**Verknüpfung zwischen Plasmamembran und Zytoskelett:
Charakterisierung der Organisation von Ezrin und
F-Aktin an artifiziellen Lipidmembranen**

Dissertation

zur Erlangung des
mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades
Doctor rerum naturalium
der Georg-August-Universität Göttingen
im Promotionsprogramm Chemie
der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von
Corinna Kramer
aus Haltern

Göttingen 2016

**Verknüpfung zwischen Plasmamembran und Zytoskelett:
Charakterisierung der Organisation von Ezrin und
F-Aktin an artifiziellen Lipidmembranen**

Dissertation

zur Erlangung des
mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades
Doctor rerum naturalium
der Georg-August-Universität Göttingen
im Promotionsprogramm Chemie
der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von
Corinna Kramer
aus Haltern

Göttingen 2016

Betreuungsausschuss:

Prof. Dr. Claudia Steinem,
Institut für Organische und Biomolekulare Chemie,
Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Sarah Köster,
Institut für Röntgenphysik,
Georg-August-Universität Göttingen

Mitglieder der Prüfungskommission:

Referentin: Prof. Dr. Claudia Steinem,
Institut für Organische und Biomolekulare Chemie,
Georg-August-Universität Göttingen

Korreferentin: Prof. Dr. Sarah Köster,
Institut für Röntgenphysik,
Georg-August-Universität Göttingen

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Burkhard Geil,
Institut für Physikalische Chemie,
Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Michael Meinecke,
Zentrum für Biochemie und Molekulare Zellbiologie,
Georg-August-Universität Göttingen

Dr. Florian Rehfeldt,
Drittes Physikalisches Institut,
Georg-August-Universität Göttingen

Dr. Sebastian Kruss,
Institut für Physikalische Chemie,
Georg-August-Universität Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung

14. Juli 2016

Erklärung

Ich, Corinna Kramer, erkläre hiermit, dass meine Doktorarbeit mit dem Titel "Verknüpfung zwischen Plasmamembran und Zytoskelett: Charakterisierung der Organisation von Ezrin und F-Aktin an artifiziellen Lipidmembranen" selbstständig angefertigt wurde und keine anderen Quellen und Hilfen als angegeben verwendet wurden.

Göttingen, 2016

Corinna Kramer

Meiner Familie

Abstract. The dynamic linkage between the plasma membrane and the underlying cytoskeleton of the cell is fundamental for cellular processes like cell morphogenesis, cell motility and cell adhesion. Ezrin as a member of the ERM (ezrin, radixin, moesin) protein family connects L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) of the plasma membrane with filamentous actin (F-actin) of the cytoskeleton. Ezrin binding to F-actin is regulated by the activation state of the protein, which depends on N-terminal PIP₂ binding and phosphorylation of the threonine residue 567. Due to PIP₂ binding and phosphorylation ezrin switches from an inactive, N- and C-terminal associated state to an active, opened conformation which is capable in C-terminal actin binding.

The aim of this study was to investigate aspects of the linkage between plasma membrane and cytoskeleton. Based on ezrin binding to PIP₂ containing artificial lipid bilayers and subsequent F-actin binding, binding properties, actin network organization and actin network-influenced lipid membrane mechanics were elucidated.

In the first part of this work the molecular activation process of ezrin was studied by characterizing binding affinities and the organization of ezrin on lipid bilayers. Owing to a reduced protein height and FRET (FÖRSTER resonance energy transfer) efficiency in case of full activation (PIP₂ binding and phosphorylation) it was postulated, that ezrin exhibits a more loosely packed opened conformation bound to the lipid bilayer. This allows the protein to bind F-actin to its C-terminal domain.

In the second part actin networks were linked to supported lipid bilayers (SLBs) via ezrin to PIP₂ or electrostatically to 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholin (DOEPC) 5containing SLBs. The network organization was investigated by fluorescence microscopy in consideration of the immobilization strategy, pinning point density and the influence of actin-binding proteins (fascin and α -actinin). It became clear that both immobilization strategies result in actin networks with similiar properties, regarding mesh size and filament segment length. The F-actin network density could directly be regulated by pinning point density and actin-binding proteins (ABPs), which demonstrates the physiological relevance of the results. It is known that the actin density in cells is triggered by PIP₂ and ABP concentration.

In the third part of this work the model systems were tranferred to porous substrates. With knowledge of the previous parts the influence of a F-actin network on lipid bilayer mechanics was investigated. Indentations experiments by mean of atomic force microscopy on pore spanning lipid bilayers (PSLBs) showed that an overlying F-actin network stiffens the PSLBs. This was attributed to a reduced lateral mobility of the lipids in the PSLBs by the actin network related to the picket-fence model of the plasma membrane in which the mobility of lipids and (membrane) proteins is hindered by a compartmentation of the membran due to the actin cytoskeleton.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Zytoskelett der Zelle	1
1.1.1	Filamentöses Aktin	1
1.1.2	Die ERM-Proteinfamilie	3
1.2	L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP ₂)	6
2	Zielsetzung	9
3	Materialien und Methoden	11
3.1	Lipidchemische Methoden	11
3.1.1	Herstellung von Lipidfilmen	11
3.1.2	Präparation von unilamellaren Vesikeln	14
3.2	Proteinchemische Methoden	16
3.2.1	Kultivierung und Proteinexpression	16
3.2.2	Zelllyse und Ultrazentrifugation	17
3.2.3	Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie	17
3.2.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	19
3.2.5	Umpufferung von Proteinlösungen	22
3.2.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	22
3.2.7	Fluoreszenzmarkierung von Ezrin	23
3.2.8	Aktinpolymerisation	24
3.3	Präparative Methoden	26
3.3.1	Siliciumwafer	26
3.3.2	Poröse Siliciumnitridsubstrate	28
3.4	Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS)	31
3.4.1	Physikalische Grundlagen	31
3.4.2	Messaufbau	36
3.4.3	Experimentelle Durchführung	38
3.5	ATR-FTIR-Spektroskopie	38
3.5.1	Physikalische Grundlagen	39
3.5.2	Experimentelle Durchführung	44
3.5.3	Auswertung der ATR-FTIR-Spektren	46
3.6	CD-Spektroskopie	47

