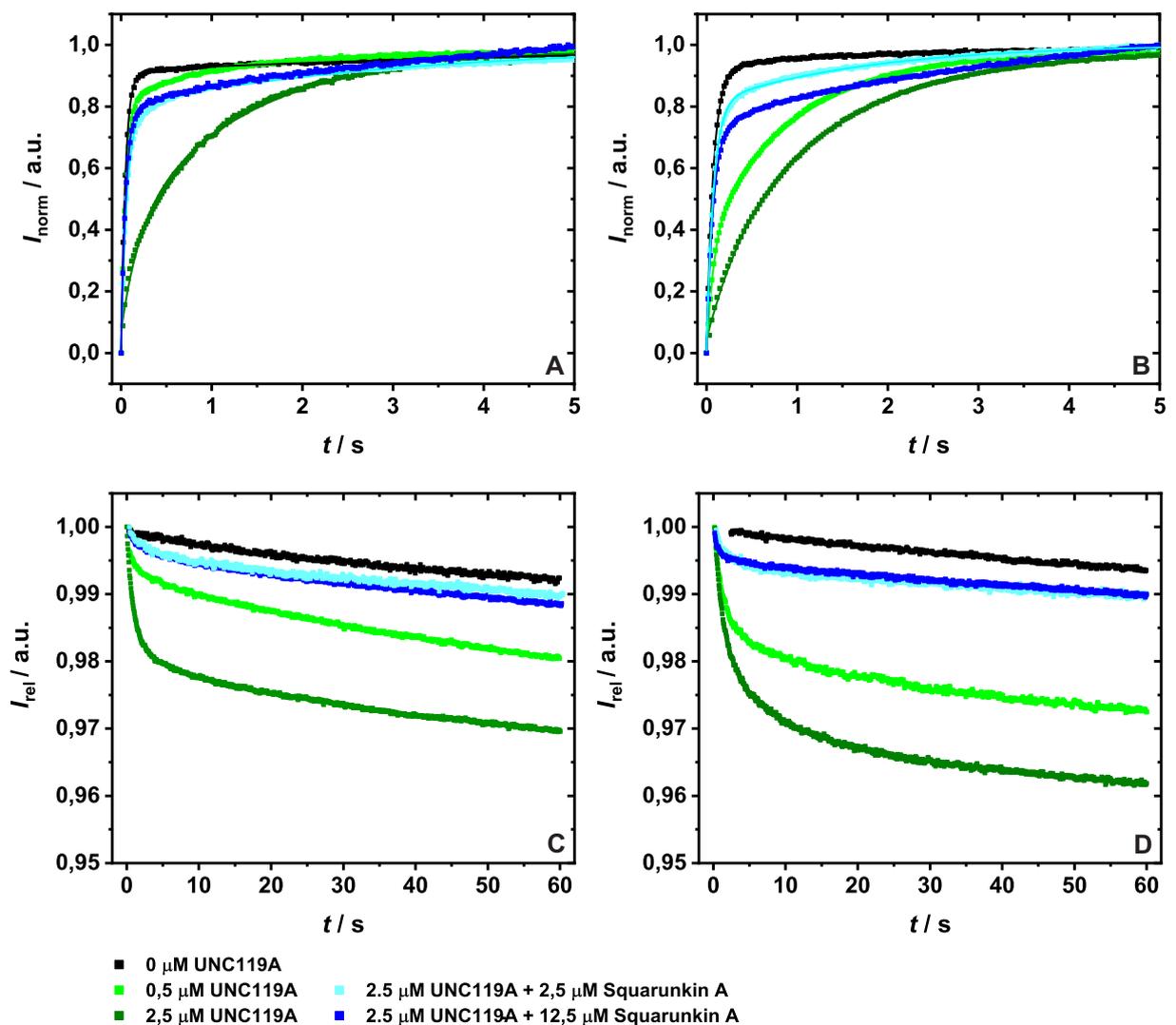


Abb. 6.8: Assoziationskurven von Myr-Src ($c = 0,5 \mu\text{M}$) mit homogenen (A) und heterogenen (B) Membranen ($c_{\text{Lipid}} = 40 \mu\text{M}$) in Gegenwart verschiedener Mengen an UNC119A ($c = 0-2,5 \mu\text{M}$) sowie Squarunkin A ($c = 2,5-6,25 \mu\text{M}$) bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ in 20 mM TRIS ($\text{pH} = 7,4$) mit 5 mM MgCl_2 . Dissoziation von Myr-Src ($c = 0,5 \mu\text{M}$), gebunden an homogene (C) und heterogene (D) Membranen ($c_{\text{Lipid}} = 40 \mu\text{M}$), in Abwesenheit von Akzeptorvesikeln, aber in Gegenwart von UNC119A ($c = 0-2,5 \mu\text{M}$) sowie Squarunkin A ($c = 2,5-6,25 \mu\text{M}$).

von UNC119A dennoch zu einer deutlichen Abnahme des anfänglichen FRET-Signals, was impliziert, dass UNC119A in der Lage ist, die Dissoziation von Myr-Src von den Donorvesikeln unter den verwendeten Bedingungen zu unterstützen.

Da diese Daten quantitativ nur schwer verglichen werden können, wurden die Geschwindigkeitskonstanten für die Membranbindung von Myr-Src wie in den Abschnitten 6.3.2 und 6.3.3 in Gegenwart von UNC119A ermittelt. Für die Assoziationsexperimente wurde Myr-Src mit einem fünffachen molaren Überschuss an UNC119A inkubiert, um sicherzustellen, dass der größte Anteil des Peptids zu Beginn des Experiments im Komplex mit UNC119A vorliegt ($\sim 96\%$, siehe Abschnitt 6.2.2). Anschließend wurde dieser Protein/Peptid-Komplex (1:5) mit Donorvesikeln zunehmender Lipidkonzentration gemischt. Im Gegensatz dazu wurden die Dissoziationsexperimente zusätzlich in Gegenwart eines zehnfachen molaren Überschusses an Akzeptorvesikeln gleicher Lipidzusammensetzung und Größe durchgeführt.

In Anwesenheit von UNC119A steigt $k_{\text{obs},1}$ unabhängig vom Membransystem ebenfalls mit zunehmender Lipidkonzentration an, wobei die Steigung dieser Geraden im Vergleich zu den Messungen ohne UNC119A kleiner ist (siehe Abb. 6.6A und B). Im Gegensatz dazu zeigt $k_{\text{obs},2}$ analog zu den Messungen in Abwesenheit von UNC119A keine ausgeprägte Abhängigkeit von der Lipidkonzentration. Überraschenderweise hat UNC119A keinen Effekt auf die Dissoziation von Myr-Src in Anwesenheit eines zehnfachen molaren Überschusses an Akzeptorvesikeln (siehe Abb. 6.6C und D). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass der Intervesikeltransfer von Myr-Src schneller als die von UNC119A begünstigte Dissoziation des myristoylierten Peptids von der Membran abläuft. Demzufolge nimmt nur k_{+1} in Gegenwart von UNC119A signifikant ab, während die anderen Geschwindigkeitskonstanten nicht beeinflusst werden (siehe Abb. 6.7). Dies weist darauf hin, dass die Bindung des Peptids an die Membran in Gegenwart von UNC119A langsamer abläuft als die spontane Membranbindung von Myr-Src. Zudem zeigen diese Ergebnisse, dass UNC119A nicht an dem zweiten Membranbindungsschritt von Myr-Src beteiligt ist. Dies wurde durch die von Dr. Mridula Dwivedi durchgeführten AFM-Messungen bestätigt, da UNC119A keinen Effekt auf die beobachteten strukturellen Änderungen der heterogenen Membran, die durch die Insertion von Myr-Src verursacht werden, hat. Zusätzlich wurde in den AFM-Experimenten gezeigt, dass UNC119A selbst nicht an die Membran bindet.^[227] Aufgrund der hohen Bindungsaffinität von UNC119A ($K_d = 91 \text{ nM}$)^[234] für Myr-Src steht UNC119A in Konkurrenz mit der Membran, wodurch eine schnelle Membraninsertion von Myr-Src beeinträchtigt wird. Kürzlich erschienene Studien haben gezeigt, dass die Verdrängung myristoylierter Peptide aus dem Komplex mit UNC119A durch die Proteine Arl2/3 erleichtert werden kann,^[94,235] die in der Zelle vorwiegend am RE lokalisiert sind.^[94] Unter diesen experimentellen Bedingungen ist die Abnahme der Membranbindungsaffinität von Myr-Src in Gegenwart von UNC119A folglich ausschließlich auf die Abnahme von k_{+1} zurückzuführen.

Mittels Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie (*fluorescence cross-correlation spectroscopy*, FCCS)-Experimenten wurde im Rahmen dieser Studie der Einfluss von UNC119A auf die Clusterbildung von Myr-Src an der Membranoberfläche untersucht (durchgeführt von Dr. Mridula Dwivedi, Postdoktorandin am Lehrstuhl Physikalische Chemie I, TU Dortmund). Dabei wurde gezeigt, dass die Konzentration von Myr-Src an der Membranoberfläche in Gegenwart von UNC119A sinkt, was direkt mit der geringeren Neigung zur Ausbildung von Oligomeren bzw. Clustern von Myr-Src einhergeht.^[227] Dies resultiert vermutlich aus der reduzierten Bindungsaffinität von Myr-Src gegenüber Membranen in Anwesenheit von UNC119A, die sich aus den vorangegangenen kinetischen Studien ergab.

6.3.5 Inhibierung der UNC119A/c-Src-Wechselwirkungen

Squarunkin A (siehe Abb. 6.1C) wurde kürzlich als spezifischer Inhibitor der Wechselwirkungen zwischen UNC119A und myristoylierten Peptiden identifiziert.^[238] Deshalb wurde im Rahmen dieser Studie überprüft, ob dieser niedermolekulare Inhibitor auch in der Lage ist, die Effekte von UNC119A auf die Membranbindung von Myr-Src zu inhibieren.

In Abbildung 6.8A und B ist eindeutig zu erkennen, dass Squarunkin A UNC119A bereits bei einem molaren Verhältnis von 1:1 inhibiert, da die Membranbindung von Myr-Src unabhängig von der Lipidzusammensetzung in Gegenwart von dem UNC119A/Squarunkin A-Komplex (1:1) einen ähnlichen Verlauf aufweist wie in Abwesenheit von UNC119A. Für diese Experimente wurden Myr-Src und UNC119A in einem molaren Verhältnis von 1:5 mit unterschiedlichen Mengen an Squarunkin A inkubiert, bevor diese Lösung mit den homogenen und heterogenen Membranen mit konstanter Lipidkonzentration gemischt wurde. Für die Dissoziationsexperimente wurde das an die Donorvesikel gebundene Myr-Src mit dem UNC119A-Protein, das zuvor mit verschiedenen Mengen an Squarunkin A äquilibriert wurde, gemischt. Auch hier ist der inhibierende Effekt von Squarunkin A sichtbar, da die von UNC119A begünstigte Dissoziation von Myr-Src in Anwesenheit des Inhibitors beinahe vollständig verhindert wird (siehe Abb. 6.1C und D). Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass UNC119A durch Squarunkin A in einem molaren Verhältnis von 1:1 inhibiert wird. Aus diesem Grund wurde auf einen größeren Überschuss an Squarunkin A in weiteren Experimenten verzichtet, um zu verhindern, dass der hydrophobe Inhibitor aufgrund der hohen Membranpermeabilität^[238] bei höheren Konzentrationen in die Membran insertiert und die physikalischen Eigenschaften der Membran, wie z.B. die Fluidität, beeinflusst oder sogar die Membranintegrität stört.

Für eine quantitative Auswertung der kinetischen Studie wurden die experimentellen Bedingungen wie zuvor gewählt. Für die Assoziationsexperimente wurden Myr-Src, UNC119A und Squarunkin A in einem molaren Verhältnis von 1:5:5 äquilibriert, bevor die Donorvesikel mit unterschiedlichen Lipidkonzentrationen hinzugegeben wurden. Für die Dissoziationsexperimente wurde ein zehnfacher molarer Überschuss an Akzeptorvesikeln verwendet,

um das Gleichgewicht auf die Seite des von den Donorvesikeln dissoziierten Myr-Src zu verschieben. In Abbildung 6.7A ist zu erkennen, dass die am stärksten beeinflusste Geschwindigkeitskonstante k_{+1} in Gegenwart von Squarunkin A auf $6,2 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ansteigt, was dem k_{+1} -Wert in Abwesenheit von UNC119A sehr stark ähnelt. Infolgedessen nimmt die Bindungsaffinität von Myr-Src sowohl für homogene als auch heterogene Membranen wieder zu, was auf die spezifische Inhibierung von UNC119A durch Squarunkin A zurückgeführt werden kann.

6.4 Zusammenfassung

Die Lokalisation und Anreicherung des myristoylierten c-Src-Proteins an der Plasmamembran ist ein kritischer Parameter für dessen Aktivität und Funktion in der intrazellulären Signaltransduktion. Kürzlich wurde UNC119A als molekularer Chaperon identifiziert, der den intrazellulären Transport, die subzelluläre Verteilung sowie Aktivität von *N*-terminal myristoylierten Proteinen, wie c-Src, reguliert.^[93,94] Durch die spezifische Bindung des Myristoylankers in die hydrophobe Tasche von UNC119A wird der zytosolische Transport der lipidierten Proteine in der Zelle erleichtert. Der molekulare Mechanismus, nach dem UNC119A die Membranbindung des myristoylierten c-Src reguliert, ist jedoch wenig verstanden.

Durch eine umfassende Kinetikstudie wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von UNC119A auf die Membranbindung des *N*-terminal myristoylierten c-Src-Peptids (Myr-Src) erforscht. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Myr-Src an die Membran in einem zweistufigen Prozess erfolgt, der sich aus einem initial konzentrationsabhängigen Assoziationsschritt zweiter Ordnung und einem konzentrationsunabhängigen Schritt erster Ordnung zusammensetzt. Der erste Bindungsschritt umfasst sowohl die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den basischen Aminosäuren in Myr-Src und den negativ geladenen Lipidkopfgruppen als auch die Insertion des Myristoylankers in die Membran. In der langsameren Bindungsphase durchläuft Myr-Src laterale Umlagerungen in der Membranebene, welche wahrscheinlich auf einen effektiven elektrostatischen Lipidsortierungsmechanismus^[134] zurückgeführt werden können. Durch die energetisch ungünstige Kettenlängendifferenz des Myristoylankers und der Alkylketten der umgebenden Phospholipide kann in heterogenen Membranen eine weitere Sortierung der Lipide induziert werden.^[243] Dies resultiert in einem anders organisierten Zustand des membrangebundenen Myr-Src und kann schließlich zur Bildung nanoskopischer Lipid/Peptid-Cluster führen (siehe Abb. 6.9).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass UNC119A in der Lage ist, das myristoylierte c-Src-Peptid an die Membran zu liefern, ohne dabei den membrangebundenen Zustand des Peptids zu beeinflussen. Die Bindung von Myr-Src an die Membran erfolgt in Gegenwart von UNC119A jedoch langsamer als bei der spontanen Membranbindung. Für

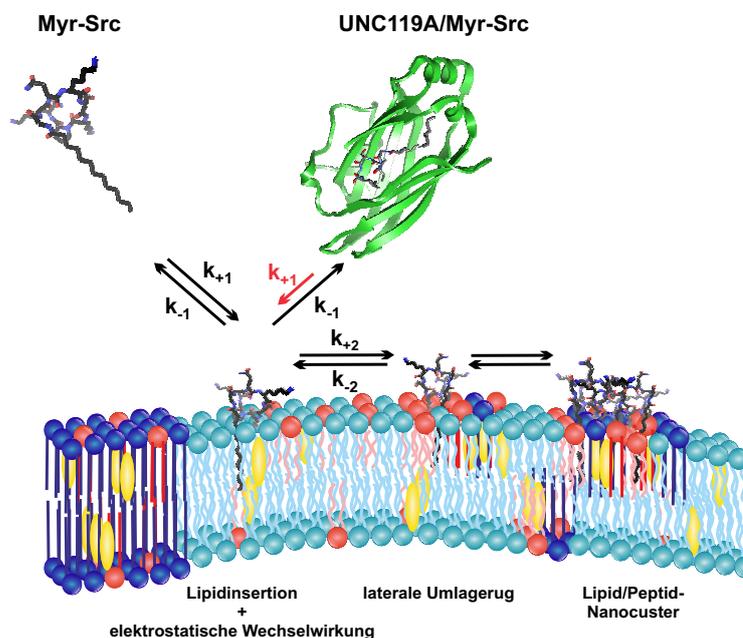


Abb. 6.9: Membranbindungsmechanismus von Myr-Src in An- und Abwesenheit von UNC119A (PDB-ID-Code: 5L7K) mit anionischen *raft*-ähnlichen Membranen (DOPC: hellblau, DPPG: dunkelblau, DOPG, DPPG: rot, Chol: gelb).

einen schnelleren Freisetzungsprozess des myristoylierten Peptids aus dem Komplex mit UNC119A sind wahrscheinlich weitere Proteine, wie Arl2/3,^[235] erforderlich. In Gegenwart von UNC119A ist die Membranbindungsaffinität von Myr-Src wahrscheinlich aufgrund der konkurrierenden Bindung an UNC119A leicht reduziert. Der intervesikuläre Transfer von Myr-Src läuft schneller ab als die durch UNC119A begünstigte Dissoziation von Myr-Src in Abwesenheit von Akzeptorvesikeln. Zudem wird durch UNC119A die Neigung von Myr-Src zur Bildung von Oligomeren auf der Membranoberfläche marginal reduziert. Des Weiteren bestätigte diese Studie, dass Squarunkin A als spezifischer niedermolekularer Inhibitor der Wechselwirkung zwischen UNC119A und dem myristoylierten c-Src-Peptid auch in Gegenwart von Membranen wirksam ist.

Zusammenfassend führen diese Ergebnisse zu einem besseren mechanistischen Verständnis, wie UNC119A die Membranbindung des myristoylierten c-Src-Peptids modulieren kann. Die Lokalisation und Anreicherung von c-Src an der Plasmamembran ist ein kritischer Parameter für dessen Aktivität und die c-Src-vermittelte Signaltransduktion. Wenn das Protein dereguliert ist, kann es zu einer onkogenen Signalgebung kommen. Daher stellen Proteine wie UNC119A, die eine weitere Möglichkeit bieten, c-Src-vermittelte onkogene Signaltransduktionen zu modulieren, potentielle Zielstrukturen für die Krebstherapie dar.

Einfluss molekularer Pinzetten auf virale Modellmembranen*

7.1 Einleitung

Die in Proteinen enthaltenen Lysine spielen eine wichtige Rolle in zahlreichen biologischen Erkennungsprozessen, die u.a. die Genregulation ^[254] modulieren. Darüber hinaus wird Lysin auch in Signalpeptidsequenzen gefunden, die z.B. für die Aggregation und Bildung zellulärer Plaques bei Alzheimererkrankungen verantwortlich sind.^[255] Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, steuern Lysine auch die Membranbindung lipidierter Signalproteine, wie z.B. K-Ras4B und c-Src. In den letzten Jahren haben SCHRADER *et al.* unterschiedliche artifizielle, Lys-spezifische Rezeptormoleküle entwickelt, die gezielt in solche biologischen Prozesse eingreifen können und daher als neue potentielle Pharmazeutika in den Fokus der Forschung gerückt sind.^[256] Einer der vielversprechendsten Lys-spezifischen Rezeptormoleküle ist die molekulare Pinzette (*tweezer*) CLR01, die einen elektronenreichen, torusförmigen Hohlraum mit zwei peripheren anionischen Phosphatgruppen am Benzol-Spacer besitzt (siehe Abb. 7.1A). Durch eine Kombination aus VAN DER WAALS-Wechselwirkungen und elektrostatischen Interaktionen bindet CLR01 Lys-Reste mit einer hohen Affinität ($K_d \sim 10 \mu\text{M}$). Die Kohlenwasserstoffkette der Lys-Seitenkette wird dabei in den hydrophoben Hohlraum aufgenommen, wohingegen die protonierte ϵ -Aminogruppe des Lys mit den anionischen Phosphatgruppen von CLR01 interagiert (siehe Abb. 7.1B).^[256] Auf diese Weise kann CLR01 die Fibrillenbildung zahlreicher amyloidogener Proteine inhibieren, die häufig im Zusammenhang mit Krankheiten stehen, wie z.B. A β ,^[257] Insel-Amyloid-Polypeptid^[258] und α -Synuclein.^[259] Über einen Zeitraum von einigen Tagen konnte CLR01 auch die vorgeformten Fibrillen amyloidogener Proteine zerstören.^[257,259]

*Die Ergebnisse dieser Studie wurden teilweise in der Ref. [253] veröffentlicht und werden teilweise in diesem Kapitel wiedergegeben. From Ref. [253] - Reprinted with permission from eLife under the Creative Commons Attribution License.