3.6.1	Zirkulardichroismus	47
3.6.2	Experimentelle Durchführung	49
3.7	Fluoreszenzmikroskopie	50
3.7.1	Physikalische Grundlagen	51
3.7.2	Epifluoreszenzmikroskopie	51
3.7.3	Konfokalmikroskopie	53
3.7.4	Experimentelle Einstellungen	54
3.7.5	Lipidmembran-gekoppelte Fluorophore	56
3.7.6	FRAP-Experimente	56
3.7.7	Akzeptor-Photobleichexperimente	57
3.7.8	Auswertung der Maschengrößen und Segmentlängen von F-Aktinnetzwerken	59
3.8	Rasterkraftmikroskopie	60
3.8.1	Messprinzip	61
3.8.2	Messmodi	62
3.8.3	Allgemeine experimentelle Durchführung	64
3.8.4	Durchführung von Indentationsexperimenten	65
3.8.5	Topographische Abbildungen	68

4	Charakterisierung der Bindung von Ezrin an festkörperunterstützten Lipidmembranen	73
4.1	Einleitung	73
4.2	Ausbildung von festkörperunterstützten Lipidmembranen	74
4.2.1	Einfluss von Ionenstärke und pH-Wert auf die Ausbildung PIP ₂ -haltiger festkörperunterstützter Lipidmembranen	75
4.2.2	Ausbildung PIP ₂ -haltiger Lipidmembranen und anschließende Ezrinbindung in Gegenwart divalenter Kationen	77
4.2.3	Ausbildung PIP ₂ -haltiger Lipidmembranen und anschließende Ezrinbindung in Gegenwart monovalenter Kationen	80
4.2.4	Ausbildung PIP ₂ -haltiger Lipidmembranen bei pH 4.8 und anschließende Ezrinbindung	83
4.2.5	Verteilung der PIP ₂ -Lipide innerhalb einer festkörperunterstützten Lipidmembran	86
4.2.6	Laterale Mobilität der PIP ₂ -Lipide innerhalb von festkörperunterstützten Lipidmembranen	88

4.3	Ezrinbindungsstudien an festkörperunterstützten Lipidmembranen	90
4.3.1	Proteinisolierung und -aufreinigung von Ezrin	91
4.3.2	Charakterisierung der Ezrinbindung an festkörperunterstützte Lipidmembranen	93
4.4	Charakterisierung der Organisation von Ezrin an festkörperunterstützten Lipidmembranen	99
4.4.1	Detektion der Proteinschichtdicke von Ezrin in Abhängigkeit aktivierender Faktoren	100
4.4.2	Rasterkraftmikroskopische Höhenanalyse von Ezrin in Abhängigkeit aktivierender Faktoren	105
4.4.3	Sekundärstrukturanalyse von Ezrin in Abhängigkeit aktivierender Faktoren	115
4.4.4	Untersuchung eines FÖRSTER-Resonanzenergietransfers von Ezrinkonstrukten in Abhängigkeit aktivierender Faktoren	125
4.5	Diskussion	131
4.5.1	Einfluss von Ionenstärke und pH-Wert auf die Verteilung von PIP ₂ -Molekülen in Lipidmembranen	131
4.5.2	Bindung von Ezrin an festkörperunterstützte Lipidmembranen	138
4.5.3	Zusammenhang bezüglich der Organisation von Ezrin an Lipidmembranen und der konformationsregulierten Aktivierung	144
5	Ausbildung von F-Aktinnetzwerken an festkörperunterstützten Lipidmembranen	151
5.1	Einleitung	151
5.2	PIP ₂ -haltige festkörperunterstützte Lipidmembranen	152
5.2.1	F-Aktinbindung als Funktion der Phosphorylierung Ezrins	152
5.2.2	Charakterisierung des F-Aktinnetzwerkes in Abhängigkeit der PIP ₂ -Konzentration	154
5.2.3	Blindexperiment bezüglich der spezifischen Bindung von F-Aktin an PIP ₂ -haltige Lipidmembranen	161
5.2.4	Untersuchung des Einflusses von Calciumionen auf die F-Aktinnetzwerkdichte	162
5.3	DOEPC-haltige festkörperunterstützte Lipidmembranen	168
5.3.1	Ausbildung und Stabilität DOEPC-haltiger festkörperunterstützter Lipidmembranen	168

5.3.2	F-Aktinbindungsstudie an DOEPC-haltigen festkörperunterstützten Lipidmembranen	169
5.3.3	Charakterisierung der F-Aktinnetzwerkorganisation in Abhängigkeit von Aktin-bindenden Proteinen	170
5.4	Diskussion	179
5.4.1	Protein-vermittelte Immobilisierung von Aktinfilamenten	179
5.4.2	Elektrostatische Immobilisierung von Aktinfilamenten	185
5.4.3	Quantitative Beschreibung von F-Aktinnetzwerken	188
6	Einfluss von F-Aktin auf die Mechanik porenüberspannender Lipidmembranen	193
6.1	Einleitung	193
6.2	PIP ₂ -haltige Lipidmembranen	194
6.2.1	F-Aktinbindungsstudie an PIP ₂ -haltigen festkörperunterstützten Lipidmembranen	194
6.2.2	Ausbildung PIP ₂ -haltiger porenüberspannender Lipidmembranen	196
6.2.3	Bindung von Ezrin T567D an PIP ₂ -haltige PSLBs	198
6.2.4	Bindung von nicht-muskulärem F-Aktin an PIP ₂ -haltige PSLBs .	200
6.2.5	Rasterkraftmikroskopische Charakterisierung PIP ₂ -haltiger porenüberspannender Lipidmembranen	201
6.3	DOEPC-haltige porenüberspannende Lipidmembranen	203
6.3.1	Ausbildung DOEPC-haltiger porenüberspannender Lipidmembranen	204
6.3.2	Bindung von muskulärem F-Aktin an DOEPC-haltige porenüberspannende Lipidmembranen	204
6.3.3	Ergebnisse der rasterkraftmikroskopischen Charakterisierung DOEPC-haltiger PSLBs	205
6.4	Diskussion	208
6.4.1	Laterale Lipidmembranspannung porenüberspannender Lipidmembranen	209
6.4.2	F-Aktinbindung an porenüberspannende Lipidmembranen	215
7	Zusammenfassung	219
8	Literaturverzeichnis	223

9	Anhang	249
9.1	Blindexperimente	249
9.2	Aminosäuresequenz	252
9.2.1	Ezrin wt	252
9.2.2	N-ERMAD	253
9.3	Abbildungsverzeichnis	253
9.4	Tabellenverzeichnis	260
9.5	Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	261
9.6	Chemikalien	265
9.7	Materialien	266
9.8	Geräte- und Softwareverzeichnis	266

1 Einleitung

Die Fähigkeit zur Aufrechterhaltung und Organisation spezifischer Plasmamembranbereiche ist essentiell für alle Zellen. Daher müssen Prozesse an der Zelloberfläche mit solchen im darunter lokalisierten kortikalen Zytoplasma und Zytoskelett koordiniert werden. Die Bildung komplexer Strukturen im apikalen Bereich der Zelle, wie Mikrovilli und Filopodien benötigen enge Interaktionen zwischen der Plasmamembran, membranverankerten zytoplasmatischen Proteinen und dem Zytoskelett.¹

1.1 Das Zytoskelett der Zelle

Das Zytoskelett der Zelle besitzt drei wichtige Funktionen, welche darin bestehen die Bestandteile der Zelle räumlich zu organisieren, die Zelle sowohl physikalisch als auch biochemisch mit der Umgebung zu verbinden und koordinierte Kräfte zu generieren, welche der Zelle Bewegungen und Verformungen ermöglicht.²

Aufgebaut ist das Zytoskelett aus drei verschiedenen Arten an Biopolymeren: den Aktinfilamenten (Mikrofilamente), den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli. Jedes Biopolymer bildet spezifische Strukturen mit lokaler intrazellulärer Verteilung aus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss und die Organisation von filamentösen Aktin (F-Aktin)-Netzwerken auf Lipidmembranen charakterisiert und daher wird im Folgenden näher auf die Funktion und Eigenschaften zellulärer Aktinfilamente eingegangen.

1.1.1 Filamentöses Aktin

Filamentöses Aktin (F-Aktin) ist aus globulären Aktin (G-Aktin)-Monomeren aufgebaut. G-Aktin ist ein evolutionär hoch konserviertes Protein mit einer Länge von 375 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 42 kDa.³

Der isoelektrische Punkt von G-Aktin liegt bei 4.8 und die Gesamtladung des Proteins bei pH = 7 ist -7 .⁵ Bei der Polymerisation reihen sich die Monomere, unter Hydrolyse eines Phosphatrests von ATP (Adenosintriphosphat), aneinander. Hierdurch entstandene Filamente bestehen aus zwei Ketten, welche sich helixförmig umeinander winden. Jedes Filament ist gekennzeichnet durch ein Plus (+)- und ein Minus (-)-Ende. Das Filament wächst vom (+)-Ende aus, denn hier lagert sich das ATP-Aktin an. Am (-)-Ende hydrolysiert ATP schneller zu ADP (Adenosindiphosphat) als die Anlagerung eines ATP-Aktins benötigt und ADP-Aktin dissoziiert von diesem Ende, so dass das Filament von dieser Seite

Abbildung 1.1: Die Kristallstruktur von G-Aktin mit gebundenem ADP (PDB ID: 1J6Z).⁴

kürzer wird. Aufgrund der Tatsache, dass Aktin mit höherer Affinität ATP bindet ergibt sich hieraus ein sogenannter *Treadmilling*-Kreislauf.⁶ Nach Dissoziation vom (-)-Ende und Austausch des Nukleotids von ADP zu ATP kann Aktin wieder an das (+)-Ende binden.

Es existiert eine Vielzahl an Aktin-bindenden Proteinen, welche zum Beispiel den Polymerisations- und Depolymerisationsprozess regulieren oder Aktinfilamente untereinander und mit anderen Proteinen quervernetzen.^{7–10} Aktinfilamente vermitteln die Ausbildung hochgeordneter rigider Strukturen, welche isotrope, gebündelte und quervernetzte Netzwerke umfassen. Das kortikale, unter der Plasmamembran lokalisierte, Aktinnetzwerk wird aus leicht quervernetzten Aktinfilamenten aufgebaut. Gebündelte Aktinfilamente sind in Zellausstülpungen wie Filopodien lokalisiert. Kontraktile gebündelte Aktinstrukturen finden sich in Stressfasern, welche im Zusammenspiel mit Myosin-Motorproteinen und ATP beweglich sind (vgl. Abb. 1.2).

Im Bereich des Zellkortex führt die Wechselwirkung zwischen der Plasmamembran und dem Zytoskelett zu dem Unvermögen *in vivo* die Komponenten isoliert voneinander untersuchen zu können.¹¹ In diesem Fall können *in vitro*-Experimente zur Charakterisierung genutzt werden.

Abbildung 1.2: Schematische Darstellung verschiedener spezifischer Aktinnetzwerkstrukturen in Zellen, welche durch Aktin-bindende Proteine und der Wechselwirkung zur Plasmamembran stabilisiert und reguliert werden können.

Es konnte gezeigt werden, dass nur eine geringe Anzahl aufgereinigter Proteine des Zytoskeletts notwendig sind, um komplexe zelluläre Netzwerkstrukturen zu rekonstruieren.^{12,13} Bei der dynamischen Verknüpfung zwischen der Plasmamembran und dem Aktinzytoskelett spielt unter anderem die ERM-Proteinfamilie eine wichtige Rolle.