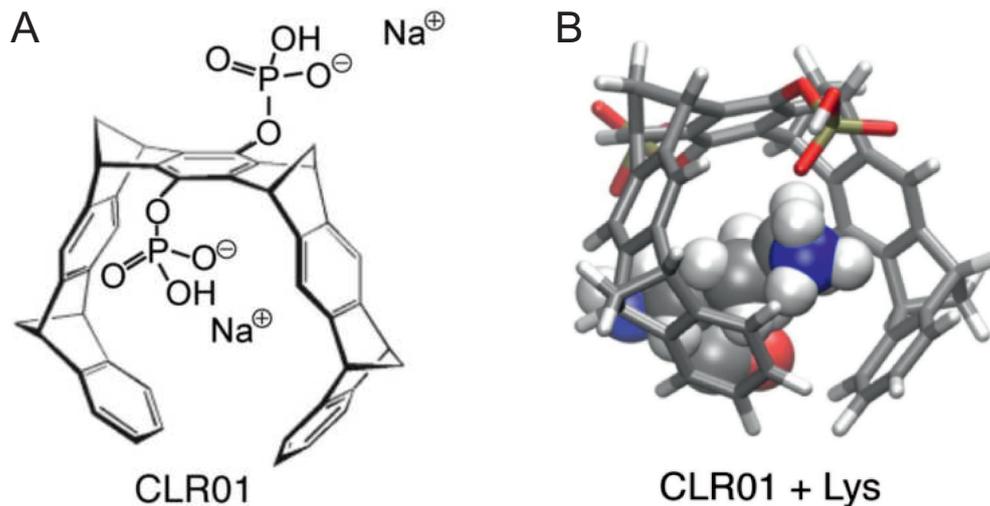


Abb. 7.1: Chemische Struktur der molekularen Pinzette CLR01 (A). CLR01 im Komplex mit einem Lys (B). Reprinted from E. Lump, L. M. Castellano, C. Meier, J. Seeliger, N. Erwin, B. Sperlich, C. M. Stürzel, S. Usmani, R. M. Hammond, J. Von Einem, *et al.*, *elife* 2015, 4, e05397 - with permission from eLife under the Creative Commons Attribution License.

In einer Studie in Kooperation mit Prof. Dr. Jan Münch und Prof. Dr. Thomas Schrader konnte gezeigt werden, dass CLR01 auch die Fibrillenbildung der amyloidogenen SAP- und PAP-Peptide, die im menschlichen Samen vorkommen und eine HIV-verstärkende Wirkung besitzen, hemmt und die Form bereits gebildeter Fibrillen dieser Peptide beeinflusst.^[253] Aufgrund der hohen positiven Ladungsdichte dieser Fibrillen wird die Bindung der HIV-Virionen an die Zielzellen und deren Fusion begünstigt.^[260] Bemerkenswerterweise konnte in dieser Studie ebenfalls gezeigt werden, dass CLR01 in der Lage ist, die Struktur der HIV-Virionen zu zerstören, was zu der Annahme führte, dass CLR01 an der Zerstörung der viralen Membranhülle beteiligt ist.^[253] Um dies zu überprüfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Effekt von CLR01 auf virale Modellmembranen mithilfe von fluoreszenzmikroskopischen Assays untersucht.

7.2 Material & Methoden

7.2.1 Material

Die in dieser Studie verwendeten Chemikalien und Lipide sowie ihre Bezugsquellen sind in Tabelle 7.1 zusammengetragen.

Tab. 7.1: Bezugsquellen der Chemikalien und Lipide für die strukturelle Untersuchung der viralen Modellmembranen in Anwesenheit von molekularen Pinzetten.

Chemikalien und Lipide	Bezugsquelle
Atto 647	ATTO-TEC (Siegen, Deutschland)
BODIPY-Chol	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Chloroform	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Cholesterol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DOPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
<i>N</i> -Rh-DHPE	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
SM	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)

7.2.2 Elektroformation

Die in Pulverform erhaltenen Lipide wurden zunächst in Chloroform gelöst ($c = 10 \text{ mg/mL}$). Die Lipide für die reine DOPC-Membran wurden mit 0,2 mol% *N*-Rh-DHPE ($c = 100 \text{ }\mu\text{M}$ in MeOH) versetzt, wohingegen zu den Lipiden für die virale Modellmembran mit l_d/l_o -Phasenkoexistenz aus DOPC/SM/Chol (45:25:30 mol%) zusätzlich 0,1 mol% BODIPY-Chol ($c = 100 \text{ }\mu\text{M}$ in MeOH) hinzugegeben wurden. Die Lipidfilme wurden analog zu Abschnitt 4.2.6.1 auf die ITO-Deckgläser aufgebracht, getrocknet und in die Probenkammer eingebaut. Danach wurden die Lipide mit einem Puffer, der 10 mM NaH₂PO₄ (pH = 7,6) und 5-10 mM des wasserlöslichen Fluorophors Atto 647 enthielt, hydratisiert. Die Elektroformation von reinem DOPC wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, wohingegen die der DOPC/SM/Chol-Lipidmischung bei 60 °C erfolgte. An beide Proben wurde eine sinusförmige Wechselspannung mit einer Frequenz von 500 Hz angelegt, wobei die Spannung wie folgt variiert wurde: 100 mV für 10 min, 1 V für 20 min, 1,6 V für 2,5 h. Im Anschluss wurde die Probenkammer ggf. auf Raumtemperatur abgekühlt und vorsichtig mit NaH₂PO₄ (10 mM, pH = 7,6) Puffer gespült, um das wasserlösliche Atto 647, das nicht im Inneren der Vesikel eingeschlossen war, zu entfernen.

7.2.3 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der GUVs wurden analog zu Abschnitt 4.2.8 am konfokalen Laser-Scanning-System (MRC 1024, Bio-Rad Laboratories) durchgeführt, das über einen Seitenport mit einem inversen Mikroskop (Eclipse TE-300DV, Nikon, Tokio, Japan) verbunden war. Die Anregung von BODIPY-Chol, *N*-Rh-DHPE und Atto 647 erfolgte sequentiell bei 488 nm, 568 nm und 647 nm unter Verwendung eines Kr/Ar-Lasers (Dynamic Laser, Salt Lake City, USA). Die emittierten Fluoreszenzsignale wurden in drei verschiedenen PMT-Kanälen detektiert (Emissionsbandpassfilter 522 nm/35 nm FWHM, 580 nm/32 nm FWHM und 680 nm/32 nm FWHM). Das Programm ImageJ^[144] wurde benutzt, um eine Hintergrundkorrektur und Kontrasterhöhung in den aufgenommen Bildern vorzunehmen. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten direkt in den Probenkammern. Sobald eine Region für die Aufnahme der GUVs gefunden wurde, wurden etwa 500 μL der molekularen Pinzette oder deren Derivate ($c = 150 \mu\text{M}$ in 10 mM NaH_2PO_4 (pH = 7,6)) zu den GUVs in die Probenkammer gegeben.

7.3 Ergebnisse & Diskussion

7.3.1 Molekulare Pinzetten

Die molekulare Pinzetten und Derivate davon wurden von Prof. Dr. Thomas Schrader (Lehrstuhl für Organische Chemie, Uni Duisburg-Essen) für diese Studie zur Verfügung gestellt.

Im Vergleich zu zellulären Membranen enthalten virale Membranhüllen einen zwei- bis dreifach erhöhten Anteil an SM und Chol, was zur Bildung von *raft*-ähnlichen Domänen führen kann.^[261-263] Um zu überprüfen, ob CLR01 selektiv Membranen mit einem hohen SM- und Chol-Gehalt zerstört, wurden fluoreszenzmikroskopische Assays durchgeführt, bei denen fluoreszierender Puffer in den GUVs eingeschlossen wird, der bei Verlust der Membranintegrität austritt. Für diesen Zweck wurden GUVs aus DOPC/SM/Chol (45:25:30 mol%) und reinem DOPC als Kontrolle hergestellt, die im Inneren der Lipiddoppelschicht den wasserlöslichen Fluorophor Atto 647 enthielten (siehe Abb. 7.2). Zur Visualisierung der Phasenkoexistenz der SM- und Chol-angereicherten Membran wurden die fluoreszierenden Lipide *N*-Rh-DHPE und BODIPY-Chol, die bevorzugt in der l_d - bzw. l_o -Phase der Membran lokalisiert sind, verwendet. Die reine DOPC-Membran wurde hingegen nur mit *N*-Rh-DHPE markiert. Wie in Abbildung 7.2A-C zu sehen ist, kommt es in der virenähnlichen Modellmembran bereits 5 min nach Zugabe der molekularen Pinzette zum Austritt des fluoreszierenden Puffers, sodass die GUVs nach 10 min keinen Farbstoff im Inneren enthalten. Die Ursache liegt in der beobachteten Ausstülpung und Abschnürung der l_o -Phase begründet, da hierbei die Membranintegrität gestört wird, wodurch der

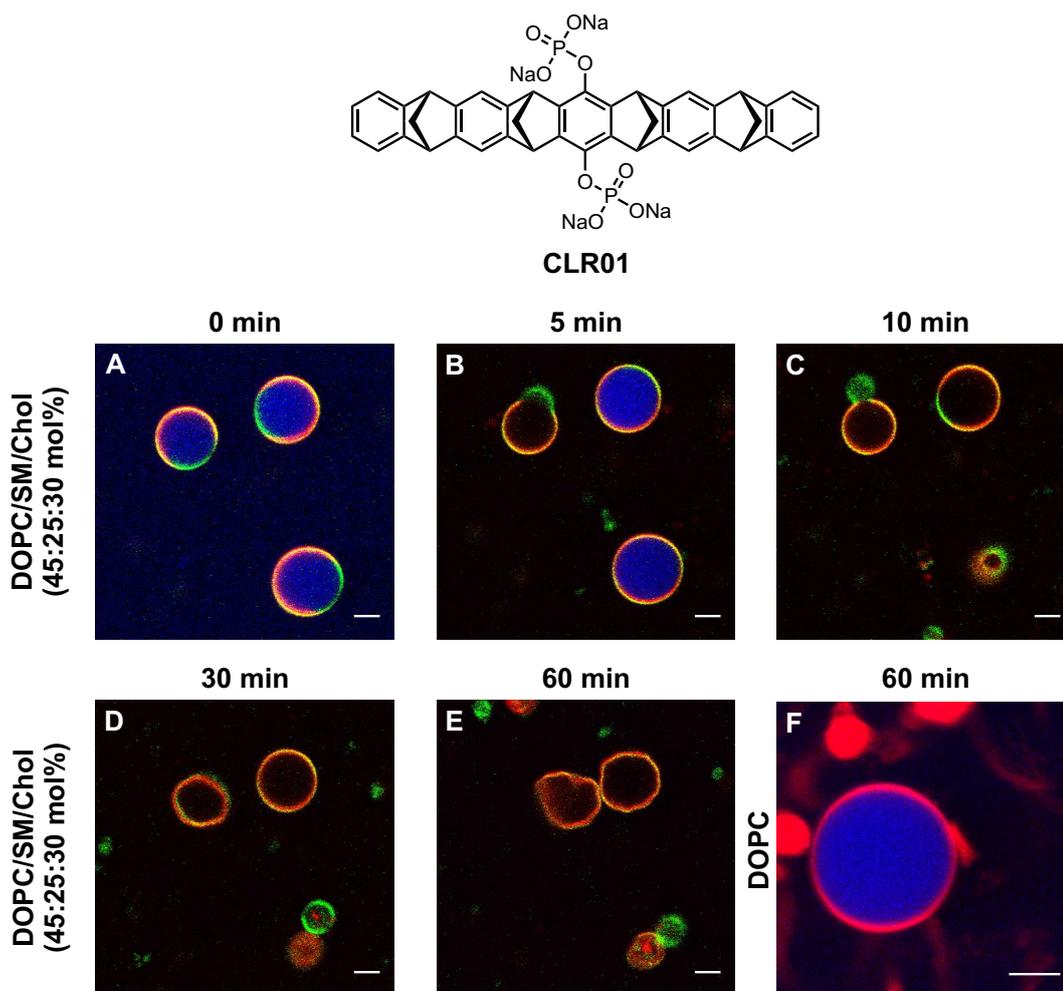


Abb. 7.2: Fluoreszenzmikroskopischer Assay mit CLR01 unter Verwendung von GUVs aus DOPC/SM/Chol (45:25:30 mol%) (A-E) und DOPC (F) als Kontrolle. Die GUVs aus reinem DOPC sind mit *N*-Rh-DHPE (0,2 mol%) markiert und die l_d - und l_o -Phase der *raft*-ähnlichen Membran sind jeweils mit *N*-Rh-DHPE (0,2 mol%, rot) und BODIPY-Chol (0,1 mol%, grün) sichtbar gemacht. Im Inneren der GUVs beider Membransysteme ist der wasserlösliche Fluorophor Atto 647 enthalten (blau). Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten zu den angegebenen Zeitpunkten der Zugabe von CLR01 ($c = 150 \mu\text{M}$). Der Maßstab beträgt $5 \mu\text{m}$ in allen Bildern. Adapted from E. Lump, L. M. Castellano, C. Meier, J. Seeliger, N. Erwin, B. Sperlich, C. M. Stürzel, S. Usmani, R. M. Hammond, J. Von Einem, *et al.*, *eLife* 2015, 4, e05397 - with permission from eLife under the Creative Commons Attribution License.

Austritt des fluoreszierenden Puffers ermöglicht wird. Der Prozess der Membranausstülpung und -abschnürung einer Domäne in Membranen mit l_d/l_o -Phasenkoexistenz, auch als *budding* bekannt, ist häufig auf eine hohe Linienspannung γ , die auf den Domänenumfang normierte Grenzflächenenergie, an der l_d/l_o -Lipidphasengrenze zurückzuführen. Wenn die Grenzflächenenergie E_{Grenze} die Biegeenergie E_{Biege} der Membran übersteigt, stülpen sich die Domänen aus und werden abgeschnürt.^[264,265] Nach dem Modell von LIPOWSKY *et al.* kann die Energie einer ausstülpenden Domäne E_{Bud} als Funktion der Membrankrümmung C folgendermaßen beschrieben werden:^[266]

$$E_{\text{Bud}} = E_{\text{Biege}} + E_{\text{Grenze}} = 2\pi\kappa_B(LC - LC_0)^2 + 2\pi L\gamma\sqrt{1 - (LC/2)^2} \quad (7.1)$$

Dabei ist C_0 die spontane Krümmung der Membran, κ_B der Biegemodul der Membran und L der Radius der runden und flachen Domäne.

Anhand der Abbildung 7.2 ist zu erkennen, dass die GUVs zum Teil durch CLR01 zerstört werden. Die verbliebenen GUVs weisen keine klaren Phasengrenzen mehr auf und sind stark deformiert (siehe Abb. 7.2E). Im Gegensatz dazu zeigt CLR01 auch nach einer 60-minütigen Inkubationszeit keine Wirkung auf die homogene DOPC-Membran (siehe Abb. 7.2F) Komplementäre hochauflösende AFM-Messungen (durchgeführt von Benjamin Sperlich, Doktorand am Lehrstuhl Physikalische Chemie I, TU Dortmund) bestätigen diese Ergebnisse. Dabei ist deutlich zu sehen, dass CLR01 homogen auf der Oberfläche der DOPC-Membran verteilt ist, ohne die laterale Organisation der Lipiddoppelschicht zu beeinflussen. Dahingegen führt die Zugabe der molekularen Pinzette zum Verlust der l_d/l_o -Phasenkoexistenz in der virenähnlichen Modellmembran.^[253] Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass CLR01 selektiv starke Deformationen in *raft*-ähnlichen Membranen induziert, die zum Teil zur Zerstörung der GUVs führen.

Diese fluoreszenzmikroskopischen Assays wurden mit Derivaten von CLR01 durchgeführt, um Einblicke in den Mechanismus, nach dem CLR01 mit diesen *raft*-ähnlichen Membranen interagiert, zu erhalten. Wie in Abbildung 7.3 zu erkennen ist, fehlen dem Derivat CLR03 die hydrophoben Seitenwände. Infolgedessen bindet CLR03 nicht an Lys-Reste und zeigt keine inhibierende Wirkung auf die Fibrillenbildung amyloidogener Peptide.^[253,257] Interessanterweise verdeutlichen die fluoreszenzmikroskopischen Experimente (siehe Abb. 7.3), dass dieses Derivat auch keinen Effekt auf die verwendeten Modellmembranen hat. Über den gemessenen Zeitraum von 60 min kann kein sichtbarer Austritt des fluoreszierenden Puffers oder eine Änderung der Membranstruktur beobachtet werden. Dies deutet daraufhin, dass die hydrophoben Seitenwände maßgeblich zur Deformation und Zerstörung phasenseparierter Membranen beitragen.

Das Derivat CLR05 hingegen besitzt den gleichen hydrophoben, torusförmigen Hohlraum wie CLR01, aber die peripheren Phosphatsubstituenten sind durch Methylen-carboxylatgruppen ersetzt (siehe Abb. 7.4). Dieser Substituentenaustausch führt dazu, dass CLR05 Lys-Reste mit einer geringeren Affinität bindet ($K_d \sim 643 \mu\text{M}$) als CLR01.^[267] Wie in Abbildung 7.4 zu sehen ist, stülpen sich die l_o -Lipiddomänen nach Zugabe von CLR05 aus, wobei die meisten nach 15 min abgeschnürt sind. Gleichzeitig tritt der Fluorophor Atto 647 aus dem Inneren der GUVs aus (siehe Abb. 7.4A-C). Dieser *budding*-Prozess resultiert vermutlich aus einer erhöhten Linienspannung an den l_d/l_o -Phasengrenzflächen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min enthalten die GUVs keinen fluoreszierenden Puffer mehr und bei einigen Vesikeln können die ausgestülpten l_o -Domänen noch beobachtet werden (siehe Abb. 7.4D-E und A.7). Im Gegensatz zu CLR01 verursacht CLR05 keine vollständige Zerstörung der Membranstruktur nach der Abschnürung der l_o -Lipiddomäne. Ähnlich wie CLR01 hat CLR05 keinen Einfluss auf die DOPC-Membran, da selbst nach einer 60-minütigen Inkubation weder eine Änderung der Membranstruktur noch ein Austritt des

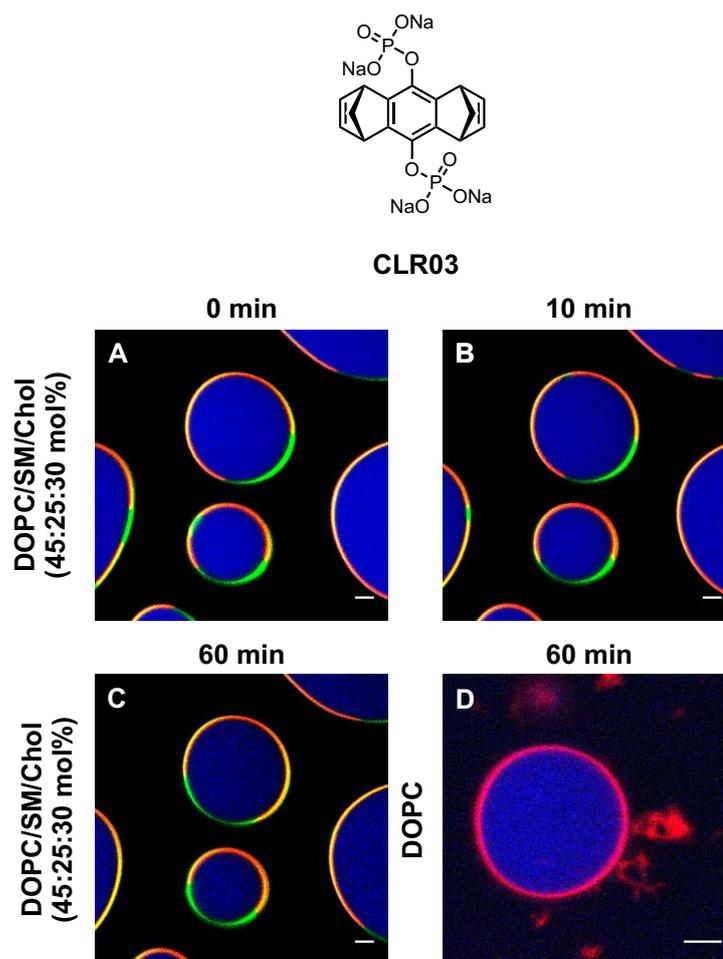


Abb. 7.3: Fluoreszenzmikroskopischer Assay mit CLR03 unter Verwendung von GUVs aus DOPC/SM/Chol (45:25:30 mol%) (A-E) und DOPC (F) als Kontrolle. Die GUVs aus reinem DOPC sind mit *N*-Rh-DHPE (0,2 mol%) markiert und die l_d - und l_o -Phase der *raft*-ähnlichen Membran sind jeweils mit *N*-Rh-DHPE (0,2 mol%, rot) und BODIPY-Chol (0,1 mol%, grün) sichtbar gemacht. Im Inneren der GUVs beider Membransysteme ist der wasserlösliche Fluorophor Atto 647 enthalten (blau). Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten zu den angegebenen Zeitpunkten der Zugabe von CLR03 ($c = 150 \mu\text{M}$). Der Maßstab beträgt $5 \mu\text{m}$ in allen Bildern.

Fluorophors Atto 647 zu erkennen ist (siehe Abb. 7.4F). Komplementäre AFM-Messungen (durchgeführt von Dr. Mridula Dwivedi, Postdoktorandin am Lehrstuhl PC I, TU Dortmund) bestätigen, dass die Linienspannung an der Phasengrenzfläche in Gegenwart von CLR05 erhöht wird, was sich aus der Zunahme der Höhendifferenz zwischen der l_d - und l_o -Lipiddomäne ableiten lässt (unveröffentlicht).^[158] Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass vorwiegend der hydrophobe, torusförmige Hohlraum der molekularen Pinzetten die beobachteten Änderungen der Membranstruktur verursacht. Da die Zugabe von CLR01 im Gegensatz zu CLR05 in einer Zerstörung der Membran resultiert, scheinen die anionischen Substituenten die Effektivität der Pinzetten zu beeinflussen. MD-Simulationen von CLR01 und CLR05 mit Modellmembranen zeigen, dass die molekularen Pinzetten die Phosphocholin-Kopfgruppen von DOPC und SM in den hydrophoben Hohlraum aufnehmen können (unveröffentlicht). Die geringere Effektivität von CLR05 könnte möglicherweise eine Folge der geringeren Affinität für diese Kopfgruppe sein.

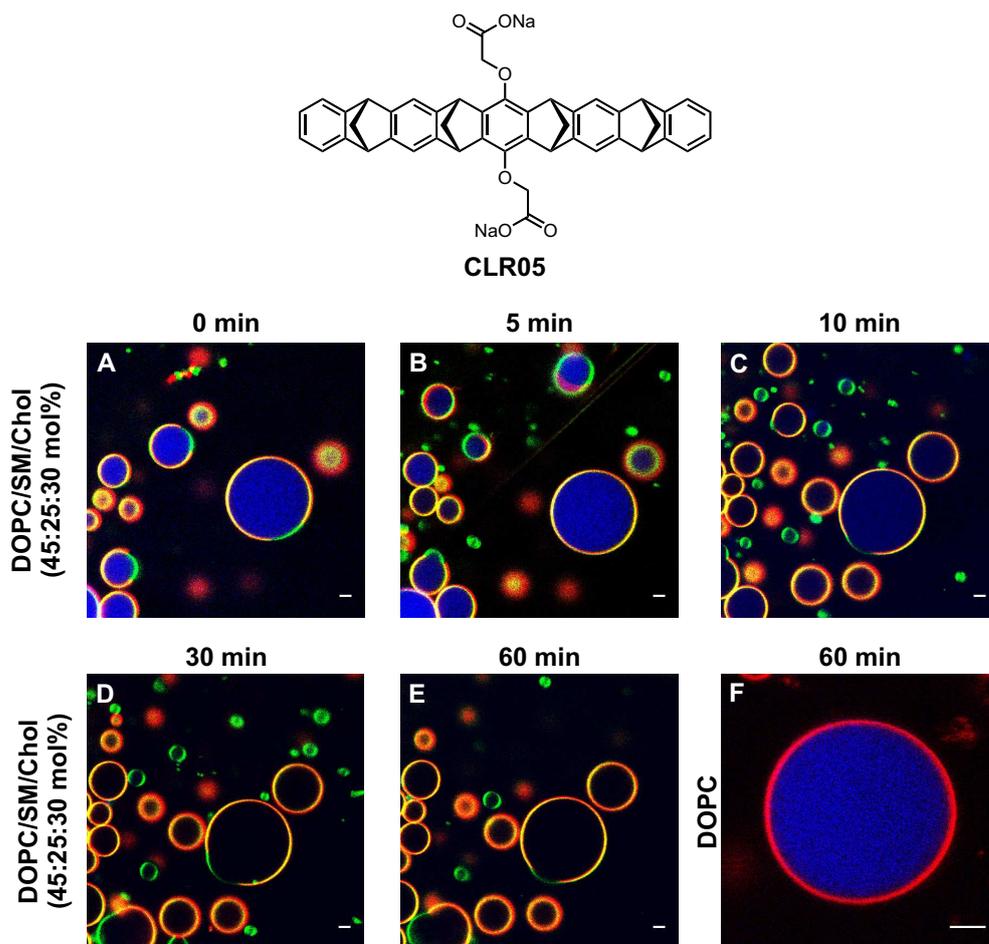


Abb. 7.4: Fluoreszenzmikroskopischer Assay mit CLR05 unter Verwendung von GUVs aus DOPC/SM/Chol (45:25:30 mol%) (A-E) und DOPC (F) als Kontrolle. Die GUVs aus reinem DOPC sind mit *N*-Rh-DHPE (0,2 mol%) markiert und die l_d - und l_o -Phase der *raft*-ähnlichen Membran sind jeweils mit *N*-Rh-DHPE (0,2 mol%, rot) und BODIPY-Chol (0,1 mol%, grün) sichtbar gemacht. Im Inneren der GUVs beider Membransysteme ist der wasserlösliche Fluorophor Atto 647 enthalten (blau). Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten zu den angegebenen Zeitpunkten der Zugabe von CLR05 ($c = 150 \mu\text{M}$). Der Maßstab beträgt $5 \mu\text{m}$ in allen Bildern.

Da die molekularen Pinzetten nur an die zugänglichen Lipidkopfgruppen in der äußeren Lipidschicht der GUVs binden, kann in der dicht gepackten l_o -Phase durch den erhöhten Platzbedarf der von den molekularen Pinzetten umgebenen Kopfgruppen eine positive Krümmung in der Membran erzeugt werden. In Kombination mit der hohen energetisch ungünstigen Linienspannung an der Phasengrenzfläche verursacht diese Krümmung eine Ausstülpung und Abschnürung der l_o -Domänen. Solch ein *budding*-Prozess konnte auch bei einer asymmetrischen Verteilung von Sterolen^[268] in einer Membran mit Phasenkoexistenzen oder bei der Einlagerung von Detergenzien^[269] in die äußere Lipiddoppelschicht einer phasenseparierten Membran beobachtet werden. Die Abschnürung der Lipiddomäne geht dabei mit einer Störung der Membranintegrität einher, was das Austreten des fluoreszierenden Puffers in den fluoreszenzmikroskopischen Messungen erklärt. Dahingegen wird die weniger dicht gepackte DOPC-Membran bei der Bindung der molekularen Pinzetten nicht deformiert. Dies zeigt, dass die Lipidzusammensetzung und die damit

einhergehenden chemisch-physikalischen Eigenschaften der Membran wichtige Parameter für die Deformation der Membranstruktur sind.

Die Struktur und mechanischen Eigenschaften der viralen Membranhüllen werden zusätzlich durch ihre komplexere Lipidzusammensetzung und Interaktionen mit den enthaltenen Membranproteinen beeinflusst. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Membran von sphärischen Influenza-Virionen im Vergleich zu Vesikeln, die aus PC-haltigen Lipiden und Cholesterol bestehen, eine höhere Steifheit aufweist, was auf die Interaktionen zwischen der Lipiddoppelschicht und den Proteinen zurückgeführt werden konnte.^[270] Daher kann der mechanische Stress in den viralen Membranhüllen, der durch die Bindung der sperrigen molekularen Pinzetten an die Lipidkopfgruppen induziert wird, die Zerstörung der Lipiddoppelschicht verursachen. Dieser vorgeschlagene Mechanismus liefert eine mögliche Erklärung für die beobachtete antivirale Wirksamkeit von CLR01. Aufgrund dieser Eigenschaften stellen die molekularen Pinzetten vielversprechende Wirkstoffkandidaten für die Entwicklung von antiviralen Therapien dar.

7.3.2 Molekulare Phosphatklammer

Die molekulare Phosphatklammer (*phosphate clip*) weist zwei gegenüberliegende Naphthalin-Ringsysteme auf, die durch einen starr substituierten Benzol-Spacer voneinander getrennt sind (siehe Abb. 7.5).^[271,272] Die Zugabe dieser molekularen Phosphatklammer verursacht nur einen geringfügigen Austritt des Atto 647-enthaltenden Puffers aus dem Inneren der GUVs im gemessenen Zeitraum von 60 min, wie in Abbildung 7.5 beobachtet werden kann. Während die Phosphatklammer auf die Membran aus reinem DOPC keinen Effekt hat (siehe Abb. 7.5D), induziert diese eine negative Krümmung an den Phasengrenzen der virenähnlichen Modellmembran (siehe Abb. 7.5C). Komplementäre AFM-Messungen (durchgeführt von Dr. Mridula Dwivedi, Postdoktorandin am Lehrstuhl PC I, TU Dortmund) bestätigen, dass die molekulare Klammer keine sichtbare strukturelle Änderung in der phasenseparierten Membran induziert, dennoch nahm die Höhendifferenz zwischen der l_d - und l_o -Phase zu (unveröffentlicht). In früheren Studien wurde berichtet, dass die molekulare Phosphatklammer im Gegensatz zu den Pinzetten keine Lys-Reste bindet, sondern bevorzugt planare elektronenarme Aromaten, wie z.B. $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$, aufnimmt.^[271,272] Dabei sind die Benzolringe der Liganden parallel zu den Naphthalin-Seitenwänden der Klammer positioniert.^[273] Dies führt zu der Annahme, dass die Phosphatklammer vermutlich nicht oder nur mit einer sehr geringen Affinität an die Phosphocholin-Kopfgruppen der Lipide bindet und demnach einem anderen Bindungsmechanismus folgt.

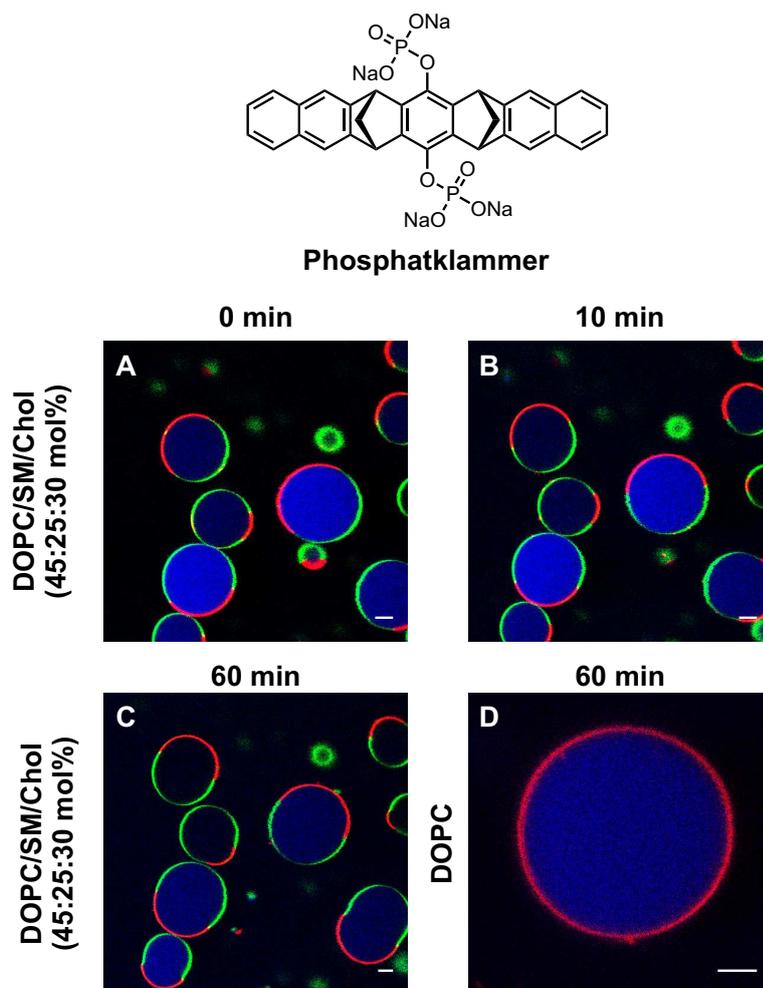


Abb. 7.5: Fluoreszenzmikroskopischer Assay mit der molekularen Phosphatklammer unter Verwendung von GUVs aus DOPC/SM/Chol (45:25:30 mol%) (A-E) und DOPC (F) als Kontrolle. Die GUVs aus reinem DOPC sind mit *N*-Rh-DHPE (0,2 mol%) markiert und die l_d - und l_o -Phase der *raft*-ähnlichen Membran sind jeweils mit *N*-Rh-DHPE (0,2 mol%, rot) und BODIPY-Chol (0,1 mol%, grün) sichtbar gemacht. Im Inneren der GUVs beider Membransysteme ist der wasserlösliche Fluorophor Atto 647 enthalten (blau). Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten zu den angegebenen Zeitpunkten der Zugabe von der molekularen Phosphatklammer ($c = 150 \mu\text{M}$). Der Maßstab beträgt $5 \mu\text{m}$ in allen Bildern.

7.4 Zusammenfassung

Die molekulare Pinzette CLR01 bindet spezifisch Lys-Reste in Proteinen sowie Peptiden und kann auf diese Weise z.B. die Fibrillenbildung amyloidogener Proteine, die häufig im Zusammenhang mit Krankheiten gebracht werden, verhindern. In einer Kooperationsstudie konnte gezeigt werden, dass CLR01 auch in der Lage ist, die Struktur von HIV-Virionen zu zerstören. Um zu überprüfen, ob CLR01 an der Zerstörung der viralen Membranhülle beteiligt ist, wurden im Rahmen dieser Studie fluoreszenzmikroskopische Assays mit Modellmembranen, die die Lipidzusammensetzung viraler Membranhüllen nachahmen, in Anwesenheit von CLR01 durchgeführt. Zusätzlich wurden die Effekte weiterer molekularer Pinzetten sowie einer Phosphatklammer auf die virale Modellmembran untersucht. Aufgrund des erhöhten SM- und Chol-Anteils in Virenmembranen im Vergleich

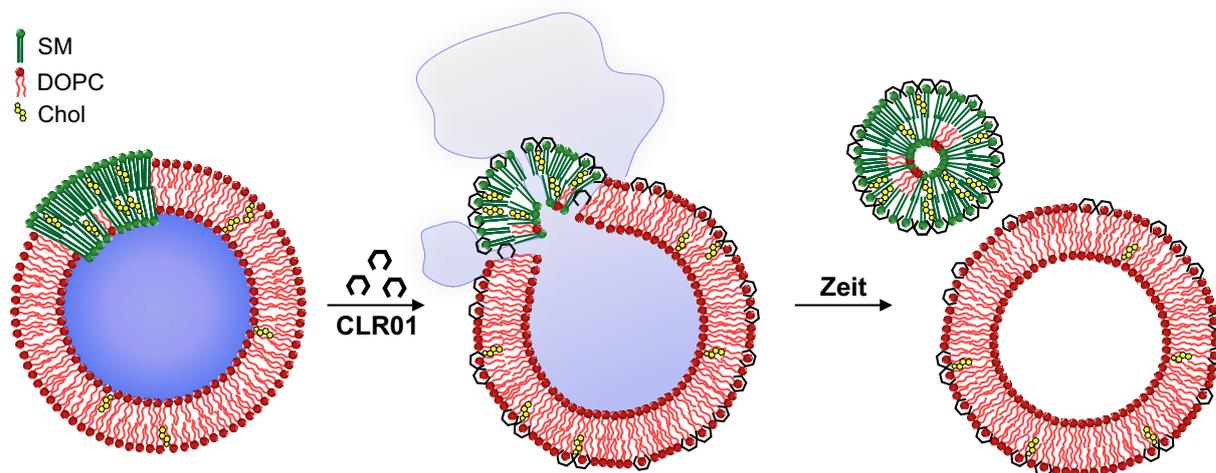


Abb. 7.6: Deformation viraler, *raft*-ähnlicher Modellmembranen durch die molekulare Pinzette CLR01.

zur zellulären Membran wurde die Lipidmischung DOPC/SM/Chol (45:25:30 mol%) als virale Modellmembran verwendet, die bei den gegebenen experimentellen Bedingungen eine l_d/l_o -Phasenkoexistenz aufweist. Mithilfe der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte eindeutig gezeigt werden, dass CLR01 die Abschnürung der l_o -Domänen in der viralen Modellmembran verursacht, die zu einer Deformation und teilweisen Zerstörung der Membranstruktur führt. Der torusförmige Hohlraum spielt dabei eine entscheidende Rolle, da CLR03, dem die hydrophoben Seitenwände fehlen, keine sichtbaren Auswirkungen auf dieses Membransystem hat. Die anionischen Substituenten am starren Benzol-Spacer steuern hingegen die Effektivität der molekularen Pinzette. Im Vergleich zu CLR01 wird die virale Modellmembran nach der durch CLR05 induzierten Abspaltung der l_o -Domänen nicht weiter zerstört. Dies könnte an den Methylencarboxylatgruppen in CLR05 liegen, die im Vergleich zu den Phosphatgruppen in CLR01 vermutlich eine geringere Affinität zu den Phosphocholin-Kopfgruppen in DOPC und SM haben. Basierend auf diesen Ergebnissen kann ein Mechanismus für den durch die molekularen Pinzetten induzierten *budding*-Prozess vorgeschlagen werden (siehe Abb. 7.6). Da diese nur an die zugänglichen Lipidkopfgruppen in der äußeren Lipidschicht der GUVs binden, kann in der dicht gepackten l_o -Phase durch den erhöhten Platzbedarf der von den molekularen Pinzetten umgebenen Kopfgruppen eine positive Krümmung in der Membran erzeugt werden. In Kombination mit der hohen energetisch ungünstigen Linienspannung an der Phasengrenzfläche verursacht diese Krümmung eine Ausstülpung und Abschnürung der l_o -Domänen. Die Abschnürung dieser Lipiddomäne geht mit einer Störung der Membranintegrität einher, was das Auslaufen des fluoreszierenden Puffers in den fluoreszenzmikroskopischen Messungen erklärt. Die Struktur und mechanischen Eigenschaften der viralen Membranhüllen werden zusätzlich durch ihre komplexe Lipidzusammensetzung und Interaktionen mit ihren dicht gepackten Membranproteinen beeinflusst. Daher kann der mechanische Stress in den viralen Membranhüllen, der durch die Bindung der sperrigen molekularen Pinzetten an die Lipidkopfgruppen induziert wird, zur Zerstörung der Lipiddoppelschicht führen.

Entwicklung und Bau einer Hochdruckzelle für die Mikroskopie

8.1 Einleitung

Druck stellt neben der Temperatur einen wichtigen thermodynamischen Parameter dar, um z.B. strukturelle und dynamische Änderungen biologischer Systeme zu studieren.^[191] Nach dem Prinzip des kleinsten Zwanges von LE CHÂTELIER wird jede Zustandsänderung, die mit einer Volumenreduktion einhergeht, durch hohe Drücke begünstigt.

Wie bereits in Abschnitt 5.1 erwähnt, ist die druckinduzierte Volumenabnahme bei Proteinen vorwiegend in dem Verlust von Hohlräumen, die durch Packungsdefekte in dem nativ gefalteten Protein entstehen, begründet. Außerdem trägt die Elektrostriktion aufgebrochener Salzbrücken und polarer AS-Seitenketten zur Reduktion des Volumens bei höheren Drücken bei.^[190,191] Des Weiteren lassen sich durch Druckanwendungen die intermolekularen Wechselwirkungen modulieren, indem z.B. Wasserstoffbrückenbindungen verstärkt und hydrophobe Wechselwirkungen destabilisiert werden. Kovalente Bindungen werden hingegen erst bei Drücken jenseits von 2 GPa gebrochen. Basierend auf diesen druckinduzierten Effekten konnte gezeigt werden, dass einige Proteine bei hohen Drücken denaturieren,^[215] während bei anderen Proteinen energetisch höher liegende Konformationszustände stabilisiert werden können.^[161,188,193,194] Darüber hinaus können auch Assemblierungsreaktionen von monomeren Proteinen durch Druckanwendung verlangsamt werden, wie z.B. die Bildung von Aktinfibrillen.^[274]

Interessanterweise scheint die biologische Membran eine der drucksensitivsten zellulären Komponenten zu sein.^[275,276] Druckanwendungen haben erhebliche Auswirkungen auf die Struktur und das Phasenverhalten von lyotropen Lipidmesophasen, Modellmembranen und natürlichen Membransystemen. Bei der hydrostatischen Kompression einer Lipiddoppelschicht wird im Allgemeinen eine Abnahme der Querschnittsfläche der Lipidmoleküle

beobachtet, was mit einer Zunahme der Membrandicke und einer erhöhten Konformationsordnung der Lipidalkylketten (gestreckte *all-trans*-Konformation) einhergeht.^[277] Mit zunehmendem Druck wird in Lipiddoppelschichten folglich ein Phasenübergang zu geordneteren Lipidphasen induziert.^[276,278]

Druck ist nicht nur ein wichtiger Parameter zur Untersuchung von Strukturumwandlungen und der Kinetik biologischer Systeme und Prozesse, sondern hat außerdem eine direkte biologische Bedeutung, denn über 70 % der Erdoberfläche sind von Ozeanen und Gewässern bedeckt, in denen ein durchschnittlicher Druck von ca. 38 MPa herrscht. Trotz der tiefen Temperaturen und hohen Drücke bieten die Ozeane zahlreichen Organismen einen Lebensraum. Tatsächlich wurde in den letzten Jahren Leben in immer extremeren Meeresbedingungen entdeckt. Der tiefste Punkt des Marianengrabens liegt etwa 11 km unter dem Meeresspiegel, wo ein Druck von etwa 110 MPa herrscht.^[275,279,280] Die Anpassungsmechanismen von Organismen auf diese extremen Bedingungen sind jedoch noch weitestgehend unbekannt.