1.1.2 Die ERM-Proteinfamilie

Die ERM-Proteinfamilie umfasst die Proteine Ezrin, Radixin und Moesin. Die Forschung der letzten 30 Jahre zeigt, dass die ERM-Proteine eine Schlüsselrolle bei der Verknüpfung der Plasmamembran mit dem kortikalen Zytoskelett spielen. Es findet eine funktionsorientierte und gewebespezifische Expression der Proteine statt. Ezrin wurde erstmals an der apikalen Zelloberfläche von Mikrovilli und Membranausstülpungen sowie als Substrat spezifischer Tyrosinkinasen entdeckt und ist hauptsächlich in Epithelzellen lokalisiert.¹⁴ Radixin wurde aus Mikrovilli isoliert, welche in gallenkanalbildenden Hepatozyten enthalten sind und Adhärenzverbindungen ausbilden.¹⁵ Moesin identifizierte man als heparinbindendes Protein, welches in besonders hoher Konzentration in Endothelzellen und Leukozyten zu finden ist.^{16,17}

Für die ERM-Proteine ist ihre Fähigkeit charakteristisch mit Transmembranproteinen, Phospholipiden, membranverankerten, zytoplasmatischen Proteinen und dem Zytoskelett

zu interagieren. Daher spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Zellmorphogenese, Zellmotilität, Zelladhäsion, Zytokinese, Signaltransduktion, sowie Endo- und Exozytose.¹⁸

Strukturelle Eigenschaften

Ezrin, Radixin und Moesin bilden eine Unterklasse der 4.1-Superfamilie, deren Namensgeber das Protein 4.1 (engl. *Four-point-one*) ist. Charakteristisch für die Superfamilie ist die FERM-Domäne (Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin), welche N-terminal lokalisiert ist und ungefähr 300 Aminosäuren umfasst.¹⁹ Die Proteine der ERM-Familie sind in zwei spezifische Domänen unterteilt, welche man als N-ERMAD (engl. N-terminal ERM association domain) und C-ERMAD (engl. C-terminal ERM association domain) bezeichnet. Die ERM-Proteine weisen eine hohe sequentielle und somit auch strukturelle Übereinstimmungen auf. Die Sequenzhomologien sind in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt.

Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der sequentiellen Übereinstimmungen der Proteine der ERM-Proteinfamilie (Ezrin, Radixin, Moesin). Radixin und Moesin weisen im N-terminalen Bereich eine Sequenzhomologie von 87% und 86% im Vergleich zu Ezrin auf. Die restliche Aminosäuresequenz von Radixin und Moesin stimmt zu circa 60% mit der von Ezrin überein. Ezrin und Radixin tragen eine Polyprolinsequenz (PP). Die Threoninreste T567, T564 beziehungsweise T558 können phosphoryliert werden.

Die sequentiellen Übereinstimmungen zwischen Radixin beziehungsweise Moesin mit Ezrin betragen 87% und 86% in der N-terminalen Domäne und circa 60% für die restlichen Aminosäuren. Die Threoninreste T567 (Ezrin), T564 (Radixin) und T558 (Moesin) können durch spezifische Kinasen phosphoryliert werden und tragen so zur Aktivierung der Proteine bei. Die N-terminale Domäne (N-ERMAD) vermittelt die Bindung an

die Lipidmembran (an Lipide oder Membranproteine). Sie umfasst etwa 300 Aminosäuren und formt eine dreifach gelappte, kleeblattartige Struktur. Die C-terminale Domäne (C-ERMAD) beinhaltet eine Bindungsstelle für filamentöses Aktin (F-Aktin) und umfasst etwa 100 Aminosäurereste, wobei die Bindungsstelle für F-Aktin eine Größe von circa 34 Aminosäuren einnimmt. Diese zwei Domänen werden über eine Linkerregion verknüpft, welche größtenteils eine α -helikale-Struktur ausbildet und aus ungefähr 200 Aminosäuren aufgebaut ist. Im Fall von Ezrin und Radixin umfasst dieser Bereich zusätzlich eine Polyprolinsequenz (PP).²⁰

Aktivierungsprozess der ERM-Proteine

Damit die ERM-Proteine ihre Membran- und Zytoskelett-verknüpfende Funktion ausführen können, ist ein Konformationswechsel notwendig. Untersuchungen zeigen, dass die Proteine im Zytoplasma in einer inaktiven, geschlossenen Konformation als Monomer oder Dimer und in einer aktiven, geöffneten Konformation bei der Interaktion mit der Plasmamembran und dem F-Aktin des Zytoskeletts vorliegen.^{21–23} Diese Erkenntnisse basieren auf zwei Entdeckungen:

Zunächst wurde die C-terminale F-Aktin-Bindungsdomäne in Ezrin identifiziert, welche die letzten 34 Aminosäuren umfasst. Die Bindungsdomäne wird aus drei α -Helices (α A, α B, α C) am C-terminalen Ende gebildet. Die Region beinhaltet ein KYKTL-Motiv und ist positiv geladen.^{18,23}

Später wurde entdeckt, dass die C-terminale Domäne mit der N-terminalen Domäne im Zytoplasma assoziiert vorliegt.²¹ Hieraus wurde geschlossen, dass einerseits die Bindungsstelle für F-Aktin und andererseits Bindungsstellen für Membranproteine maskiert vorliegen. Somit wird eine Aktivierung des Proteins in Form eines Konformationswechsels unter anderem für die F-Aktin-Bindung notwendig.

Die ersten Einblicke in den molekularen Regulierungsprozess der ERM-Proteine wurden mit der Entdeckung der Phosphorylierung Moesins am C-terminalen Threoninrest 558 während der Blutplättchen-Aktivierung gewonnen.²⁴ Weitere Studien konnten zeigen, dass in Ezrin (T567) und Radixin (T564) äquivalente Threoninreste lokalisiert sind. Phosphoryliert wird in der Zelle durch spezifische Kinasen wie der Rho-assoziierten Kinase oder Proteinkinase C.^{25–27}

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass neben der Phosphorylierung auch die Bindung der ERM-Proteine an das Lipid L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) den Konformationswechsel beeinflusst.^{19,28,29}

Auf Grundlage dieser Befunde wird ein zweistufiges Aktivierungsmodell diskutiert, bei

dem die Proteine an das Lipid PIP_2 binden und die nachfolgende Phosphorylierung des Threoninrests erleichtert wird (vgl. Abb. 1.4). Studien an tierischem Ezrin zeigten, dass die PIP_2 -Bindung eine Voraussetzung für die darauffolgende Phosphorylierung ist.¹⁹ Des Weiteren scheint eine ERM-Proteinaktivierung, gemessen an der F-Aktinbindefähigkeit, allein durch PIP_2 -Bindung möglich, nicht aber bei alleiniger Phosphorylierung.³⁰

Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des zweistufigen Aktivierungsprozesses der ERM-Proteine anhand von Ezrin. Die Aktivierung des Proteins, resultierend in einer geöffneten, N- und C-ERMAD dissoziierten Konformation, ist abhängig von der T567 Phosphorylierung und der PIP_2 -Bindung. Die Aktivierung des Proteins ermöglicht die Bindung an F-Aktin.