Der Einsatz von Druck findet außerdem vermehrt in der Lebensmittelindustrie und pharmazeutischen Industrie zur Inaktivierung von Mikroorganismen Gebrauch, da bei der Druckbehandlung im Vergleich zur thermischen Behandlung nur wenige unerwünschte chemische Reaktionen auftreten und der Nährstoffgehalt sowie der Geschmack der Lebensmittel erhalten bleibt.^[281,282]

Hochdruckuntersuchungen erfordern in der Regel spezielle Druckzellen, die in den letzten Jahren für fast alle spektroskopischen, mikroskopischen und Streumethoden entwickelt worden sind, jedoch nur bedingt kommerziell erhältlich sind. Bisher wurden einige Versuche unternommen, Hochdruckzellen für die Mikroskopie zu entwickeln,^[132,283–287] welche die Visualisierung von Hochdruckeffekten auf biologische Systeme ermöglichen. Eine große Herausforderung bei der Entwicklung und beim Bau einer Hochdruckzelle für die Mikroskopie stellt neben der Druckstabilität der Zelle die optische Auflösung und Qualität der aufgenommenen Bilder dar. Für eine hohe Auflösung muss ein möglichst kleiner Abstand zwischen der Objektivlinse und der Probe gewährleistet werden. Im Allgemeinen nimmt der Arbeitsabstand eines Objektivs mit zunehmender Vergrößerung ab.

Basierend auf der von BROOKS *et. al* entwickelten Hochdruckzelle^[287] sollte im Rahmen dieser Arbeit eine temperierbare Hochdruckzelle für die Mikroskopie gebaut und etabliert werden.

8.2 Material & Methoden

8.2.1 Material

Die Chemikalien und Lipide, die für die Präparation der in den Hochdruckstudien untersuchten Proben verwendet wurden, sind in Tabelle 8.1 zusammengefasst.

Tab. 8.1: Bezugsquellen der Chemikalien und Lipide für die Präparation der in den Hochdruckstudien untersuchten Proben.

Chemikalien und Lipid	Bezugsquelle
Agarose Type IX-A (Ultra-low Gelling Temperature)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Chloroform	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Cholesterol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glucose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DOPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
HEPES	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Methanol	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
<i>N</i> -Rh-DHPE	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Surcose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

8.2.2 Agarosegel-unterstützte Bildung von GUVs

Die Bildung der GUVs erfolgte auf einem Agarosegel nach einem modifizierten Protokoll von HORGER *et al.*^[288,289] Hierfür wurde zunächst Agarose Typ IX-A (Gelpunkt $T_g \leq 17$ °C; Schmelzpunkt $T_m \leq 60$ °C) in Milli-Q-Wasser bei einer Temperatur von 80-100 °C auf einer Heizplatte unter Rühren vollständig gelöst ($c = 10$ mg/mL). Direkt im Anschluss wurden 100-300 μ L der heißen Lösung durch Rotationsbeschichtung bei 1200 rpm für 1 min auf ein Deckglas (22 x 22 mm), das zuvor mit Chloroform gereinigt wurde, aufgetragen. Das beschichtete Deckglas wurde für 60 min bei ~ 40 °C getrocknet. Währenddessen wurde die Lipidmischung DOPC/DPPC/Chol (1:2:1 mol %) aus den jeweiligen Stammlösungen in Chloroform ($c = 10$ mg/mL) hergestellt und mit 0,2 mol% *N*-Rh-DHPE ($c = 100$ μ M in MeOH) versetzt. Die Lipidmischung wurde weiter mit Chloroform verdünnt, bis die Lipidkonzentration 3 mg/mL betrug. Anschließend wurden 30 μ L dieser Lipidlösung durch Rotationsbeschichtung bei 800 rpm für 1 min auf die trockenen mit agarosebeschichteten Deckgläser aufgetragen. Dann wurden die lipidbeschichteten Deckgläser für mindestens 2 h unter Vakuum gesetzt, um das restliche Chloroform zu entfernen. Ein Zylinder aus Polystyrol (*cloning cylinder*, Höhe 11 mm, $\varnothing = 9,5$ mm) wurde als Probenkammer auf das lipidbeschichtete Deckglas gestellt und mit Vakuumfett abgedichtet. Der Zylinder wurde mit 240 μ L Puffer (10 mM HEPES (pH = 7,4)) befüllt und mit einem lipidfreien Deckglas

abgedeckt. Die Bildung der GUVs erfolgte bei 55 °C für mindestens 60 min im Ofen. Nach dem Abkühlen wurde die GUV-enhaltende Lösung in die Hochdruckzelle gegeben.

8.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der GUVs unter Hochdruck wurden an einem inversen Mikroskop (Eclipse TE-300DV, Nikon, Tokio, Japan) durchgeführt, das entweder mit einem Objektiv des Typs CFI Superplan Fluor ELWD 40× (NA 0,6, WD 3,6-2,8 mm, Nikon, Tokio, Japan) oder CFI Superplan Fluor ELWD 20× (NA 0,45, WD 8,2-6,9 mm, Nikon, Tokio, Japan) ausgestattet war. Die speziell angefertigte Hochdruckzelle (siehe Abschnitt 8.3) wurde über einen eigens dafür angefertigten xy-Mikroskoptisch als Auflagefläche an das inverse Mikroskop montiert. Die Hochdruckzelle umfasst einen Zellkörper aus einer Cr-Ni-Cu-Legierung mit hoher Zugfestigkeit (17-4 PH[®], Schumacher Verfahrenstechnik, Wiehl, Deutschland) und optische CVD-Diamantfenster ($\varnothing = 5$ mm, 0,5 mm Dicke, Element Six Technologies, Berkshire, UK). Als Probenhalter diente ein 1 mm hoher PTFE-Ring mit einem Außendurchmesser von 8 mm und einem Innendurchmesser von 3 mm. Mit doppelseitigem Klebeband wurde der PTFE-Ring an dem zur Objektivlinse gerichteten Diamantfenster befestigt, mit 10 μ L Probe befüllt und mit einem Deckglas ($\varnothing = 8$ mm) mit doppelseitigem Klebeband bedeckt, um die Probenlösung von dem Druckmedium zu isolieren. Der hydrostatische Druck wurde mithilfe einer Handspindelpresse (NovaSwiss[®], Illnau-Effretikon, Schweiz) erzeugt, wobei Wasser als Druckmedium verwendet wurde. Der Druck in der Zelle wurde mithilfe eines Drucksensors (P3298, 0-4000 bar, 0,5 % Genauigkeit, tectis, Offenbach, Deutschland) gemessen und über eine digitale Anzeige (E1929, tectis, Offenbach, Deutschland) ausgegeben. Die Temperatur der Zelle wurde über einen elektrisch heizbaren Kupferblock reguliert.

Für die konfokale Fluoreszenzmikroskopie wurde das Laser-Scanning-System (MRC 1024, Bio-Rad Laboratories), das über einen Seitenport mit dem oben erwähnten Mikroskop verbunden war, verwendet. Die Fluoreszenz von *N*-Rh-DHPE wurde durch die Anregung bei 568 nm unter Verwendung eines Kr/Ar-Lasers (Dynamic Laser, Salt Lake City, USA) erhalten. Das Signal wurde von einem PMT detektiert, dem ein Emissionsbandpassfilter (580 nm/32 nm FWHM) vorgeschaltet war. Die Steuerung des konfokalen Fluoreszenzmikroskops und die Bildaufnahme (512 × 512 Pixel) erfolgten mithilfe der Software LaserSharp2000 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

Bei der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie diente eine Quecksilberdampfampe (Hg 100W, Nikon, Tokio, Japan) als Lichtquelle. Das Anregungslicht wurde über einen dichroitischen Spiegel im Filterwürfel reflektiert und durch das Objektiv auf die Probe gelenkt. Die von der Probe emittierte Fluoreszenz passierte erneut den dichroitischen Spiegel und wurde mittels CCD-Kamera (iXon Ultra EMCCD, Andor Technology, Belfast, UK) detektiert. Die Steuerung der CCD-Kamera und die Aufnahme der Fluoreszenzbilder (512 × 512

Pixel) erfolgte mit der Software NIS-Elements BR (Nikon, Tokio, Japan). Das Programm ImageJ^[144] wurde benutzt, um den Hintergrund der aufgenommenen Bilder zu korrigieren und deren Kontrast zu erhöhen.

8.3 Ergebnisse & Diskussion

8.3.1 Zellkörper

Im Folgenden wird der Aufbau der Mikroskopie-Hochdruckzelle erläutert. Der Zellkörper (**a**), wie in Abbildung 8.1 gezeigt, wurde aus der Cr-Ni-Cu-Legierung 17-4 PH[®] (Schumacher Verfahrenstechnik, Wiehl, Deutschland) von der mechanischen Werkstatt der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der TU Dortmund hergestellt. Im wärmebehandelten Zustand H900 (Auslagern bei 480 °C für 4 h) besitzt diese Legierung eine 0,2 %-Dehngrenze ($\sigma_{0,2}$) von 1170 MPa, was die Spannung darstellt, bei der eine bleibende Dehnung von 0,2 % erreicht wird. Des Weiteren weist diese Legierung im Zustand H900 eine Zugfestigkeit von 1310 MPa auf, was der maximalen mechanischen Zugspannung entspricht, und besitzt zudem eine hohe Korrosionsbeständigkeit, wodurch die Metalloxidation bei hohen Drücken minimiert wird.

Der maximale Druck, der innerhalb der Zelle herrschen darf, hängt maßgeblich von den mechanischen Eigenschaften des verwendeten Materials ab, aber auch vom Aufbau der Zelle selbst. Für zylindrische Druckzellen mit verschlossenen Enden kann der Druck p_y , bei dem der Zylinder beginnt nachzugeben, durch folgende Gleichung bestimmt werden:^[290]

$$p_y = \frac{u^2 - 1}{\sqrt{3}u^2} \sigma_{0,2} \quad (8.1)$$

Hierbei entspricht u dem Verhältnis des äußeren und inneren Zylinderdurchmessers. Der maximal zulässige Druck darf unabhängig vom Durchmesser Verhältnis, auch bei einer Zylinderwand mit unendlicher Dicke ($u \rightarrow \infty$), niemals 58 % der Dehngrenze überschreiten. Demzufolge entspricht der maximale Druck für zylindrische Zellen aus 17-4 PH[®] $p = \sigma_{0,2}/\sqrt{3} = 675$ MPa. Das Durchmesser Verhältnis der im Rahmen dieser Arbeit gebauten Hochdruckzelle beträgt $u = 86 \text{ mm}/30,5 \text{ mm} = 2,8$, sodass der maximale Druck p_y für diese Hochdruckzelle bei 589 MPa liegt. Der angefertigte Zellkörper besitzt eine zentrierte Bohrung ($\varnothing = 8,2$ mm) entlang des Strahlengangs, die durch die Zylinderachse verläuft, und an beiden Seiten durch jeweils ein Fenster (**d**), das auf einem Trägerstempel (**b**, **h**) befestigt ist, verschlossen wird. Diese Trägerstempel werden durch entsprechende Stempelmuttern (**c**, **i**) fixiert. Diese beiden Komponenten wurden ebenfalls aus der gleichen Cr-Ni-Cu-Legierung 17-4 PH[®] hergestellt. Bei einem Druck von 200 MPa erfährt der Verschluss dieser Bohrung eine Kraft von 10,5 kN. Daher muss die Stempelmutter mit einem Gewindemaß von M30×1,5 unter Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors von 2

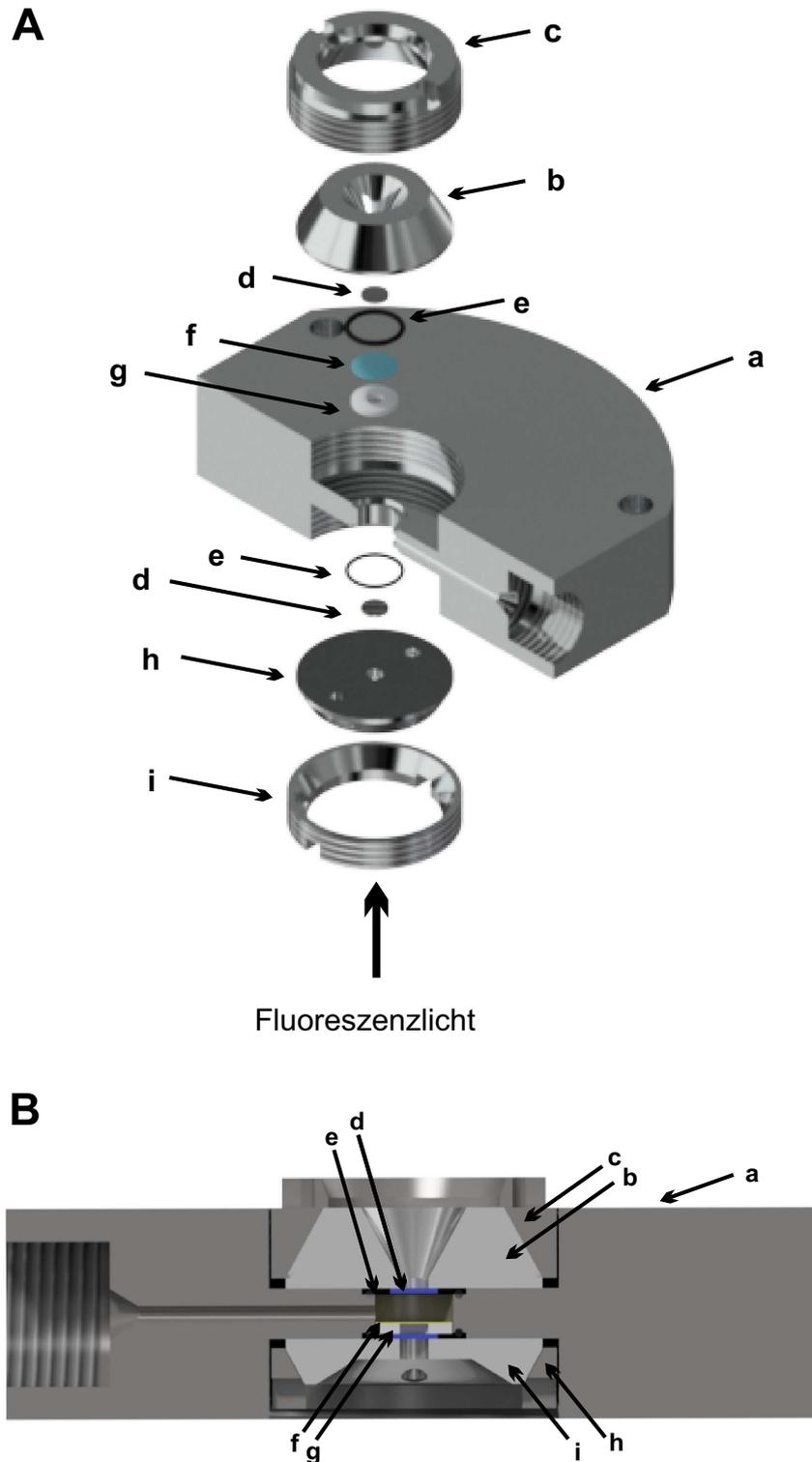


Abb. 8.1: Explosionsdarstellung (A) und Querschnitt (B) der Mikroskopie-Hochdruckzelle. **a:** Zellkörper. **b:** Oberer Stempel. **c:** Obere Stempelmutter. **d:** Diamantfenster. **e:** O-Ring. **f:** Deckglas. **g:** PTFE-Ring. **h:** Unterer Stempel. **i:** Untere Stempelmutter.

eine minimale Einschraubtiefe von 1,3 mm aufweisen, um dieser Axialkraft standhalten zu können. Im zusammengebauten Zustand beträgt die Einschraubtiefe der Stempelmuttern jeweils 6 mm und 7 mm, was deutlich über der berechneten Mindestlänge liegt. Senkrecht zu dieser Bohrung verläuft eine weitere Bohrung ($\varnothing = 1,6$ mm), die für den Anschluss

der Zelle an das hydrostatische Drucksystem vorgesehen ist. Die vier Bohrungen, die sich im äußeren Bereich der Zelle befinden, dienen der Befestigung der Zelle an den xy-Mikroskoptisch.

8.3.2 Fenster und Stempel

Als Fenster für die Mikroskopie-Hochdruckzelle wurden flache CVD-Einkristalldiamanten vom Typ IIa (Element Six Technologies, Berkshire, UK) mit einer Dicke von 0,5 mm und einem Durchmesser von 5 mm verwendet, da diese zum einen eine geringe Absorption im Bereich von 220 nm bis 2,5 μm aufweisen und zum anderen die erforderliche, mechanische Stabilität mitbringen.^[291]

Die runden Fenster (**d**) wurden auf den Stempeln befestigt, die eine zentrierte Bohrung ($\varnothing = 3 \text{ mm}$) aufweisen. Die beiden Stempel **b** und **h** unterscheiden sich maßgeblich in ihrer Höhe und ihrem kritischen Winkel. Während der obere Stempel **b** einen kritischen Winkel von 60° und eine Höhe von 8 mm aufweist, beträgt der kritische Winkel des unteren zum Objektiv gerichteten Stempels **h** 120° und die Höhe liegt bei 2,5 mm. Dadurch wird der Abstand zwischen Objektivlinse und der Diamantfensteroberfläche verringert, was die Verwendung von Objektiven mit einem geringeren Arbeitsabstand ermöglicht, die in der Regel eine stärkere Vergrößerung erreichen.

Gemäß der Plattentheorie für runde Fenster mit fixierten Rändern, bei denen die maximale Biegespannung an den Rändern der kreisförmigen Öffnung wirkt, kann folgende Gleichung für die Berechnung des maximalen Drucks für die verwendeten Diamantfenster berechnet werden:^[292,293]

$$p_{\max} = \frac{4}{3} \left(\frac{t_w}{a_w} \right)^2 \sigma_B \quad (8.2)$$

Dabei ist t_w die Fensterdicke, a_w der nicht-unterstützte Öffnungsradius und σ_B die Bruchfestigkeit der CVD-Diamanten. Mit einer Bruchfestigkeit von 3500 MPa^[291] und einem Sicherheitsfaktor von 4 liegt der berechnete Wert von p_{\max} bei 130 MPa. Anhand von Gleichung 8.2 ist zu erkennen, dass die maximale Belastung proportional zu $(t_w/a_w)^2$ ist. Ein dickeres Fenstermaterial würde zu einer höheren Druckstabilität führen, würde jedoch gleichzeitig die Auflösung und Bildqualität verringern, weshalb bei der Dicke der Diamantfenster ein Kompromiss für die gegebenen experimentellen Bedingungen gefunden werden muss.

8.3.3 Dichtungen

Neben den einzelnen Bestandteilen einer Hochdruckzelle müssen auch die Dichtungen an den Schnittstellen dieser Komponenten eine hohe Druckstabilität aufweisen. Die optisch polierten Diamantfenster sind nach dem Poulter-Prinzip^[294] gegen die unterstützende Stempeloberfläche abgedichtet. Diese Dichtung wird durch den direkten Kontakt zwischen dem Diamantfenster und der ebenfalls polierten Auflagefläche der Stempel erzeugt. Bei geringeren Drücken sind Dichtungen nach dem Poulter-Prinzip nicht so wirksam. Aus diesem Grund und um das Fenster in der gewünschten Position zu halten, wurde der Fensterrand mit Epoxidharzkleber (Araldite 2014-1, Bodo Möller Chemie, Offenbach, Deutschland), der bei hohen Temperaturen standhält und eine hohe Festigkeit besitzt, an die Metalloberfläche geklebt.

Zur Abdichtung der Stempel wurden O-Ringe (**e**) (9 mm × 1 mm) entweder aus Fluorkautschuk mit einer Härte von 75 Shore A oder aus Nitrilkautschuk mit einer Härte von 70 Shore A (Hug Technik, Ergolding, Deutschland) verwendet. Diese statische Dichtung beruht auf der anfänglichen Kompression des O-Rings.

8.3.4 Probenhalter

Als Probenhalter wurde ein 1 mm hoher Polytetrafluorethylen (PTFE)-Ring (**g**) mit einem Außendurchmesser von 8 mm und einem Innendurchmesser von 3 mm verwendet. Mit doppelseitigem Klebeband wurde der PTFE-Ring an das Diamantfenster am Stempel, der zur Objektivlinse gerichtet ist, fixiert und mit einem Deckglas ($\varnothing = 8$ mm) vom Druckmedium isoliert. Der Druck kann über das Deckglas und das verformbare PTFE auf die Probe ($V = 7 \mu\text{L}$) übertragen werden.

8.3.5 Mikroskopie-Hochdruckstudien an GUVs

Um die Funktion und Druckstabilität der Mikroskopie-Hochdruckzelle zu überprüfen, wurden fluoreszenzmikroskopische Messungen mit der bekannten Lipidmischung DOPC/DPPC/Chol (1:2:1 mol%) durchgeführt. Die Herstellung der GUVs erfolgte nicht wie zuvor mittels Elektroformation, sondern durch die Verwendung von Agarosegelen (siehe Abschnitt 8.2.2). Diese wurde gegenüber der Elektroformation bevorzugt, da sich die gebildeten GUVs zum einen nicht vollständig von den ITO-Deckgläsern lösten und auf der Glasoberfläche adhärten und zum anderen die Probe aufgrund der Konstruktion der Elektroformationskammer nur mit großen Verlusten aus dieser entnommen werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte mithilfe der Agarosegele die Ausbeute und die Konzentration der GUVs in Lösung erhöht werden, was für das Mikroskopieren mit solch einem geringen Probenvolumen erforderlich war. Außerdem bietet die Agarose-unterstützte Quellung im Vergleich zur Elektroformation eine schnelle und milde Methode zur Herstellung von

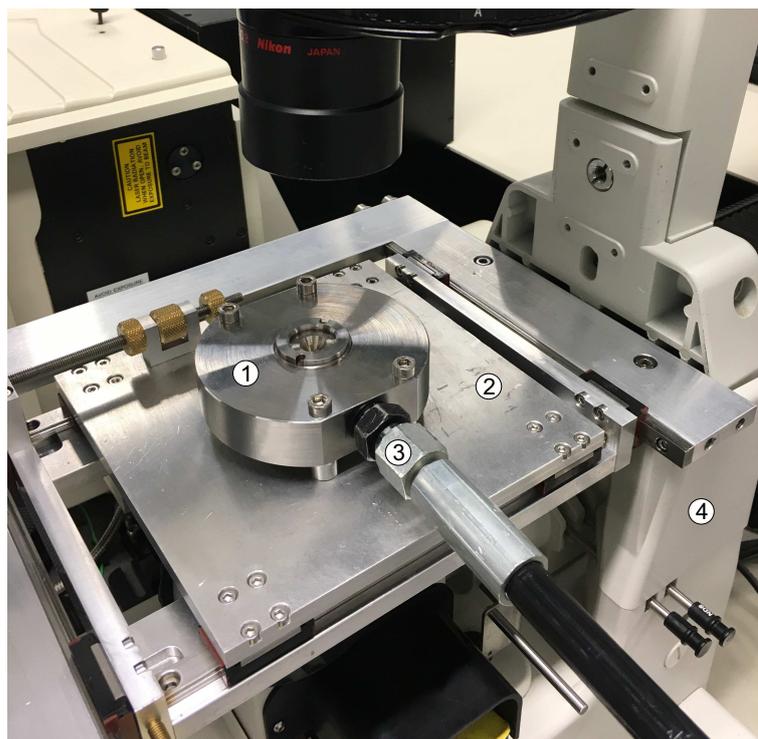


Abb. 8.2: Zusammengebaute Mikroskopie-Hochdruckzelle (1) auf dem eigens dafür angefertigten xy-Mikroskoptisch (2) am inversen Mikroskop des Modells Eclipse TE-300DV (4) von Nikon. Über den Hochdruckschlauch (3) ist die Zelle mit einer Handspindelpresse verbunden.

GUVs, weil das während der Elektroformation angelegte elektrische Feld die Oxidation ungesättigter Lipide begünstigt,^[295] was einen Einfluss auf das Phasenverhalten der Lipiddoppelschicht haben kann.^[296]

Beim Zusammenbau der Mikroskopie-Hochdruckzelle wurde zunächst der untere Stempel mit dem geklebten Diamantfenster durch die Stempelmutter im Zellkörper fixiert, wobei ein O-Ring zur Abdichtung verwendet wurde. Nachdem der PTFE-Ring mittels doppelseitigem Klebeband an dem Diamantfenster in der Zelle befestigt worden war, wurden 10 μL der hergestellten GUV-Lösung in den Probenhalter pipettiert. Im Anschluss wurde der PTFE-Ring mit einem Deckglas verschlossen, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen im Probenraum entstanden. Der Zellkörper wurde daraufhin auf dem eigens dafür angefertigten xy-Mikroskoptisch befestigt, durch den der Abstand zwischen Hochdruckzelle und Objektiv verringert wird und eine stabile Position der Hochdruckzelle während des Mikroskopierens gewährleistet war. Nachdem die Zelle über den Hochdruckschlauch mit der Handspindelpresse verbunden worden war, wurde der Innenraum der Zelle vollständig mit Wasser gefüllt und anschließend mithilfe des oberen Stempels und dem darauf geklebten Diamantfenster geschlossen. Der Stempel wurde durch die Stempelmutter in dem Zellkörper fixiert, wobei ebenfalls ein O-Ring zur Abdichtung eingesetzt wurde. Das geschlossene System sollte frei von Luftblasen sein, um einen gleichmäßigen Druckaufbau zu ermöglichen. In Abbildung 8.2 ist die zusammengebaute, auf dem xy-Mikroskoptisch montierte Hochdruckzelle dargestellt.

Mikroskops aufgezeichnet. Bei Atmosphärendruck kann eine homogene l_d -Phase beobachtet werden, die bis 50 MPa erhalten bleibt. Ab 60 MPa erscheinen jedoch dunkle Bereiche, welche die l_o -Phase repräsentieren, da das verwendete fluoreszierende Lipid *N*-Rh-DHPE bevorzugt in die l_d -Phase inseriert. In den früheren Studien wurde auch in diesem Druckbereich eine Phasenseparation beobachtet. Um jedoch eine quantitative Aussage über den Phasenübergangsdruck treffen zu können, müsste eine höhere Anzahl an GUVs in unterschiedlichen Bereichen der Probe untersucht werden. Diese Aufnahmen zeigen dennoch, dass die angefertigte Mikroskopie-Hochdruckzelle in einem Druckbereich von 0,1-100 MPa bei Temperaturen bis 55 °C mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop verwendet werden kann.

Eine große Herausforderung beim Mikroskopieren von GUVs unter Druck stellte die Bewegung der Vesikel in Lösung dar. Bei der Herstellung der GUVs in Gegenwart von Sucrose und anschließender Verdünnung mit einer glucosehaltigen Lösung, die eine ähnliche osmotische Konzentration aufweist, wird ein Dichteunterschied zwischen der Sucrose im Inneren der Vesikel zu der umgebenden Glucoselösung erzeugt. Dadurch sinken die GUVs auf den Boden der Mikroskopiezelle, was die Bildaufnahme maßgeblich erleichtert.^[298] Aus diesem Grund wurden die GUVs aus DOPC/DPPC/Chol (1:2:1 mol%) analog zu den vorherigen Experimenten in 100 mM Sucrose hergestellt und anschließend 1:2 mit einer Glucoselösung ($c = 100$ mM) verdünnt. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder (siehe Abb. 8.4) erfolgte mit einem konventionellen Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop. Die Bildung der GUVs scheint in Gegenwart von Sucrose begünstigt zu sein, da die Konzentration der Vesikel im Vergleich zum vorherigen Experiment in 10 mM HEPES deutlich höher war. Da bei der Weitfeld-Mikroskopie die gesamte Probe beleuchtet und nicht punktwise abgerastert wird wie bei der CLSM, sind Vesikel in verschiedenen Ebenen sichtbar, die stark zur Hintergrundfluoreszenz und somit zu Verminderung des Kontrastes beitragen. Eine weitere Verdünnung der Probe könnte diesen Einfluss bis zu einem gewissen Grad minimieren. Die Hintergrundfluoreszenz könnte jedoch auch aus der Autofluoreszenz der Agarose, die zum Teil in den GUVs eingeschlossen werden kann, resultieren.^[288] Analog zu den GUVs in HEPES-Puffer konnte hier eine Phasentmischung bei 50 MPa beobachtet werden, was zeigt, dass die angefertigte Mikroskopie-Hochdruckzelle auch in Kombination mit einem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop verwendet werden kann.

Obwohl heutzutage in der Mehrheit der Herstellungsprotokolle von GUVs hochkonzentrierte Sucroselösungen (100-300 mM) zum Einsatz kommen,^[299] ist der Effekt des Zuckers auf die Membran nicht klar. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass Sucrose die Kopfgruppen mehrerer Lipide über Wasserstoffbrücken vernetzt, wodurch die Diffusion der Lipide in der Membran verlangsamt wird.^[300,301] Darüber hinaus wird kontrovers diskutiert, ob die mechanischen Eigenschaften der Membran durch die Zugabe von verschiedenen Zuckern beeinflusst werden.^[302-305] Dies sollte daher bei der Interpretation der Ergebnisse von GUVs in Sucrose- und Glucoselösungen berücksichtigt werden. MCCARTHY *et al.* konnten

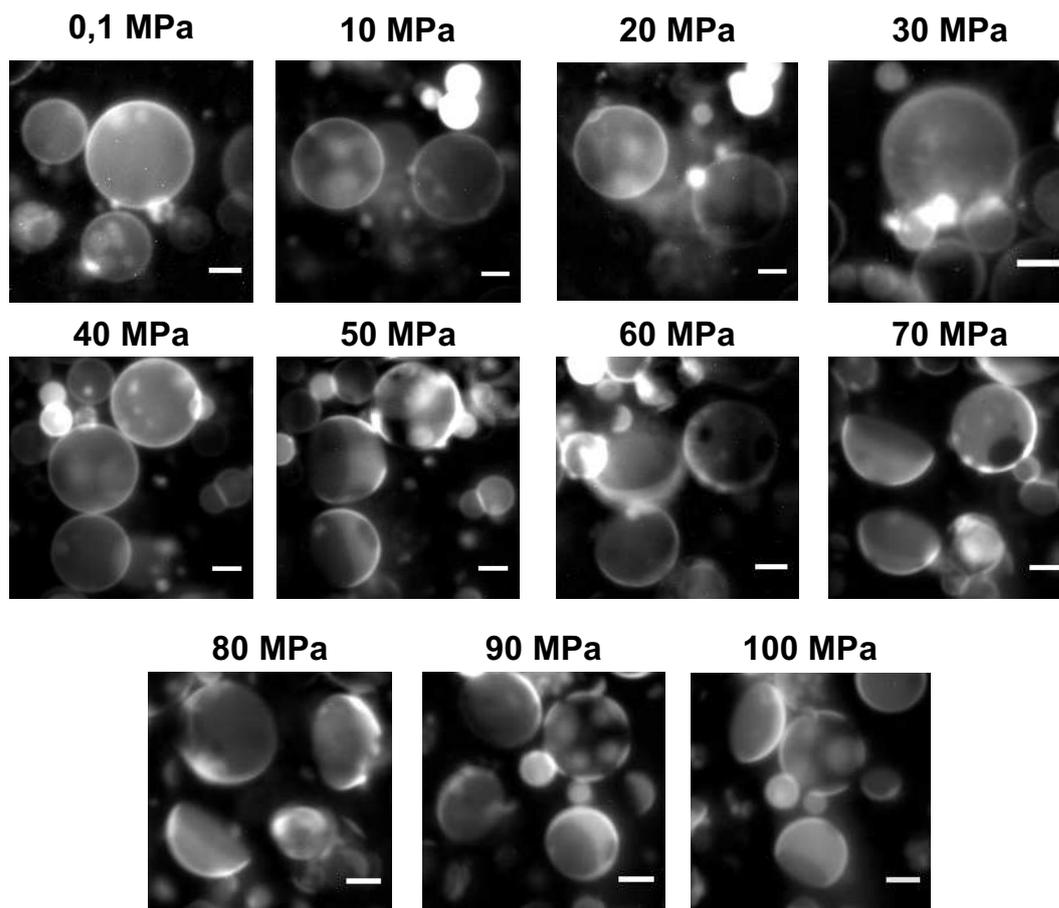


Abb. 8.4: Fluoreszenzbilder von GUVs aus DOPC/DPPC/Chol (1:2:1 mol%) in 100 mM Sucrose (1:2 verdünnt mit 100 mM Glucose) bei 55 °C in Abhängigkeit des Drucks (0,1-100 MPa). Die l_d -Phase der raft-ähnlichen Modellmembran ist mit dem fluoreszierenden Lipid *N*-Rh-DHPE (0,2 mol%) markiert. Der Maßstab in allen Bildern entspricht 10 μm .

zeigen, dass der aus den Mikroskopie-Experimenten ermittelte Phasenübergangsdruck der GUVs, die in einer 100 mM Sucroselösung generiert und mit einer 200 mM Glucoselösung verdünnt wurden, sehr gut mit den Ergebnissen der SAXS-Experimente korrelieren, in denen die Vesikel in reinem Wasser hergestellt wurden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die hochkonzentrierten Zuckerlösungen keinen ausschlaggebenden Einfluss auf das druckabhängige Phasenverhalten von Membranen haben.

Des Weiteren muss der Effekt von Agarose auf Membranen berücksichtigt werden. Ein Einfluss auf die laterale Diffusion der Lipide in den GUVs konnte beispielsweise nicht beobachtet werden.^[288] Dahingegen wurde in einer weiteren Studie gezeigt, dass die mechanischen Eigenschaften der Vesikel durch die Interaktionen zwischen den Lipiden und der Agarose verändert werden und die Durchlässigkeit der Membran erhöht wird.^[306] Um einen Einfluss auf das Phasenverhalten ausschließen zu können, müssten jedoch weitere Studien durchgeführt werden.

Abschließend ist festzuhalten, dass im Rahmen dieser Arbeit eine temperierbare Mikroskopie-Hochdruckzelle entwickelt und etabliert wurde, die in einem Druckbereich von 0,1-100 MPa erfolgreich betrieben werden kann. Der ermittelte maximal anwendbare Druck von 130 MPa

müsste in weiteren Experimenten validiert werden. Die Druckstabilität der Zelle könnte weiter erhöht werden, wenn dickeres Fenstermaterial verwendet werden würde, was jedoch zu einem größeren Abstand zwischen Probe und Objektiv führen und folglich in einer geringeren optischen Auflösung resultieren würde. Zu beachten ist dabei jedoch, dass Diamantfenster eine sehr hohe optische Dichte ($n_b = 2,432$)^[291] aufweisen. Daher wird das emittierte Licht gemäß dem Brechungsgesetz beim Eintritt in die Luft ($n_b = 1$) zwischen Fenster und Trockenobjektiv stark gebrochen und gelangt nicht mehr ins Objektiv, was zu einer geringeren Bildqualität und optischen Auflösung führt. Demzufolge könnten z.B. dickere Fenster aus Saphir verwendet werden, welcher eine geringere optische Dichte ($n_b = 1,776$)^[307] aufweist, aber dennoch eine sehr hohe Festigkeit und Härte besitzt. Dadurch könnte die Druckstabilität erhöht werden, ohne die Bildqualität und optische Auflösung maßgeblich zu beeinträchtigen, wie kürzlich von MCCARTHY *et al.* gezeigt wurde, die unter Verwendung von 1 mm dicken Saphirfenstern eine Druckstabilität von 250 MPa erzielen konnten und dennoch Fluoreszenzbilder mit guter Qualität erhalten haben.^[287] Alternativ könnten auch BK7-Fenster ($n_b = 1,520$)^[308] verwendet werden, die bereits erfolgreich in optischen Hochdruckzellen zum Einsatz gekommen sind.^[285,309] Das Fenstermaterial auf der Trägeroberfläche der Stempel könnte anhand der für die Experimente benötigten Anforderungen gewählt werden.

8.4 Zusammenfassung

Druck ist nicht nur ein wichtiger physikalischer Parameter, um strukturelle und dynamische Änderungen in biologischen Systeme und Prozessen zu untersuchen, sondern hat auch eine direkte biologische und biotechnologische Bedeutung. Hochdruckuntersuchungen erfordern spezielle Druckzellen, welche die Anforderungen der jeweiligen Methode erfüllen und gleichzeitig eine hohe Druckstabilität mitbringen müssen. Bei der Entwicklung einer Hochdruckzelle für die Mikroskopie stellen neben der Druckstabilität die optische Auflösung und Bildqualität eine große Herausforderung dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte basierend auf einer von BROOKS *et. al* entwickelten Hochdruckzelle^[287] eine temperierbare Mikroskopie-Hochdruckzelle gebaut und etabliert werden.

Hierfür wurden ein annähernd zylindrischer Zellkörper, Trägerstempel und Stempelmuttern aus der Cr-Ni-Cu-Legierung 17-4 PH[®] hergestellt, welche eine hohe Zugfestigkeit und Korrosionsbeständigkeit besitzt. Die zentrierte Bohrung im angefertigten Zellkörper und den Trägerstempeln, auf die plangeschliffene CVD-Einkristalldiamanten mittels Epoxidharzkleber fixiert wurden, ermöglichten eine mikroskopische Beobachtung des Probenraums. Als Probenhalter wurde ein PTFE-Ring verwendet, der mithilfe von doppelseitigem Klebeband an das Diamantfenster am unteren Trägerstempel befestigt und mit einem Deckglas vom Druckmedium isoliert wurde. Die Trägerstempel wurden mit den Stempelmuttern im Zellkörper fixiert, wobei O-Ringe zur Abdichtung verwendet wurden.

Um die Druckstabilität der Mikroskopie-Hochdruckzelle sowie die optische Auflösung und Bildqualität abschätzen zu können, wurden fluoreszenzmikroskopische Messungen mit der bereits intensiv untersuchten *raft*-ähnlichen Modellmembran aus DOPC/DPPC/Chol (1:2:1 mol%) durchgeführt. Hierfür konnten die GUVs mit einer hohen Ausbeute auf Agarosegelen hergestellt werden. Das Einschließen einer hochkonzentrierten Sucroselösung in den GUVs und die Verdünnung mit einer Glucoselösung mit ähnlicher osmotischer Konzentration erleichterte das Mikroskopieren, da die Vesikel aufgrund der höheren Dichte der Sucroselösung im Inneren der GUVs auf den Boden der Hochdruckzelle sanken. Die druckinduzierte Phasentrennung in eine l_d - und l_o -Phase konnte für diese Lipidmischung sowohl mithilfe der CLSM und als auch der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden und lag bei 55 °C in einem Druckbereich von 50-60 MPa, was sehr gut mit den Ergebnissen einer früheren SAXS- und FT-IR-Studie übereinstimmt.^[297] Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und etablierte Mikroskopie-Hochdruckzelle konnte bei hohen Temperaturen erfolgreich in einem Druckbereich von 0,1-100 MPa (theoretischer maximaler Druck $p_{\max} = 130$ MPa) betrieben werden. Durch die Verwendung flacher und optischer Diamantfenster sowie Trockenobjektiven mit variabler Deckglaskorrektur konnten Bilder mit einer guten Qualität erhalten werden, wobei die Druckstabilität, optische Auflösung und Bildqualität durch eine geeignete Wahl des Fenstermaterials und der Fensterdicke an die Anforderungen der Hochdruckstudien angepasst werden können.

Die Entwicklung und Etablierung dieser Mikroskopie-Hochdruckzelle ermöglicht die direkte Visualisierung von Druckeffekten auf unterschiedliche biologische Systeme und Prozesse, wie z.B. die Struktur und Dynamik von Membranen sowie der Aktin- und Mikrotubuli-Filamente oder die Wechselwirkung zwischen Proteinen und Membranen, woraus Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Mechanismen dieser druckinduzierten strukturellen und dynamischen Prozesse gezogen werden können.

Fazit

Die interzelluläre Kommunikation und die Reaktion auf Umgebungsreize ist eine wichtige Funktion der Zelle, die deren Aktivität im Organismus reguliert und ihr Überleben sicherstellt. Dabei werden extrazelluläre Signale über die Plasmamembran in das Zellinnere weitergeleitet. Eine zentrale Rolle spielen dabei die lipidierten Src-Kinasen und Ras-Proteine, die das Signal von den aktivierten Rezeptorproteinen verstärken bzw. über die Plasmamembran auf zytosolische Effektorproteine übertragen und intrazelluläre Signalkaskaden induzieren, wodurch unterschiedliche zelluläre Reaktionen gesteuert werden. Gleichzeitig spiegelt dies jedoch auch das onkogene Potential dieser lipidierten Signalproteine wider, da anormale Signaltransduktionen durch die Überexpression oder eine aktivierende Mutation in diesen Proteinen häufig im Zusammenhang mit Krebserkrankungen stehen. Da die Lokalisation der lipidmodifizierten Ras-Proteine und Src-Kinasen an der Plasmamembran essentiell für die Aktivität dieser Signalproteine ist, stellt die Inhibierung deren Membranbindung einen potentiellen Therapieansatz dar. Die Interaktionen zwischen den lipidierten Proteinen und der zellulären Membran werden *in vivo* durch verschiedene Mechanismen reguliert, bei denen elektrostatische Wechselwirkungen und molekulare Chaperone, welche die zytosolische Diffusion der Lipoproteine erleichtern, eine wichtige Rolle einnehmen. Zum genaueren Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen wurden die Auswirkungen der Membranzusammensetzung und die Anwesenheit molekularer Chaperone auf die Membranbindung lipidierter Signalproteine/-peptide unter Verwendung verschiedener mikroskopischer und spektroskopischer Methoden studiert. Zudem wurden die Wechselwirkungen zwischen den lipidbindenden Chaperonen und den Lipopeptiden untersucht, um neue Einblicke in die strukturellen Änderungen und den Bindungsmechanismus zu erhalten.

- (I) Biophysikalische Untersuchungen zu Ras-Membran-Interaktionen erfordern präparative Mengen an diesen lipidierten Proteinen. Die *Expressed Protein Ligation* stellte unter Verwendung des synthetischen Lipopeptids eine effiziente Methode dar, um das

posttranslational modifizierte und fluoreszenzmarkierte K-Ras4B-Protein in hoher Reinheit und moderater Ausbeute herzustellen.

- (II) Die fluoreszenzmikroskopischen Messungen von K-Ras4B an phosphatidylserinhaltigen Modellmembranen und an riesigen Plasmamembranvesikeln haben in Kombination mit früheren Studien gezeigt, dass die selektive Lokalisation und charakteristische Clusterbildung in der flüssig-ungeordneten Lipidphase ein allgemeiner Prozess des membranassoziierten K-Ras4B-Proteins ist, welcher weitestgehend unabhängig von der Membranzusammensetzung ist. Im Gegensatz dazu wird die Akkumulation und Clusterbildung von N-Ras in Membransystemen mit flüssig-ungeordneter/flüssig-geordneter Phasenkoexistenz nach Einbau in die flüssig-ungeordnete Phase im Wesentlichen durch die Linienspannung an der Phasengrenzfläche reguliert, die in Membranen mit einer komplexen Lipid- und Proteinzusammensetzung jedoch klein ist.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass einfache Modellmembranen, auch wenn diese nicht die hohe Lipid- und Proteindiversität der zellulären Membran besitzen, zum besseren Verständnis der membranassoziierten Prozesse in lebenden Zellen beitragen können.