In der vorliegenden Arbeit soll einerseits die Bindung von Ezrin an artifizielle Lipidmembran in Abhängigkeit der aktivierenden Faktoren untersucht werden (vgl. Abs. 4) und andererseits die physiologische Linkerfunktion genutzt werden, um F-Aktin an Lipidmembranen zu immobilisieren (vgl. Abs. 5, 6). In beiden Fällen ist die Bindung von Ezrin an PIP_2 -haltige Lipidmembranen essentiell.

1.2 L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2)

Die wichtige Rolle der Phosphoinositole, insbesondere von L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), in Plasmamembranen ist seit Jahrzehnten bekannt. Phosphoinositole machen mit 1% nur einen geringen Anteil aller Lipide aus.³¹ Charakteristisch ist ihre große, aufrechte Kopfgruppe, mit der sie über die Membranebene hinaus in die wässrige Phase ragen. PIP_2 ist der Hauptvertreter der Phosphoinositole in der Zelle und trägt wie alle Phosphoinositole eine hohe negative Ladung, welche bei PIP_2 unter physiologischen Bedingungen zwischen -3 und -5 liegt.³²

Zuerst wurde die PIP_2 -Bindungsstelle *Pleckstrin-Homology* (PH)-Domäne der Phospholipase C (PLC) entdeckt und untersucht. Die lokale PIP_2 -Konzentration ist essentiell für die Rekrutierung von Proteinen. Die Membranverankerung von PLC benötigt eine Inter-

aktion der katalytisch wirksamen PH-Domäne der PLC mit dem membrangebundenen PIP₂.³¹ Die Bindung der PLC an PIP₂ führt zu einer enzymatischen Spaltung von PIP₂ in die zwei Sekundärbotenstoffe Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). DAG verbleibt an der Plasmamembran gebunden und kann von dort als interzellulärer Vermittler dienen. DAG kann zudem weiter zur Arachidonsäure abgebaut werden, welche wiederum eine Signalwirkung in der Zelle besitzt. IP₃ verlässt die Plasmamembran und diffundiert in das Zytosol. Es bindet an das Endoplasmatische Retikulum (ER) und öffnet die IP₃-sensitiven Ca²⁺-Kanäle in der ER-Membran. Durch das Zusammenspiel von IP₃ und DAG wird die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, welche wiederum andere Proteine phosphorylieren kann.³³

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PIP₂ zusammen mit Aktin-bindenden Proteinen die Plasmamembran-Zytoskelett-Verknüpfung reguliert.³⁴ Die Verteilung von PIP₂ in der Plasmamembran ist heterogen und PIP₂ ist vor allem in der dem Zytoplasma zugewandten Monoschicht lokalisiert.³⁵ Die lokale PIP₂-Dichte korreliert mit einer hohen F-Aktindichte.³⁶ Die zugrunde liegenden Mechanismen, welche diese Konzentrationserhöhungen auslösen und stabilisieren sind Gegenstand aktueller Forschung. Diskutiert wird eine lokal erhöhte PIP₂-Synthese durch G-Proteine, stabilisiert durch cholesterinreiche Domänen der Plasmamembran, welche die Diffusionsgeschwindigkeit der Lipide herabsetzt.³⁷ Auch die Assoziation von PIP₂ mit membranbindenden Proteinen, wie Ezrin, kann eine Anreicherung stabilisieren und regulieren.^{38,39}

Somit ist im Rahmen dieser Arbeit von zentralem Interesse, ob und inwiefern die Konzentration von PIP₂ im Zusammenspiel mit Ezrin die F-Aktindichte und -organisation an Lipidmembranen ausgebildeten Netzwerken steuern kann.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es Aspekte der Verknüpfung zwischen der Plasmamembran und dem Zytoskelett der Zelle zu untersuchen. Von zentralem Interesse ist die Verknüpfung von filamentösem Aktin (F-Aktin) des Zytoskeletts mit L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂)-haltigen Lipidmembranen über das Protein Ezrin in Hinblick auf Bindungseigenschaften der Proteine, der Organisation von F-Aktinnetzwerken und deren Einfluss auf die Lipidmembranmechanik.

Ezrin bindet mit der N-terminalen Domäne an PIP₂ und mit der C-terminalen Domäne an F-Aktin. Dies ist essentiell für eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie der Zellmorphogenese, Zellmotilität und Zelladhäsion. Ezrin kann in einer inaktiven Konformation, in der N- und C-Terminus miteinander assoziiert sind vorliegen oder in einer aktivierten, geöffneten Konformation, in der die C-terminale F-Aktinbindung stattfindet. Die Bindung an PIP₂ und die Phosphorylierung des Threoninrests 567 stellen zwei aktivierende Faktoren dar, welche für einen vollständigen Konformationswechsel notwendig sind. Der molekulare Aktivierungsmechanismus von Ezrin ist noch unzureichend verstanden.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit steht der molekulare Aktivierungsprozess von Ezrin im Fokus. Hierzu sollen die Beiträge von PIP₂-Bindung und Phosphorylierung zur Aktivierung des Proteins und dem damit einhergehenden Konformationswechsel von Ezrin an festkörperunterstützten Lipidmembranen untersucht werden. Die Analyse der Parameter Proteinhöhe, Sekundärstrukturverteilung und FRET-Effizienz als Funktion der Aktivierungsfaktoren soll Aufschluss über die Dissoziation von N- und C-Terminus geben.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit soll die Organisation von F-Aktinnetzwerken an festkörperunterstützten Lipidmembranen in Abhängigkeit von Verknüpfungspunkten und Aktinbindenden Proteinen (Fascin und α -Actinin) fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden. Hierzu sollen zwei Immobilisierungsstrategien gegenübergestellt werden: F-Aktin soll einerseits physiologisch über Ezrin an PIP₂-haltige SLBs (unter Berücksichtigung der Erkenntnisse zur Aktivierung des ersten Abschnitts) und andererseits elektrostatisch an 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholin (DOEPC)-haltige SLBs gebunden werden.