- (III) Aus den Kleinwinkelstreu- und FOURIER-Transform-Infrarot-Experimenten ließ sich ableiten, dass holo-Calmodulin mit dem farnesylierten und polybasischen K-Ras4B-Peptid einen globulären Komplex formt, bei dem sich die zentrale Helix von Calmodulin entfaltet und der Lipidanker sich vermutlich in den hydrophoben Taschen von Calmodulin einlagert, während die Peptidsequenz seine ungeordnete Struktur beibehält.

Mithilfe von Hochdruck-FOURIER-Transform-Infrarot-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Konformationsdynamik und die Auswahl der Konformationssubzustände von Calmodulin stark von der Ca^{2+} -Bindung und weiteren Bindungspartnern, wie dem K-Ras4B-Peptid, beeinflusst werden. Dabei wurden für apo- und holo-Calmodulin stärker solvatisierte und partiell entfaltete Konformationssubzustände identifiziert, die eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Bindung von Liganden und Zielproteinen spielen können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass höhere Drücke die Freisetzung der gebundenen Ca^{2+} -Ionen aus dem Calmodulin-Protein induzieren.

- (IV) Durch eine umfangreiche Kinetikstudie wurde ein zweistufiger Membranbindungsprozess für die myristoylierte *N*-terminale Sequenz von c-Src festgestellt. Der initiale Bindungsschritt umfasst sowohl die Ausbildung elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen der polybasischen Sequenz und den negativ geladenen Lipiden in der Membran, als auch die Insertion des Myristoylankers in die Membran. In der langsameren

Bindungsphase durchläuft das myristoylierte Peptid laterale Umlagerungen in der Membranebene, die schließlich zur Ausbildung von Peptid/Lipid-Clustern in der Membran führen.

Außerdem wurde bestätigt, dass UNC119A als molekularer Chaperon für das myristoylierte c-Src-Peptid fungiert. Die Dissoziation des myristoylierten Peptids von der Membran wird in Gegenwart von UNC119A erleichtert und die Membranbindung des c-Src-Peptids verlangsamt. Im Gegensatz dazu wird der zweite Membranbindungsschritt des lipidierten Peptids nicht von UNC119A beeinflusst.

Diese Studie bestätigt außerdem, dass Squarunkin A als spezifischer niedermolekularer Inhibitor der Wechselwirkung zwischen UNC119A und dem myristoylierten c-Src-Peptid auch in Anwesenheit von Membranen wirksam ist.

Die molekulare Pinzette CLR01 bindet spezifisch Lysinreste in Proteinen/Peptiden, wodurch die Bildung amyloider Fibrillen, die häufig im Zusammenhang mit Krankheiten stehen, verhindert wird. Kürzlich wurde gezeigt, dass CLR01 auch eine antivirale Wirkung hat, was auf die Zerstörung der viralen Membranhülle zurückgeführt wurde. Im Rahmen dieser Studie wurde der Effekt dieser molekularen Pinzette und weiterer Derivate auf eine virale Modellmembran untersucht, um Einblicke in den zugrunde liegenden Zerstörungsmechanismus zu erhalten.

- (V) Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass CLR01 zur Abschnürung der flüssig-geordneten Domänen in einer viralen Modellmembran mit flüssig-ungeordneter/flüssig-geordneter Phasenkoexistenz führt, was letztendlich in der Zerstörung der Membranstruktur resultiert. Sowohl der torusförmige Hohlraum als auch die peripheren Phosphatgruppen am starren Benzol-Spacer sind für die Bindung an die phosphocholinhaltigen Lipidkopfgruppen und daher für die Effektivität der molekularen Pinzette verantwortlich. Durch die Bindung an die Lipidkopfgruppen in der äußeren Lipidschicht wird aufgrund des erhöhten Platzbedarfes der molekularen Pinzette in der dicht gepackten flüssig-geordneten Phase eine positive Membrankrümmung erzeugt, die in Kombination mit der energetisch ungünstigen Linienspannung an der Phasengrenzfläche eine Ausstülpung der flüssig-geordneten Domäne verursacht. In den komplexen viralen Membranhüllen kann solch eine induzierte Membrankrümmung zur vollständigen Zerstörung der Membran führen.

Druck ist nicht nur ein wichtiger physikalischer Parameter, um strukturelle und dynamische Änderungen in biologischen Systemen und Prozessen näher zu charakterisieren, er hat auch eine große biologische und biotechnologische Bedeutung. Um eine direkte Visualisierung des Druckeffektes auf biologische Systeme zu ermöglichen, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine temperierbare Hochdruckzelle für die Mikroskopie gebaut und getestet werden.

- (VI) Die entwickelte Mikroskopie-Hochdruckzelle, hergestellt aus einer zugfesten Cr-Ni-Cu-Legierung (17-4 PH[®]), konnte in Verbindung mit Einkristalldiamanten mit

einer Dicke von 0,5 mm als Fenstermaterial bei Temperaturen bis 55 °C in einem Druckbereich von 0,1-100 MPa verwendet werden. Durch die Verwendung flacher und optischer Diamantfenster sowie Trockenobjektiven mit variabler Deckglaskorrektur konnten unter Hochdruck Bilder mit guter Qualität aufgenommen werden. Die Funktion der Hochdruckzelle wurde anhand der druckinduzierten Phasentrennung einer bekannten *raft*-ähnlichen Modellmembran bei hohen Temperaturen validiert.

Literaturverzeichnis

- [1] E. Sackmann in *Structure and Dynamics of Membranes - From Cells to Vesicles*, (Hrsg.: R. Lipowsky, E. Sackmann), Handbook of Biological Physics, Elsevier/North Holland, Amsterdam, **1995**, S. 1–63.
- [2] W. Dowhan, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 199–232.
- [3] G. L. Nicolson, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838*, 1451–1466.
- [4] Ü. Coskun, K. Simons, *Structure* **2011**, *19*, 1543–1548.
- [5] G. Van Meer, A. I. P. M. De Kroon, *J. Cell Sci.* **2010**, *124*, 5–8.
- [6] G. Van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 112–124.
- [7] A. H. Merrill, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6387–6422.
- [8] M. Sinensky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, *71*, 522–525.
- [9] C. Tanford, *Science* **1978**, *200*, 1012–1018.
- [10] P. R. Cullis, B. De Kruijff, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *559*, 399–420.
- [11] J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1976**, *72*, 1525–1568.
- [12] J. M. Seddon, R. H. Templer in *Structure and Dynamics of Membranes - From Cells to Vesicles*, (Hrsg.: R. Lipowsky, E. Sackmann), Handbook of Biological Physics, Elsevier/North Holland, Amsterdam, **1995**, S. 97–160.
- [13] J. N. Israelachvili, *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *469*, 221–225.
- [14] D. Marsh, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 3884–3899.
- [15] H. Heerklotz, R. M. Epand, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 271–279.
- [16] J. F. Nagle, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1980**, *31*, 157–195.
- [17] M. Kogut, *Trends Biochem. Sci.* **1980**, *5*, 15–18.
- [18] M. B. Sankaram, T. E. Thompson, *Biochemistry* **1990**, *29*, 10676–10684.
- [19] M. Nielsen, L. Miao, J. H. Ipsen, M. J. Zuckermann, O. G. Mouritsen, *Phys. Rev. E* **1999**, *59*, 5790–5803.
- [20] J. Hjort Ipsen, G. Karlström, O. G. Mouritsen, H. Wennerström, M. J. Zuckermann, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *905*, 162–172.
- [21] E. Overton, *Vjschr. Naturf. Ges. Zürich* **1899**, *44*, 88–135.
- [22] I. Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.* **1917**, *39*, 1848–1906.
- [23] E. Gorter, F. Grendel, *J. Exp. Med.* **1925**, *41*, 439–443.
- [24] E. D. Korn, *Annu. Rev. Biochem.* **1969**, *38*, 263–288.

- [25] G. Guidotti, *Arch. Intern. Med.* **1972**, *129*, 194–201.
- [26] J. F. Danielli, H. Davson, *J. Cell. Comp. Physiol.* **1935**, *5*, 495–508.
- [27] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **1972**, *175*, 720–731.
- [28] J. A. F. Op Den Kamp, *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 47–71.
- [29] P. A. Leventis, S. Grinstein, *Annu. Rev. Biophys.* **2010**, *39*, 407–427.
- [30] P. Müller, A. Herrmann, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 1418–1428.
- [31] P. F. Devaux, R. Morris, *Traffic* **2004**, *5*, 241–246.
- [32] R. A. Schlegel, P. Williamson, *Cell Death Differ.* **2001**, *8*, 551–563.
- [33] D. L. Daleke, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 821–825.
- [34] O. G. Mouritsen, M. Bloom, *Biophys. J.* **1984**, *46*, 141–153.
- [35] L. A. Bagatolli, J. H. Ipsen, A. C. Simonsen, O. G. Mouritsen, *Prog. Lipid Res.* **2010**, *49*, 378–389.
- [36] J. Fantini, F. J. Barrantes, *Front. Physiol.* **2013**, *4*, 31.
- [37] J. E. Harlan, P. J. Hajduk, H. S. Yoon, S. W. Fesik, *Nature* **1994**, *371*, 168–170.
- [38] J. R. Silvius, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1610*, 174–183.
- [39] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, *387*, 569–572.
- [40] K. Simons, D. Toomre, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 31–39.
- [41] E. Sezgin, I. Levental, S. Mayor, C. Eggeling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 361–374.
- [42] A. Kusumi, Y. Sako, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 566–574.
- [43] A. A. Adjei, M. Hidalgo, *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 5386–5403.
- [44] A. D. Cox, S. W. Fesik, A. C. Kimmelman, J. Luo, C. J. Der, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 828–851.
- [45] M. J. Nadolski, M. E. Linder, *FEBS J.* **2007**, *274*, 5202–5210.
- [46] P. T. Englund, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 121–138.
- [47] R. B. Pepinsky, C. Zeng, D. Wen, P. Rayhorn, D. P. Baker, K. P. Williams, S. A. Bixler, C. M. Ambrose, E. A. Garber, K. Miatkowski, F. R. Taylor, E. A. Wang, A. Galdes, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14037–14045.
- [48] I. Tanida, T. Ueno, E. Kominami, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 2503–2518.
- [49] M. D. Resh, *Curr. Biol.* **2013**, *23*, R431–R435.
- [50] T. A. Farazi, G. Waksman, J. I. Gordon, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39501–39504.
- [51] R. M. Peitzsch, S. McLaughlin, *Biochemistry* **1993**, *32*, 10436–10443.
- [52] C. A. Buser, C. T. Sigal, M. D. Resh, S. McLaughlin, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13093–13101.
- [53] S. McLaughlin, A. Aderem, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 272–276.
- [54] 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*, 1746–1752.
- [55] S. Shahinian, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1995**, *34*, 3813–3822.

-
- [56] F. L. Zhang, P. J. Casey, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 241–269.
- [57] I. M. Ahearn, K. Haigis, D. Bar-Sagi, M. R. Philips, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 39–51.
- [58] J. F. Hancock, H. Paterson, C. J. Marshall, *Cell* **1990**, *63*, 133–139.
- [59] M. Barbacid, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 779–827.
- [60] A. U. Newlaczyl, J. M. Coulson, I. A. Prior, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41297.
- [61] H. R. Bourne, D. A. Sanders, F. McCormick, *Nature* **1991**, *349*, 117–127.
- [62] J. L. Bos, H. Rehmann, A. Wittinghofer, *Cell* **2007**, *129*, 865–877.
- [63] I. R. Vetter, A. Wittinghofer, *Science* **2001**, *294*, 1299–1304.
- [64] G. Buhrman, C. O’Connor, B. Zerbe, B. M. Kearney, R. Napoleon, E. A. Kovrigina, S. Vajda, D. Kozakov, E. L. Kovrigin, C. Mattos, *J. Mol. Biol.* **2011**, *413*, 773–789.
- [65] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.
- [66] D. Abankwa, A. A. Gorfe, K. Inder, J. F. Hancock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1130–1135.
- [67] J. A. Parker, C. Mattos, *Mol. Cancer Res.* **2015**, *13*, 595–603.
- [68] J. F. Hancock, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 373–385.
- [69] S. Eisenberg, Y. I. Henis, *Cell. Signal.* **2008**, *20*, 31–39.
- [70] M. Katz, I. Amit, Y. Yarden, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1773*, 1161–1176.
- [71] J. Downward, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 11–22.
- [72] I. A. Prior, P. D. Lewis, C. Mattos, *Cancer Res.* **2012**, *72*, 2457–2467.
- [73] T. J. Boggon, M. J. Eck, *Oncogene* **2004**, *23*, 7918–7927.
- [74] S. M. Thomas, J. S. Brugge, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13*, 513–609.
- [75] M. T. Brown, J. A. Cooper, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1287*, 121–149.
- [76] K. B. Kaplan, J. R. Swedlow, H. E. Varmus, D. O. Morgan, *J. Cell Biol.* **1992**, *118*, 321–333.
- [77] E. Sandilands, C. Cans, V. J. Fincham, V. G. Brunton, H. Mellor, G. C. Prendergast, J. C. Norman, G. Superti-Furga, M. C. Frame, *Dev. Cell* **2004**, *7*, 855–869.
- [78] K. Kasahara, Y. Nakayama, A. Kihara, D. Matsuda, K. Ikeda, T. Kuga, Y. Fukumoto, Y. Igarashi, N. Yamaguchi, *Exp. Cell Res.* **2007**, *313*, 2651–2666.
- [79] J. B. Reinecke, D. Katafiasz, N. Naslavsky, S. Caplan, *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 1684–1698.
- [80] M. D. Resh, *Cell* **1994**, *76*, 411–413.
- [81] E. Sandilands, V. G. Brunton, M. C. Frame, *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 2555–2564.
- [82] D. Filipp, M. Julius, *Mol. Immunol.* **2004**, *41*, 645–656.
- [83] L. Maksumova, H. T. Le, F. Muratkhodjaev, D. Davidson, A. Veillette, C. J. Pallen, *J. Immunol.* **2005**, *175*, 7947–7956.
- [84] R. Ishizawar, S. J. Parsons, *Cancer Cell* **2004**, *6*, 209–214.

- [85] F. R. Cross, E. A. Garber, D. Pellman, H. Hanafusa, *Mol. Cell. Biol.* **1984**, *4*, 1834–1842.
- [86] M. P. Kamps, J. E. Buss, B. M. Sefton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 4625–4628.
- [87] T. G. Bivona, S. E. Quatela, B. O. Bodemann, I. M. Ahearn, M. J. Soskis, A. Mor, J. Miura, H. H. Wiener, L. Wright, S. G. Saba, D. Yim, A. Fein, I. Pérez De Castro, C. Li, C. B. Thompson, A. D. Cox, M. R. Philips, *Mol. Cell* **2006**, *21*, 481–493.
- [88] S.-Y. Zhang, B. Sperlich, F.-Y. Li, S. Al-Ayoubi, H.-X. Chen, Y.-F. Zhao, Y.-M. Li, K. Weise, R. Winter, Y.-X. Chen, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 1703–1710.
- [89] J. S. Goodwin, K. R. Drake, C. Rogers, L. Wright, J. Lippincott-Schwartz, M. R. Philips, A. K. Kenworthy, *J. Cell Biol.* **2005**, *170*, 261–272.
- [90] M. D. Resh, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 584–590.
- [91] J. B. Ames, R. Ishima, T. Tanaka, J. I. Gordon, L. Stryer, M. Ikura, *Nature* **1997**, *389*, 198–202.
- [92] J. Goldberg, *Cell* **1998**, *95*, 237–248.
- [93] H. Zhang, R. Constantine, S. Vorobiev, Y. Chen, J. Seetharaman, Y. J. Huang, R. Xiao, G. T. Montelione, C. D. Gerstner, M. W. Davis, G. Inana, F. G. Whitby, E. M. Jorgensen, C. P. Hill, L. Tong, W. Baehr, *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 874–880.
- [94] A. D. Konitsiotis, L. Rojčić, Mannek, A. Stanoev, M. Schmick, P. I. H. Bastiaens, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 114.
- [95] O. Pylypenko, A. Rak, T. Durek, S. Kushnir, B. E. Dursina, N. H. Thomae, A. T. Constantinescu, L. Brunsveld, A. Watzke, H. Waldmann, R. S. Goody, K. Alexandrov, *EMBO J.* **2006**, *25*, 13–23.
- [96] G. R. Hoffman, N. Nassar, R. A. Cerione, *Cell* **2000**, *100*, 345–356.
- [97] U. Sivars, D. Aivazian, S. R. Pfeffer, *Nature* **2003**, *425*, 856–859.
- [98] R. N. Collins, *Mol. Cell* **2003**, *12*, 1064–1066.
- [99] A. Paz, R. Haklai, G. Elad-Sfadia, E. Ballan, Y. Kloog, *Oncogene* **2001**, *20*, 7486–7493.
- [100] G. Elad-Sfadia, R. Haklai, E. Balan, Y. Kloog, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 34922–34930.
- [101] V. Nancy, I. Callebaut, A. El Marjou, J. De Gunzburg, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 15076–15084.
- [102] A. Chandra, H. E. Grecco, V. Pisupati, D. Perera, L. Cassidy, F. Skoulidis, S. A. Ismail, C. Hedberg, M. Hanzal-Bayer, A. R. Venkitaraman, A. Wittinghofer, P. I. H. Bastiaens, *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 148–158.
- [103] P. Villalonga, C. López-Alcalá, M. Bosch, A. Chiloeches, N. Rocamora, J. Gil, R. Marais, C. J. Marshall, O. Bachs, N. Agell, *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 7345–7354.
- [104] R. S. Sidhu, R. R. Clough, R. P. Bhullar, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *304*, 655–660.

-
- [105] L.-R. Wu, Ling-Jia and Xu, J.-M. Liao, Y. Chen, Jie and Liang, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21929.
- [106] S. J. Abraham, R. P. Nolet, R. J. Calvert, L. M. Anderson, V. Gaponenko, *Biochemistry* **2009**, *48*, 7575–7583.
- [107] M. Matsubara, T. Nakatsu, H. Kato, H. Taniguchi, *EMBO J.* **2004**, *23*, 712–718.
- [108] I. A. Prior, J. F. Hancock, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2012**, *23*, 145–153.
- [109] J. L. Cereghino, J. M. Cregg, *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, *24*, 45–66.
- [110] D. J. Manstein, K. M. Ruppel, L. Kubalek, J. A. Spudich, *J. Cell Sci. Suppl.* **1991**, *14*, 63–65.
- [111] M. B. Slade, K. R. Emslie, K. L. Williams, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1997**, *14*, 1–36.
- [112] T. A. Kost, J. P. Condeary, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 428–433.
- [113] F. Baneyx, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 411–421.
- [114] T. Mejuch, H. Waldmann, *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 1771–1783.
- [115] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705–6710.
- [116] T. W. Muir, *Ann. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249–289.
- [117] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
- [118] B. Bader, K. Kuhn, D. J. Owen, H. Waldmann, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, *Nature* **2000**, *403*, 223–226.
- [119] A. Dementiev, *Prot. Expr. Purif.* **2012**, *84*, 86–93.
- [120] 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*, 6090–6095.
- [121] C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray, *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2411–2423.
- [122] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [123] K. L. Holmes, L. M. Lantz in *Cytometry*, Methods in Cell Biology, Academic Press, **2001**, S. 185–204.
- [124] C. P. Toseland, *J. Chem. Biol.* **2013**, *6*, 85–95.
- [125] N. Erwin, B. Sperlich, G. Garivet, H. Waldmann, K. Weise, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 8954–8962.
- [126] O. Rocks, A. Peyker, P. I. H. Bastiaens, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 351–357.
- [127] S. Kapoor, K. Weise, M. Erkkamp, G. Triola, H. Waldmann, R. Winter, *Eur. Biophys. J.* **2012**, *41*, 801–813.
- [128] P. Prakash, A. A. Gorfe, *Small GTPases* **2017**, *8*, 129–138.
- [129] T. Tian, A. Harding, K. Inder, S. Plowman, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 905–914.
- [130] S. J. Plowman, N. Ariotti, A. Goodall, R. G. Parton, J. F. Hancock, *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 4377–4385.

- [131] Y. Zhou, J. F. Hancock, *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1853*, 841–849.
- [132] 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*, 192–201.
- [133] K. Weise, G. Triola, L. Brunsveld, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1557–1564.
- [134] 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*, 880–887.
- [135] J. Omerovic, D. Hammond, M. J. Clague, I. Prior, *Oncogene* **2008**, *27*, 2754–2762.
- [136] E. Eccleston, B. J. Leonard, J. S. Lowe, H. J. Welford, *Nature New Biol.* **1973**, *244*, 73–76.
- [137] E. Passante, C. Ehrhardt, H. Sheridan, N. Frankish, *Inflamm. Res.* **2009**, *58*, 611–618.
- [138] J. Seeliger, N. Erwin, C. Rosin, M. Kahse, K. Weise, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 7507–7513.
- [139] E. G. Bligh, W. J. Dyer, *Can. J. Biochem. Phys.* **1959**, *37*, 911–917.
- [140] G. R. Bartlett, *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 466–468.
- [141] N. Erwin, Masterarbeit, Technische Universität Dortmund, **2014**.
- [142] M. I. Angelova, D. S. Dimitrov, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, *81*, 303–311.
- [143] J. P. Reeves, R. M. Dowben, *J. Cell. Physiol.* **1969**, *73*, 49–60.
- [144] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675.
- [145] R. Leventis, J. R. Silvius, *Biochemistry* **1998**, *37*, 7640–7648.
- [146] L. Janosi, A. A. Gorfe, *Biophys. J.* **2010**, *99*, 3666–3674.
- [147] B. Sperlich, S. Kapoor, H. Waldmann, R. Winter, K. Weise, *Biophys. J.* **2016**, *111*, 113–122.
- [148] S. McLaughlin, D. Murray, *Nature* **2005**, *438*, 605–611.
- [149] T. Yeung, G. E. Gilbert, J. Shi, J. Silvius, A. Kapus, S. Grinstein, *Science* **2008**, *319*, 210–213.
- [150] H. Jang, S. J. Abraham, T. S. Chavan, B. Hitchinson, L. Khavrutskii, N. I. Tarasova, R. Nussinov, V. Gaponenko, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 9465–9477.
- [151] 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.* **2009**, *48*, 8784–8787.
- [152] R. E. Scott, *Science* **1976**, *194*, 743–745.
- [153] R. E. Scott, P. B. Maercklein, *J. Cell Sci.* **1979**, *35*, 245–252.
- [154] E. Sezgin, H.-J. Kaiser, T. Baumgart, P. Schwille, K. Simons, I. Levental, *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 1042–1051.
- [155] T. Baumgart, A. T. Hammond, P. Sengupta, S. T. Hess, D. A. Holowka, B. A. Baird, W. W. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 3165–3170.

-
- [156] K. Kuhn, D. J. Owen, B. Bader, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1023–1035.
- [157] J. Gießlenhaupt, T. Rudack, P. Bachler, D. Mann, G. Triola, H. Waldmann, C. Küttling, K. Gerwert, *Biophys. J.* **2012**, *103*, 1585–1593.
- [158] P. I. Kuzmin, S. A. Akimov, Y. A. Chizmadzhev, J. Zimmerberg, F. S. Cohen, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 1120–1133.
- [159] K. Simons, W. L. C. Vaz, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, *33*, 269–295.
- [160] J. Folch, M. Lees, G. H. S. Stanley, *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509.
- [161] N. Erwin, S. Patra, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 30020–30028.
- [162] K. L. Yap, J. Kim, K. Truong, M. Sherman, T. Yuan, M. Ikura, *J. Struct. Funct. Genomics* **2000**, *1*, 8–14.
- [163] H. Tidow, P. Nissen, *FEBS J.* **2013**, *280*, 5551–5565.
- [164] E. Thulin, A. Andersson, T. Drakenberg, S. Forsén, H. J. Vogel, *Biochemistry* **1984**, *23*, 1862–1870.
- [165] M. Zhang, T. Tanaka, M. Ikura, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1995**, *2*, 758–767.
- [166] H. Kuboniwa, N. Tjandra, S. Grzesiek, H. Ren, C. B. Klee, A. Bax, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 768–776.
- [167] G. Barbato, M. Ikura, L. E. Kay, R. W. Pastor, A. Bax, *Biochemistry* **1992**, *31*, 5269–5278.
- [168] Y. S. Babu, J. S. Sack, T. J. Greenhough, C. E. Bugg, A. R. Means, W. J. Cook, *Nature* **1985**, *315*, 37–40.
- [169] R. Chattopadhyaya, W. E. Meador, A. R. Means, F. A. Quiocho, *J. Mol. Biol.* **1992**, *228*, 1177–1192.
- [170] M. A. Wilson, A. T. Brunger, *J. Mol. Biol.* **2000**, *301*, 1237–1256.
- [171] B. A. Seaton, J. F. Head, D. M. Engelman, F. M. Richards, *Biochemistry* **1985**, *24*, 6740–6743.
- [172] J. L. Baber, A. Szabo, N. Tjandra, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3953–3959.
- [173] N. P. Barton, C. S. Verma, L. S. D. Caves, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 11036–11040.
- [174] C. M. Shepherd, H. J. Vogel, *Biophys. J.* **2004**, *87*, 780–791.
- [175] V. Kumar, V. P. R. Chichili, X. Tang, J. Sivaraman, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54834.
- [176] J. L. Fallon, F. A. Quiocho, *Structure* **2003**, *11*, 1303–1307.
- [177] D. Shukla, A. Peck, V. S. Pande, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10910.
- [178] J. Gsponer, J. Christodoulou, A. Cavalli, J. M. Bui, B. Richter, C. M. Dobson, M. Vendruscolo, *Structure* **2008**, *16*, 736–746.
- [179] N. J. Anthis, M. Doucleff, G. M. Clore, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18966–18974.
- [180] A. P. Yamniuk, H. J. Vogel, *Mol. Biotechnol.* **2004**, *27*, 33–57.
- [181] A. Crivici, M. Ikura, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 85–116.

- [182] M. Osawa, H. Tokumitsu, M. B. Swindells, H. Kurihara, M. Orita, T. Shibamura, T. Furuya, M. Ikura, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1999**, *6*, 819–824.
- [183] P. C. Weber, T. J. Lukas, T. A. Craig, E. Wilson, M. M. King, A. P. Kwiatkowski, D. M. Watterson, *Proteins*. **1989**, *6*, 70–85.
- [184] N. Hayashi, M. Matsubara, Y. Jinbo, K. Titani, Y. Izumi, N. Matsushima, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 529–537.
- [185] M. Matsubara, K. Titani, H. Taniguchi, N. Hayashi, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 48898–48902.
- [186] H. Frauenfelder, F. Parak, R. D. Young, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1988**, *17*, 451–479.
- [187] D. D. Boehr, R. Nussinov, P. E. Wright, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 789–796.
- [188] K. Akasaka, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1814–1835.
- [189] H. Frauenfelder, N. Alberding, A. Ansari, D. Braunstein, B. Cowen, M. Hong, I. Iben, J. Johnson, S. Luck, M. Marden, J. Mourant, P. Ormos, L. Reinisch, R. Scholl, A. Schulte, E. Shyamsunder, L. Sorensen, P. Steinbach, A. Xie, R. Young, K. Yue, *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 1024–1037.
- [190] J. L. Silva, D. Foguel, C. A. Royer, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 612–618.
- [191] T. Q. Luong, S. Kapoor, R. Winter, *ChemPhysChem* **2015**, *16*, 3555–3571.
- [192] H. Frauenfelder, S. G. Sligar, P. G. Wolynes, *Science* **1991**, *254*, 1598–1603.
- [193] S. Kapoor, G. Triola, I. R. Vetter, M. Erlkamp, H. Waldmann, R. Winter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 460–465.
- [194] H. R. Kalbitzer, M. Spoerner, P. Ganser, C. Hozsa, W. Kremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16714–16719.
- [195] A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson, R. G. Bates, *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 700–706.
- [196] P. T. T. Wong, D. J. Moffat, *Appl. Spectrosc.* **1989**, *43*, 1279–1281.
- [197] H. H. Mantsch, D. J. Moffatt, H. L. Casal, *J. Mol. Struct.* **1988**, *173*, 285–298.
- [198] D. Svergun, *J. Appl. Crystallogr.* **1992**, *25*, 495–503.
- [199] P. Kapusta, M. Wahl, A. Benda, M. Hof, J. Enderlein, *J. Fluoresc.* **2007**, *17*, 43–48.
- [200] P. Kapusta, *Application Note PicoQuant GmbH* **2010**, Rev. 1.
- [201] W. Al-Soufi, B. Reija, M. Novo, S. Felekyan, R. Kühnemuth, C. A. M. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8775–8784.
- [202] H. Fabian, T. Yuan, H. J. Vogel, H. H. Mantsch, *Eur. Biophys. J.* **1996**, *24*, 195–201.
- [203] J. Kong, S. Yu, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, *39*, 549–559.
- [204] S. R. Martin, P. M. Bayley, *Biochem. J.* **1986**, *238*, 485–490.
- [205] J. Trehwella, W. K. Liddle, D. B. Heidorn, N. Strynadka, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1294–1301.
- [206] M. Jackson, P. I. Haris, D. Chapman, *Biochemistry* **1991**, *30*, 9681–9686.

-
- [207] D. M. Byler, H. Susi, *Biopolymers* **1986**, *25*, 469–487.
- [208] F. Meersman, L. Smeller, K. Heremans, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 2635–2644.
- [209] H. Imamura, M. Kato, *Proteins*. **2009**, *75*, 911–918.
- [210] H. Imamura, Y. Isogai, T. Takekiyo, M. Kato, *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804*, 193–198.
- [211] G. A. P. de Oliveira, C. B. Rocha, M. d. A. Marques, Y. Cordeiro, M. M. Sorenson, D. Foguel, J. L. Silva, M. C. Suarez, *Biochemistry* **2013**, *52*, 28–40.
- [212] W. Dzwolak, M. Kato, Y. Taniguchi, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*, 131–144.
- [213] L. Masino, S. R. Martin, P. M. Bayley, *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1519–1529.
- [214] G. Gibrat, G. H. B. Hoa, C. T. Craescu, L. Assairi, Y. Blouquit, B. Annighöfer, R. P. May, M.-C. Bellissent-Funel, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1844*, 1560–1568.
- [215] C. A. Royer, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*, 201–209.
- [216] M. Nara, H. Morii, M. Tanokura, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 2319–2327.
- [217] W. Dzwolak, M. Kato, A. Shimizu, Y. Taniguchi, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1433*, 45–55.
- [218] J. Somkuti, M. Bublin, H. Breiteneder, L. Smeller, *Biochemistry* **2012**, *51*, 5903–5911.
- [219] A. Malmendal, J. Evenäs, S. Forsén, M. Akke, *J. Mol. Biol.* **1999**, *293*, 883–899.
- [220] D. Foguel, M. C. Suarez, C. Barbosa, J. J. Rodrigues, M. M. Sorenson, L. B. Smillie, J. L. Silva, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 10642–10646.
- [221] H. Y. Park, S. A. Kim, J. Korlach, E. Rhoades, L. W. Kwok, W. R. Zipfel, M. N. Waxham, W. W. Webb, L. Pollack, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 542–547.
- [222] C. L. Drum, S.-Z. Yan, J. Bard, Y.-Q. Shen, D. Lu, S. Soelaiman, Z. Grabarek, A. Bohm, W.-J. Tang, *Nature* **2002**, *415*, 396–402.
- [223] N. Hayashi, Y. Izumi, K. Titani, N. Matsushima, *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1905–1913.
- [224] H. Jang, A. Banerjee, T. Chavan, V. Gaponenko, R. Nussinov, *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 12544–12559.
- [225] J. K. Kranz, P. F. Flynn, E. J. Fuentes, A. J. Wand, *Biochemistry* **2002**, *41*, 2599–2608.
- [226] M. R. Ehrhardt, L. Erijman, G. Weber, A. J. Wand, *Biochemistry* **1996**, *35*, 1599–1605.
- [227] E. Nelli, D. Mridula, M. Tom, W. Herbert, R. Winter, *ChemBioChem* **2018**, *akzeptiert*.
- [228] R. B. Irby, T. J. Yeatman, *Oncogene* **2000**, *19*, 5636–5642.
- [229] S. Barker, D. B. Kassel, D. Weigl, X. Huang, M. Luther, W. B. Knight, *Biochemistry* **1995**, *34*, 14843–14851.
- [230] L. Silverman, M. D. Resh, *J. Cell Biol.* **1992**, *119*, 415–425.
- [231] K. Weise, D. Huster, S. Kapoor, G. Triola, H. Waldmann, R. Winter, *Faraday Discuss.* **2013**, *161*, 549–561.

- [232] M. Hanzal-Bayer, L. Renault, P. Roversi, A. Wittinghofer, R. C. Hillig, *EMBO J.* **2002**, *21*, 2095–2106.
- [233] R. Constantine, H. Zhang, C. D. Gerstner, J. M. Frederick, W. Baehr, *Vision Res.* **2012**, *75*, 26–32.
- [234] T. Mejuch, H. van Hattum, G. Triola, M. Jaiswal, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 2460–2465.
- [235] M. Jaiswal, E. K. Fansa, S. K. Kießling, T. Mejuch, H. Waldmann, A. Wittinghofer, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 20766–20778.
- [236] K. N. Gopalakrishna, K. Doddapuneni, K. K. Boyd, I. Masuho, K. A. Martemyanov, N. O. Artemyev, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 28954–28962.
- [237] M. M. Gorska, Q. Liang, Z. Karim, R. Alam, *J. Immunol.* **2009**, *183*, 1675–1684.
- [238] T. Mejuch, G. Garivet, W. Hofer, N. Kaiser, E. K. Fansa, C. Ehrt, O. Koch, M. Baumann, S. Ziegler, A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed* **2017**, *56*, 6181–6186.
- [239] M. J. Hope, M. B. Bally, L. D. Mayer, A. S. Janoff, P. R. Cullis, *Chem. Phys. Lipids* **1986**, *40*, 89–107.
- [240] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Aufl., Springer US, New York, **2006**.
- [241] R. F. Kubin, A. N. Fletcher, *J. Lumin.* **1982**, *27*, 455–462.
- [242] T. D. Pollard, E. M. De La Cruz, *Mol. Biol. Cell* **2013**, *24*, 1103–1110.
- [243] M. Dwivedi, T. Mejuch, H. Waldmann, R. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10511–10515.
- [244] S. Veltel, A. Kravchenko, S. Ismail, A. Wittinghofer, *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 2501–2507.
- [245] A.-L. Le Roux, M. A. Busquets, F. Sagués, M. Pons, *Colloids Surf. B* **2016**, *138*, 17–25.
- [246] H. Gerlach, V. Laumann, S. Martens, C. F. W. Becker, R. S. Goody, M. Geyer, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 46–53.
- [247] K. Weise, S. Kapoor, A. Werkmüller, S. Mübitz, G. Zimmermann, G. Triola, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem Soc.* **2012**, *134*, 11503–11510.
- [248] A. Gohlke, G. Triola, H. Waldmann, R. Winter, *Biophys. J.* **2010**, *98*, 2226–2235.
- [249] D. Murray, L. Hermida-Matsumoto, C. A. Buser, J. Tsang, C. T. Sigal, N. Ben-Tal, B. Honig, M. D. Resh, S. McLaughlin, *Biochemistry* **1998**, *37*, 2145–2159.
- [250] H. A. Scheidt, J. Klingler, D. Huster, S. Keller, *Biophys. J.* **2015**, *109*, 586–594.
- [251] A.-L. Le Roux, B. Castro, E. T. Garbacik, M. F. Garcia Parajo, M. Pons, *ChemistrySelect* **2016**, *4*, 642–647.
- [252] H. A. Scheidt, D. Huster, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 3663–3672.
- [253] E. Lump, L. Castellano, C. Meier, J. Seeliger, N. Erwin, B. Sperlich, C. Stürzel, S. Usmani, R. Hammond, J. Von Einem, G. Gerold, F. Kreppel, K. Bravo-Rodriguez,

-
- T. Pietschmann, V. Holmes, D. Palesch, O. Zirafi, D. Weissman, A. Sowislok, B. Wettig, C. Heid, F. Kirchhoff, T. Weil, F. Kljörner, T. Schrader, G. Bitan, E. Sanchez-Garcia, R. Winter, J. Shorter, J. Mjñch, *eLife* **2015**, *4*, e05397.
- [254] J. C. Rice, C. Allis, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 263–273.
- [255] L. O. Tjernberg, C. Lilliehiöjk, D. J. E. Callaway, J. Nilslund, S. Hahne, J. Thyberg, L. Terenius, C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 12601–12605.
- [256] M. Fokkens, T. Schrader, F.-G. Kljörner, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14415–14421.
- [257] S. Sinha, D. H. J. Lopes, Z. Du, E. S. Pang, A. Shanmugam, A. Lomakin, P. Talbiersky, A. Tennstaedt, K. McDaniel, R. Bakshi, P.-Y. Kuo, M. Ehrmann, G. B. Benedek, J. A. Loo, F.-G. Kljörner, T. Schrader, C. Wang, G. Bitan, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16958–16969.
- [258] D. H. J. Lopes, A. Attar, G. Nair, E. Y. Hayden, Z. Du, K. McDaniel, S. Dutt, H. Bandmann, K. Bravo-Rodriguez, S. Mittal, F.-G. Kljörner, C. Wang, E. Sanchez-Garcia, T. Schrader, G. Bitan, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1555–1569.
- [259] S. Prabhudesai, S. Sinha, A. Attar, A. Kotagiri, A. G. Fitzmaurice, R. Lakshmanan, M. I. Ivanova, J. A. Loo, F.-G. Kljörner, T. Schrader, M. Stahl, G. Bitan, J. M. Bronstein, *Neurotherapeutics* **2012**, *9*, 464–476.
- [260] J. Mjñch, E. Rjcker, L. Stjndker, K. Adermann, C. Goffinet, M. Schindler, S. Wildum, R. Chinnadurai, D. Rajan, A. Specht, G. Giménez-Gallego, P. C. Sánchez, D. M. Fowler, A. Koulov, J. W. Kelly, W. Mothes, J.-C. Grivel, L. Margolis, O. T. Keppler, W.-G. Forssmann, F. Kirchhoff, *Cell* **2007**, *131*, 1059–1071.
- [261] B. Brjgger, B. Glass, P. Haberkant, I. Leibrecht, F. T. Wieland, H.-G. Krjusslich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2641–2646.
- [262] M. J. Gerl, J. L. Sampaio, S. Urban, L. Kalvodova, J.-M. Verbavatz, B. Binnington, D. Lindemann, C. A. Lingwood, A. Shevchenko, C. Schroeder, K. Simons, *J. Cell Biol.* **2012**, *196*, 213–221.
- [263] M. Lorizate, T. Sachsenheimer, B. Glass, A. Habermann, M. J. Gerl, H.-G. Krjusslich, B. Brjgger, *Cell. Microbiol.* **2013**, *15*, 292–304.
- [264] F. Jjlicher, R. Lipowsky, *Phys. Rev. Lett.* **1993**, *70*, 2964–2967.
- [265] R. Lipowsky, *J. Biol. Phys.* **2002**, *28*, 195–210.
- [266] R. Lipowsky, *Biophys. J.* **1993**, *64*, 1133–1138.
- [267] S. Dutt, C. Wilch, T. Gersthagen, P. Talbiersky, K. Bravo-Rodriguez, M. Hanni, E. Sánchez-García, C. Ochsenfeld, F.-G. Kljörner, T. Schrader, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 6721–6734.
- [268] K. Bacia, P. Schwille, T. Kurzchalia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 3272–3277.
- [269] G. Staneva, M. Seigneuret, K. Koumanov, G. Trugnan, M. I. Angelova, *Chem. Phys. Lipids* **2005**, *136*, 55–66.

- [270] I. A. T. Schaap, F. Eghiaian, A. des Georges, C. Veigel, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 41078–41088.
- [271] M. Fokkens, C. Jasper, T. Schrader, F. Koziol, C. Ochsenfeld, J. Polkowska, M. Lobert, B. Kahlert, F.-G. Klüßner, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 477–494.
- [272] C. Jasper, T. Schrader, J. Panitzky, F.-G. Klüßner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1355–1358.
- [273] F.-G. Klüßner, T. Schrader, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 967–978.
- [274] C. Rosin, K. Estel, J. Hülker, R. Winter, *ChemPhysChem* **2015**, *16*, 1379–1385.
- [275] D. H. Bartlett, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*, 367–381.
- [276] R. Winter, C. Jeworrek, *Soft Matter* **2009**, *5*, 3157–3173.
- [277] R. Winter, D. Lopes, S. Grudzielanek, K. Vogtt, *J. Non-Equilib. Thermodyn.* **2007**, *32*, 41–97.
- [278] R. Winter, W. Dzwolak, *Phil. Trans. R. Soc. A* **2005**, *363*, 537–563.
- [279] F. Meersman, I. Daniel, D. H. Bartlett, R. Winter, R. Hazael, P. F. McMillan, *Rev. Mineral. Geochem.* **2013**, *75*, 607–648.
- [280] R. Hazael, F. Meersman, F. Ono, P. F. McMillan, *Life* **2016**, *6*, 34.
- [281] M.-V. Muntean, O. Marian, V. Barbieru, G. M. Cătunescu, O. Ranta, I. Drocas, S. Terhes, *Agric. Agric. Sci. Procedia* **2016**, *10*, 377–383.
- [282] P. Masson, C. Tonello, C. Balny, *J. Biomed. Biotechnol.* **2001**, *1*, 85–88.
- [283] B. Frey, M. Hartmann, M. Herrmann, R. Meyer-Pittroff, K. Sommer, G. Bluemelhuber, *Microsc. Res. Tech.* **2006**, *69*, 65–72.
- [284] P. M. Oger, I. Daniel, A. Picard, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1764*, 434–442.
- [285] M. Nishiyama, Y. Kimura, Y. Nishiyama, M. Terazima, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 1142–1150.
- [286] H. Vass, S. L. Black, E. M. Herzig, F. B. Ward, P. S. Clegg, R. J. Allen, *Rev. Sci. Instrum.* **2010**, *81*, 053710.
- [287] N. L. C. McCarthy, O. Ces, R. V. Law, J. M. Seddon, N. J. Brooks, *Chem. Comm.* **2015**, *51*, 8675–8678.
- [288] K. S. Horger, D. J. Estes, R. Capone, M. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1810–1819.
- [289] F.-C. Tsai, B. Stuhmann, G. H. Koenderink, *Langmuir* **2011**, *27*, 10061–10071.
- [290] H. L. D. Pugh, *Mechanical behaviour of materials under pressure*, Applied Science Publishers, London, **1970**.
- [291] The Element Six CVD Diamond Handbook, Website, Online erhältlich unter https://e6cvd.com/media/wysiwyg/pdf/E6_CVD_Diamond_Handbook_A5_v10X.pdf abgerufen am 15. Februar 2018.
- [292] R. G. Budynas, W. C. Young, A. M. Sadegh, *Roark's Formulas for Stress and Strain, 8th Edition*, 8. Aufl., McGraw-Hill Education, **2011**.