Im dritten Abschnitt der Arbeit soll das zuvor charakterisierte Modellsystem auf poröse Substrate übertragen werden, um einen möglichen Einfluss des kortikalen F-Aktinnetzwerkes auf die mechanischen Eigenschaften von Lipidmembranen zu untersuchen. Hierzu werden rasterkraftmikroskopische Indentationsexperimente an porenüberspannenden Lipidmembranen (PSLBs) durchgeführt. Dabei sollen aufbauend auf den Ergebnissen der vorherigen Abschnitte unterschiedliche Immobilisierungsstrategien von F-Aktin untersucht werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Lipidchemische Methoden

3.1.1 Herstellung von Lipidfilmen

Bei der Herstellung von Lipidfilmen wurden unterschiedliche Mischungen aus Matrix- und Rezeptorlipid mit einer variierenden Gesamtlipidmasse von 0.2-1.0 mg angesetzt. Typische Matrixlipide (vgl. Tab. 3.1) stellten 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC), 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) und 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) dar.

Tabelle 3.1: Übersicht der eingesetzten Matrixlipide mit dazugehöriger Strukturformel und molarer Masse.

Matrixlipid	Molare Masse M
<p>1-Palmitoyl-2-oleoyl-<i>sn</i>-glycero-3-phosphocholin (POPC)</p>	760.1 g·mol ⁻¹
<p>1,2-Dioleoyl-<i>sn</i>-glycero-3-phosphocholin (DOPC)</p>	786.1 g·mol ⁻¹
<p>1,2-Dipalmitoyl-<i>sn</i>-glycero-3-phosphocholin (DPPC)</p>	734.0 g·mol ⁻¹

Als Rezeptorlipide (vgl. Tab. 3.2) für artifizielle Lipidmembranen wurden je nach Art der gewünschten Wechselwirkung L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂, mit unterschiedlichen Fettsäureresten: Struktur der überwiegenden Spezies (Stearyl- und Arachidonsäurereste) gezeigt in Tabelle 3.2), 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-{[N-(5-amino-1-

carboxypentyl)-iminodiessigsäure]succinyl}Ni-Salz (DOGS-Ni-NTA) oder 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholin (DOEPC) eingesetzt. Hierbei variierten neben der Lipidzusammensetzung auch die Stoffmengenverhältnisse, um einerseits physiologisch relevante Rezeptorlipidanteile und deren Auswirkungen untersuchen zu können, oder andererseits, bei höheren Rezeptorlipidgehalten, ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu gewährleisten.

Tabelle 3.2: Übersicht der eingesetzten Rezeptorlipide mit dazugehöriger Strukturformel und molarer Masse.

Rezeptorlipid	Molare Masse M
<p>L-α-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂)</p>	1096.4 g·mol ⁻¹ (mittlere M)
<p>1,2-Dioleoyl-<i>sn</i>-glycero-3-{[N-(5-amino-1-carboxypentyl)-iminodiessigsäure]succinyl}Ni-Salz (DOGS-Ni-NTA)</p>	1057.0 g·mol ⁻¹
<p>1,2-Dioleoyl-<i>sn</i>-glycero-3-ethylphosphocholin (DOEPC)</p>	850.6 g·mol ⁻¹

Ausgehend von den Stammlösungen des jeweiligen Lipids in einem Konzentrationsbereich von 1.0-15.0 mg·mL⁻¹ wurden die jeweiligen Volumina, entsprechend des gewünschten Stoffmengenverhältnisses, in mit 100 μ L Chloroform befüllte Reagenzgläser pipettiert. Des Weiteren wurden geringe Volumina Methanol (5-10 μ L) verwendet, um die Polarität des Lösungsmittels zu erhöhen und ein Ausfallen des Lipids (Trübung) zu verhindern. Die Lösungsmittel wurden bei 38 °C im Stickstoffstrom verblasen.

Anschließend wurden die Lipidfilme für 3 h im Vakuum bei 38 °C vollständig getrocknet. Zu beachten war, dass bei Verwendung des Gelphasenlipids DPPC, dessen Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m bei 41 °C liegt, die Präparation der Lipidfilme bei 55 °C erfolgte.⁴⁰ Die Lipidfilme wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Abschnitt 4.2 dieser Arbeit ergaben sich unterschiedliche Präparations- und Spreitbedingungen für die Ausbildung von Lipidmembranen mit unterschiedlichen Rezeptorlipiden. An dieser Stelle sollten die vier wichtigsten verwendeten Puffer erwähnt werden (*vide infra*): der Niedrig-pH-Puffer (Citratpuffer), der Standard-Messpuffer (E1-Puffer), der Ca^{2+} -haltige Puffer (Ca^{2+} -Puffer) und PBS (engl. *Phosphate buffered saline*)-Puffer. Bei der Präparation PIP_2 -haltiger SUVs wurde Citrat-Puffer, bei der Präparation DOGS-Ni-NTA-haltiger kleiner Vesikel Ca^{2+} -Puffer und bei der Präparation DOEPC-haltiger SUVs PBS verwendet. Hierbei handelte es sich sowohl um den Präparations- als auch Spreitpuffer. Anschließend wurde mit dem entsprechenden Proteinpuffer (u.a. E1-Puffer) gespült.

Citrat-Puffer 50 mM KCl
 20 mM Na-Citrat
 0.1 mM NaN_3
 0.1 mM EDTA
 pH 4.8 (HCl)

E1-Puffer 50 mM KCl
 20 mM Tris/HCl
 0.1 mM NaN_3
 0.1 mM EDTA
 pH 7.4 (HCl)

Ca^{2+} -Puffer 50 mM KCl
 20 mM Tris/HCl
 2 mM CaCl_2
 0.1 mM NaN_3
 pH 7.4 (HCl)

PBS-Puffer 50 mM KCl
 2.7 mM KCl
 136 mM NaCl
 1.5 mM KH_2PO_4
 8.1 mM Na_2HPO_4
 pH 7.4 (HCl)

3.1.2 Präparation von unilamellaren Vesikeln

Die Präparation unilamellarer Vesikel ist der Ausgangspunkt zur Ausbildung planarer Lipidmembranen. Hierzu werden Vesikel unterschiedlicher Lipidzusammensetzung überhalb der Hauptphasenumwandlungstemperatur gespreitet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden kleine unilamellare Vesikel genutzt um festkörperunterstützte Lipidmembranen zu präparieren und riesige unilamellare Vesikel zur Ausbildung porenüberspannender Lipidmembranen.

Kleine unilamellare Vesikel

Zur Präparation kleiner unilamellarer Vesikel (engl. *small unilamellar vesicles*, SUVs) wurden rehydratisierte Lipidfilme einer Ultraschallbehandlung unterzogen.^{41,42} SUVs zeichnen sich durch ihre hohe Krümmung aus und daher befindet sich ein größerer Anteil der Lipide in der äußeren Monoschicht. Dies kann in Lipidmischungen zu einer asymmetrischen Verteilung führen.⁴³ Die Durchmesser der Vesikel liegen in einem Bereich von 20-50 nm und sind unter anderem abhängig von der Lipidzusammensetzung und der Dauer der Ultraschallbehandlung.⁴⁴⁻⁴⁶

Zur Herstellung kleiner, unilamellarer Vesikel wurde der Lipidfilm zunächst durch Zugabe von Puffer ($V = 500\text{-}600\ \mu\text{L}$) rehydratisiert. Die Art des Puffers wurde entsprechend des Rezeptorlipids und dessen Spreitverhaltens gewählt (vgl. Abs. 3.1.1,4.2).

Nach Zugabe des gewünschten Puffers wurde der Lipidfilm für 30 min inkubiert. Durch anschließendes Aufschütteln löst sich das Lipidmaterial von der Reagenzglaswand und multilamellare Vesikel liegen vor. Hierzu wurde der Lipidfilm im Reagenzglas dreimal in fünfminütigen Abständen für 30 s geschüttelt. Die mehrschichtigen Vesikel wurden in ein Plastikgefäß überführt und unter folgenden Einstellungen mit einem Tip-Sonicator der Firma Bandelin beschallt:

Dauer: 30 min
Zyklen: 4 x 10%
Power: 60%

Riesige unilamellare Vesikel

Riesige unilamellare Vesikel (engl. *giant unilamellar vesicles*, GUVs) wurden mittels Elektroformation präpariert. Diese bildet den Standard um reproduzierbar GUVs in guter Ausbeute zu erhalten. Die Durchmesser der Vesikel liegen in einem Bereich von 10-60 μm .⁴⁷ Die Elektroformation basiert auf der Rehydratisierung eines Lipidfilms auf einer leitenden Oberfläche bei Anlegen einer Wechselspannung.⁴⁸

Zunächst wurde hierzu eine Lipidlösung in Chloroform p.a. mit der gewünschten Lipidzusammensetzung hergestellt (Lipidmasse: 0.2 mg, Gesamtvolumen: 60 μL). Dann wurden jeweils 30 μL der Lipidlösung auf zwei Objektträger gegeben, welche einseitig mit einer dünnen leitenden Indiumzinnoxid-Schicht (engl. *indium tin oxide*, ITO) überzogen sind. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum für 30 Minuten bei Raumtemperatur entfernt. Auf die ITO Objektträger wurde ein Silikon-Dichtungsring und selbstklebende Kupferelektroden aufgebracht. Die beiden Objektträger wurden so miteinander fixiert, dass sich ein abgedichtetes Reservoir bildete. Nun wurde eine Sucroslösung ($c = 300 \text{ mM}$; $V \approx 1.7 \text{ mL}$) in dieses Reservoir gegeben, um den Lipidfilm zu rehydratisieren. Hierzu wurde eine sinusförmige Wechselspannung von 3 V (*peak-to-peak*) mit einer Frequenz von 5 Hz über 3 h angelegt. Anschließend wurde die GUV-Lösung vorsichtig mit einer Pipette aus dem Reservoir abgezogen, in ein Plastikgefäß überführt und bis zu einer Woche bei Raumtemperatur gelagert.

Für die anschließende Präparationen porenüberspannender Lipidmembranen (PSLBs) wurden GUVs folgender Zusammensetzung hergestellt:

- POPC/PIP₂/Perylen (91:8:1)
- POPC/POPE/PIP₂/Chol/TxR (51.6:20:8:20:0.4)
- DOPC/DOEPC/Perylen (79:20:1)

Im Fall der DOEPC-haltigen Lipidmembranen wurde mit PBS-Puffer gearbeitet, die Präparation PIP₂-haltiger PSLBs fand im E1-Puffer statt.

3.2 Proteinchemische Methoden

Als rekombinantes Proteinexpressionssystem ist die bakterielle Expression eine weit verbreitete Methode. *Escherichia Coli* (*E. coli*) ist das am häufigsten verwendete prokaryotische Expressionssystem.⁴⁹ *E. coli* Bakterien zeichnen sich durch ein schnelles Wachstum bei hoher Dichte und einer schnellen Proteinbiosynthese aus. Des Weiteren ist ihr Genom gut charakterisiert und es sind unterschiedlichste Klonierungsvektoren und mutierte Wirtsstämme verfügbar.⁵⁰ Nachteile des *E. coli* Expressionssystems bestehen zum Beispiel in dem Auftreten von Einschlusskörpern (engl. *inclusion bodies*) und den fehlenden post-translationalen Veränderungen.⁵¹

Ein in der Biotechnologie häufig genutztes Promotorsystem ist das der T7-RNA-Polymerase, welches sich auch im Wirtstamm BL21 findet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die auf Grundlage der Studien von Studier *et al.* entwickelte pET-Vektorreihe mit dem BL21-Stamm kombiniert.⁵²