-
- [293] N. J. Brooks, O. Ces, R. H. Templer, J. M. Seddon, *Chem. Phys. Lipids* **2011**, *164*, 89–98.
- [294] T. C. Poulter, *Phys. Rev.* **1932**, *40*, 860–871.
- [295] Y. Zhou, C. K. Berry, P. A. Storer, R. M. Raphael, *Biomaterials* **2007**, *28*, 1298–1306.
- [296] A. G. Ayuyan, F. S. Cohen, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 2172–2183.
- [297] C. Jeworrek, M. Pijhse, R. Winter, *Langmuir* **2008**, *24*, 11851–11859.
- [298] R. Dimova, S. Aranda, N. Bezlyepkina, V. Nikolov, K. A. Riske, R. Lipowsky, *J. Phys. Condens. Matter* **2006**, *18*, 1151–1176.
- [299] H. Stein, S. Spindler, N. Bonakdar, C. Wang, V. Sandoghdar, *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 63.
- [300] M. K. Doeven, J. H. A. Folgering, V. Krasnikov, E. R. Geertsma, G. van den Bogaart, B. Poolman, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 1134–1142.
- [301] G. van den Bogaart, N. Hermans, V. Krasnikov, A. H. de Vries, B. Poolman, *Biophys. J.* **2007**, *92*, 1598–1605.
- [302] V. Vitkova, J. Genova, M. D. Mitov, I. Bivas, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2006**, *449*, 95–106.
- [303] J. Genova, A. Zheliaskova, M. D. Mitov, *J. Phys. Conf. Ser.* **2010**, *253*, 12063.
- [304] J. Kapla, J. Wohlert, B. Stevansson, O. Engström, G. Widmalm, A. Maliniak, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 6667–6673.
- [305] J. F. Nagle, M. S. Jablin, S. Tristram-Nagle, *Chem. Phys. Lipids* **2016**, *196*, 76–80.
- [306] R. B. Lira, R. Dimova, K. A. Riske, *Biophys. J.* **2014**, *107*, 1609–1619.
- [307] E. R. Dobrovinskaya, L. A. Lytvynov, V. Pishchik, *Sapphire: Material, Manufacturing, Applications*, Springer US, New York, **2009**.
- [308] H. Nakajima in *Optical Design Using Excel®*, John Wiley & Sons, Singapore Pte. Ltd, **2015**, S. 277–278.
- [309] M. Nishiyama, Y. Sowa, *Biophys. J.* **2012**, *102*, 1872–1880.

Anhang

A Weitere Abbildungen

A.1 Plasmidkarte

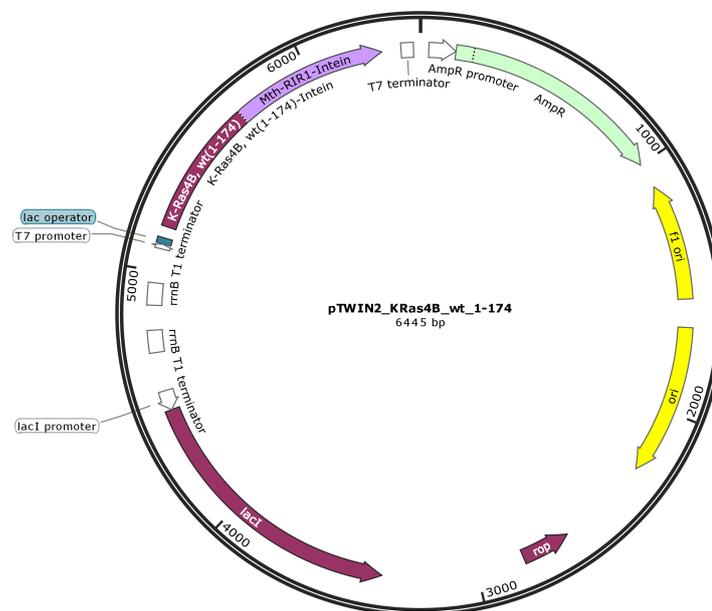


Abb. A.1: Plasmidkarte des Vektors pTWIN2_KRas4B_wt_1-174. Erstellt mit SnapGene.

Proteinsequenz von humanem K-Ras4B Δ 15:

MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLD ILDTAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKRVKDSIED VPMV-LVGNKCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLVRE IRKH-KEKMSKDG

A.2 Fluoreszenzmarkierung mit Maleimid-funktionalisierten Fluorophoren

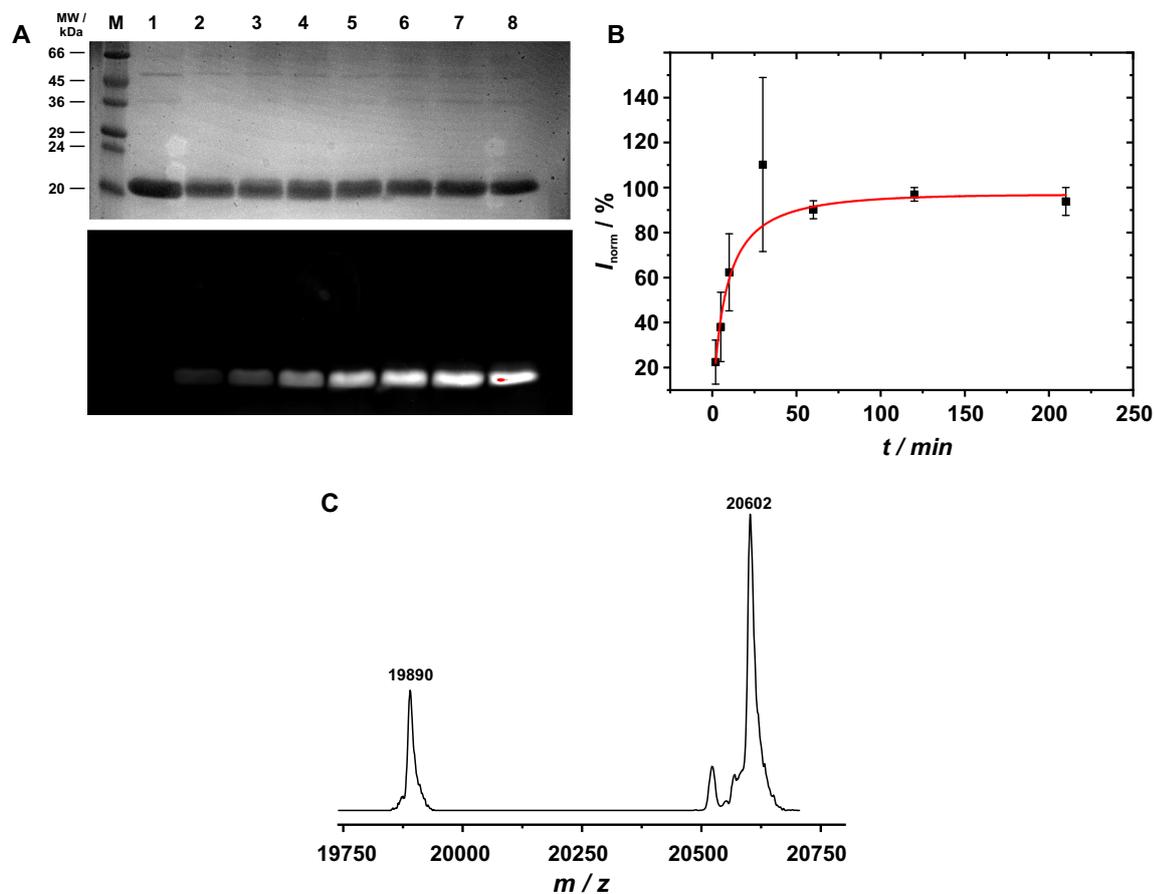


Abb. A.2: Fluoreszenzmarkierung des K-Ras4B-Proteins mit 1,5 Äquivalenten Atto 488-Maleimid. Die Reaktion wurde zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (**1** = 0 min, **2** = 2 min, **3** = 5 min, **4** = 10 min, **5** = 30 min, **6** = 60 min, **7** = 120 min, **8** = 210 min) mit β -Mercaptoethanol gestoppt und mittels SDS-PAGE analysiert (oben: Coomassie, unten: Fluoreszenz bei 488 nm). Als Marker (**M**) wurde der SigmaMarkerTM (*low range*) verwendet (**A**). Die normierten Intensitäten aus dem Fluoreszenzgelbild wurden als Funktion der Zeit aufgetragen (**B**). ESI-MS-Spektrum des K-Ras4B-Proteins ($M_{\text{theo}} = 19888$ g/mol) nach der Fluoreszenzmarkierung (1 h) mit 1,5 Äquivalenten Atto 488-Maleimid ($M_{\text{theo}} = 20608$ g/mol) (**C**).

A.3 Bestimmung der Phospholipidkonzentration

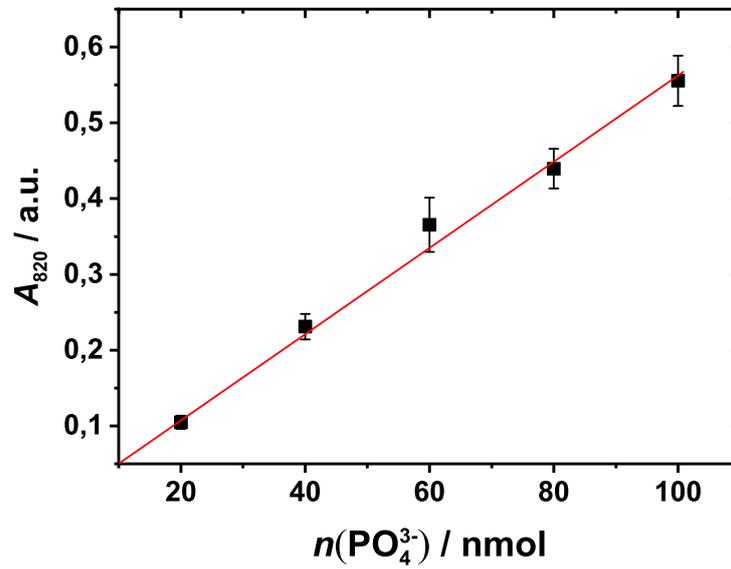


Abb. A.3: Kalibriergerade (rot) zur Bestimmung der Phosphatstoffmenge gemäß dem BARTLETT-Assay. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen. Modifizierter Nachdruck aus Ref. [141].

A.4 FT-IR-Spektren

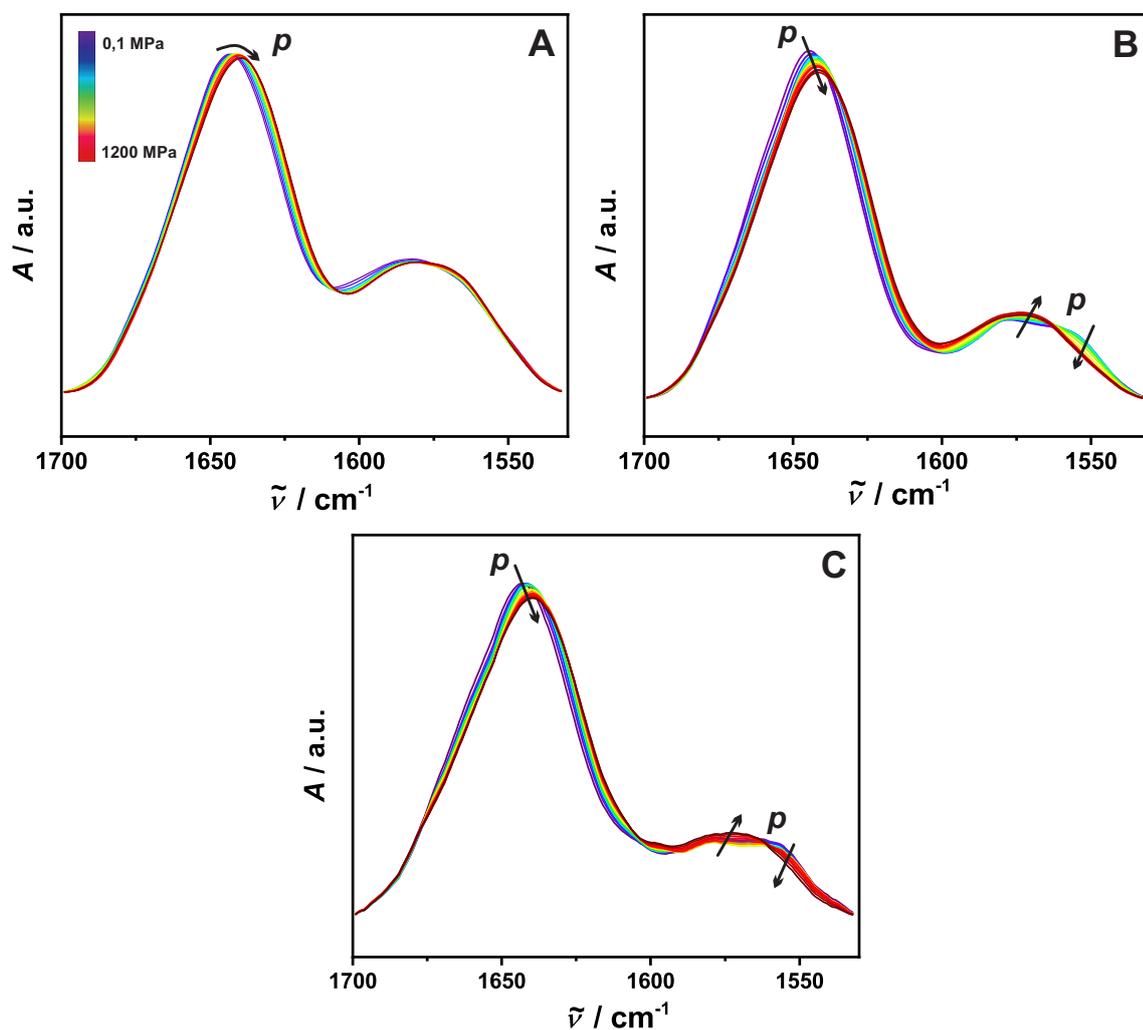


Abb. A.4: Druckabhängige FT-IR-Absorptionsspektren (puffer- und basislinienkorrigiert, flächennormiert) von apo-CaM (A), holo-CaM (B) und holo-CaM/K-Ras4B-Peptid (C) in den jeweiligen D₂O-Puffern bei 25 °C und 0,1-1200 MPa. Adapted from: N. Erwin, S. Patra and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 30020 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

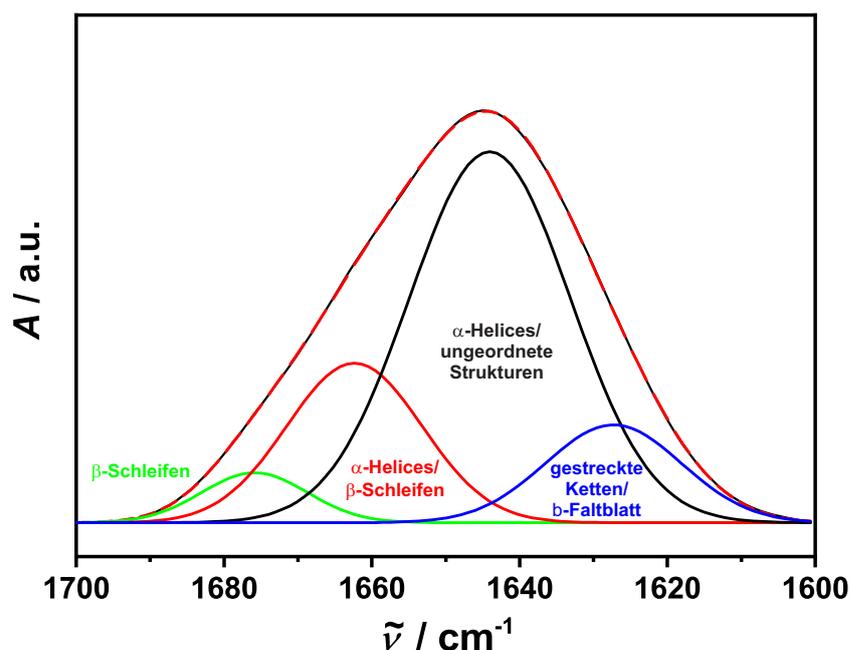


Abb. A.5: Bandenanpassung der Amid-I'-Bande (puffer-, basislinienkorrigiert, flächennormiert) von holo-CaM in D_2O -Puffer bei 25 °C und 0,1 MPa. Die gemessene Kurve ist in schwarz dargestellt. Die angepasste Kurve (rote Linie) ergibt sich aus den zugrunde liegenden Subbanden, die charakteristischen Sekundärstrukturelementen zugeordnet sind. Adapted from: N. Erwin, S. Patra and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 30020 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

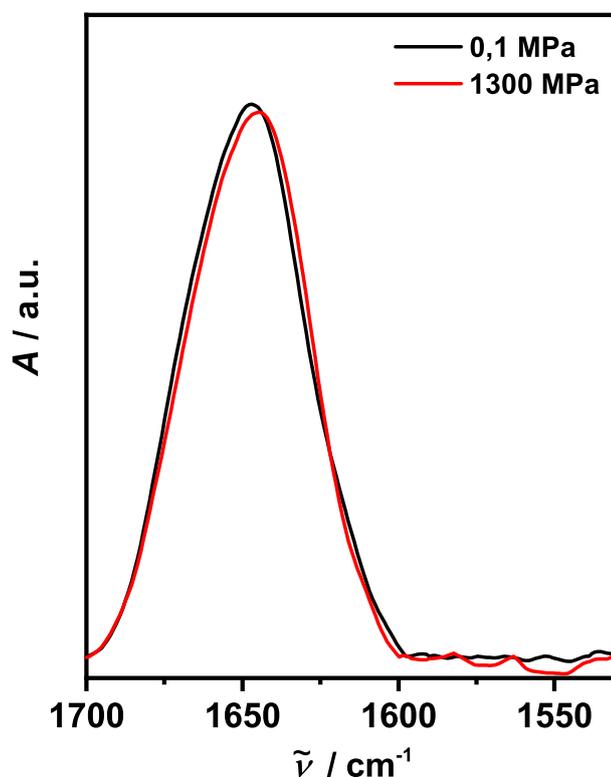


Abb. A.6: FT-IR-Spektren (puffer-, basislinienkorrigiert, flächennormiert) des C-terminalen K-Ras4B-Peptids bei 0,1 MPa und 1300 MPa im Bereich von 1700 bis 1530 cm^{-1} bei 25 °C. Adapted from: N. Erwin, S. Patra and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 30020 - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies.

A.5 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

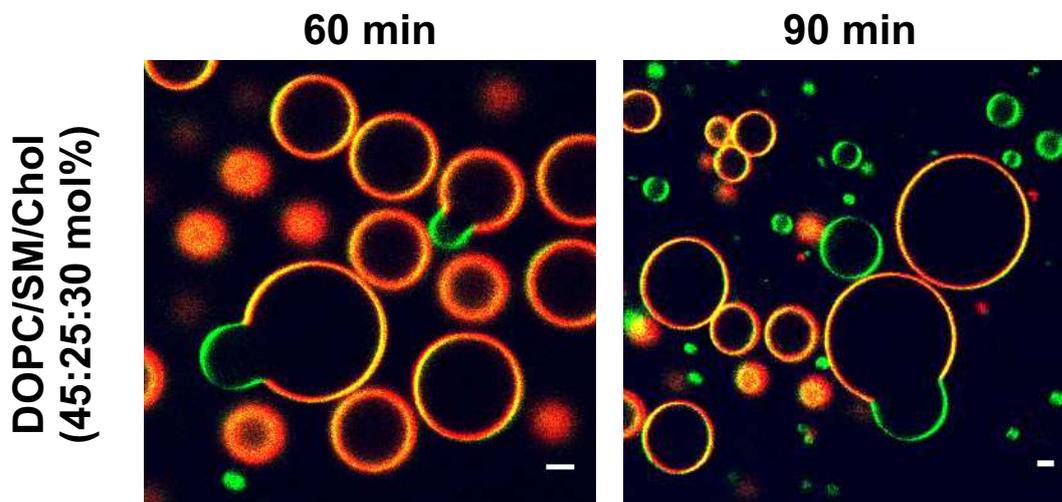


Abb. A.7: Raft-ähnliche Modellmembranen (DOPC/SM/Chol, 45:25:30 mol%) nach der Behandlung mit CLR05. Die l_d - und l_o -Phase dieser Membran sind jeweils mit *N*-Rh-DHPE (0,2 mol%, rot) und BODIPY-Chol (0,1 mol%, grün) sichtbar gemacht. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten in verschiedenen Bereichen. Der Maßstab beträgt 5 μm in den Bildern.

B Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Erwin, Nelli

Name, Vorname
(Surname, first name)

137134

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.

Dortmund, 20.03.2018

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Biophysikalische Einblicke in die Wechselwirkungen von lipidierten Signalproteinen
mit Membranen und Regulatorproteinen

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.

Dortmund, 20.03.2018

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)