3.2.1 Kultivierung und Proteinexpression

Ausgehend von einer bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Glycerinkultur eines *Escherichia coli* Stammes BL21(DE3) pLysS wurde ein Vereinzelungsausstrich nach der 13-Strich-Methode auf sterilen LB-Agarplatten (engl. *lysogeny broth*) aufgetragen und für 12-14 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Sowohl die LB-Agarplatten als auch die Flüssigmedien (*vide infra*) der Vorkulturen wurden mit den Antibiotika Kanamycin ($c = 60\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) und Chloramphenicol ($c = 34\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) versetzt, um eine selektive Kultivierung der plasmidtragenden Bakterien zu gewährleisten. Pro Bakterienstamm und Ansatz wurde eine Vorkultur benötigt. Hierzu wurde eine Einzelkolonie in 10 mL LB-Medium gegeben. Die Vorkultur wurde für 12-14 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln inkubiert. Die Hauptkultur ($V = 250\text{ mL}$) wurde mit dem Antibiotikum Kanamycin ($c = 60\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) und der entsprechenden Vorkultur ($V = 5\text{ mL}$) versetzt. Die Hauptkultur wurde für ungefähr 2 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Schüttelinkubator herangezogen, bis eine optische Dichte (OD_{600}) von 0.6 erreicht war. Durch Zugabe von 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) zur Hauptkultur wurde die Proteinexpression induziert. Wiederum wurde die Bakterienkultur für weitere 4 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Schüttelinkubator kultiviert.

LB-Medium 1% (w/v) Trypton
1% (w/v) NaCl
0.5% (w/v) Hefeextrakt
pH 7.4 (NaOH)

LB-Agar 1.5% (w/v) Agar
1% (w/v) Trypton
1% (w/v) NaCl
0.5% (w/v) Hefeextrakt
pH 7.4 (NaOH)

3.2.2 Zelllyse und Ultrazentrifugation

Die Proteinexpression wurde durch Eiskühlung ($t = 10$ min) heruntergefahren und die Zellen durch Zentrifugation (20 min, 4 °C, 3470 x g) geerntet. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet im Lysispuffer (*vide infra*) resuspendiert und in ein Plastikgefäß überführt, so dass sich ein Gesamtvolumen von 20 mL ergab. Durch eine Ultraschallbehandlung (*Sonopuls*, Bandelin, Zyklen: 4 x 10%, Power: 60%, 5 x 30 s) wurden die Zellen mechanisch aufgeschlossen. Anschließend wurde das Lysat zur Trennung von Zellfragmenten und Proteinlösung zentrifugiert (1 h, 4 °C, 100000 x g). Die Proteine befanden sich im wässrigen Überstand und wurden abdekantiert.

Lysispuffer 40 mM HEPES
20 mM Imidazol
300 mM NaCl
1 mM EDTA
10 mM β -Mercaptoethanol*
Roche® complete mini EDTA-free, protease inh. cocktail (1 Tbl./10 mL)*
pH 7.4 (NaOH)
*direkt vor Verwendung hinzuzufügen

3.2.3 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der Proteinlösungen erfolgte nach dem Prinzip der Immobilisierten-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC).⁵³ Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich Proteine, welche Histidinreste an ihrer Oberfläche aufweisen oder rekombinante

Proteine mit einer gentechnisch konstruierten Histidinabfolge (His-Tag), aufzureinigen.⁵⁴ Als Grundlage dient ein ans Säulenmaterial kovalent gebundener Komplex, der Metallionen (wie Ni^{2+} -Ionen) chelatisiert und daher mit His-Tag-Proteinen eine reversible koordinative Bindung eingehen kann. Die Vorteile der IMAC gegenüber anderer affinitätschromatographischer Methoden sind die schnelle Durchführbarkeit, die meistens hohe Reinheit der Zielproteine, die hohe Kapazität des Säulenmaterials, die milden Elutionsbedingungen, eine einfache Regeneration des Säulenmaterials und die geringen Kosten.⁵⁵ Im Rahmen dieser Arbeit wurden rekombinante Proteine isoliert, welche einen N-terminalen His₆-Tag tragen, das heißt eine Abfolge von sechs Histidinresten am N-Terminus der Aminosäuresequenz. Die affinitätschromatographische Aufreinigung erfolgte über eine Agarosesäule, welche Nickel-Nitrilotriessigsäure(NTA)-Komplexe gebunden hat. Der tetradentate NTA-Ligand koordiniert an vier Bindungsstellen des Ni^{2+} -Ions. Somit bleiben zwei Koordinationsstellen für die Interaktion mit den Imidazolringen der Histidinreste verfügbar (vgl. Abb. 3.1).

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Wechselwirkung des Ni-NTA-Komplexes des Säulenmaterials mit zwei Histidinresten des Proteins.

Pro Ansatz wurden je 20 mL Proteinlösung affinitätschromatographisch aufgereinigt. Bei Raumtemperatur wurden die Säulen zunächst mit dem frischen oder regenerierten Säulenmaterial beladen. Anschließend mit Ethanol p.a. ($V = 10$ mL), Reinstwasser ($V = 20$ mL) und Äquilibrationpuffer ($V = 20$ mL, *vide infra*) gespült und bei 4 °C äquilibriert. Das Lysat wurde insgesamt dreimal auf das Säulenmaterial aufgetragen, um eine möglichst hohe Beladung mit Protein zu gewährleisten. Daraufhin wurde mit Waschpuffer I und II (je $V = 10$ mL, *vide infra*) gespült, um unspezifisch und schwach gebundene Proteine vom Säulenmaterial zu verdrängen. Die gezielte Elution erfolgte

durch die hohe Konzentration Imidazol im Elutionspuffer ($V = 20 \text{ mL}$, *vide infra*), wodurch das His₆-Tag Protein von der Säule verdrängt wird.

Äquilibrierungspuffer	40 mM HEPES 20 mM Imidazol 300 mM NaCl pH 7.4 (NaOH)
Waschpuffer I	40 mM HEPES 30 mM Imidazol 300 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 10 mM β -Mercaptoethanol* pH 7.4 (NaOH) *direkt vor Verwendung hinzuzufügen
Waschpuffer II	40 mM HEPES 40 mM Imidazol 150 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 10 mM β -Mercaptoethanol* pH 7.4 (NaOH) *direkt vor Verwendung hinzuzufügen
Elutionspuffer	250 mM Imidazol 20 mM Tris/HCl 50 mM KCl pH 7.4 (HCl)

3.2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Prinzip der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS-PAGE) beruht auf der Trennung von Proteingemischen im elektri-

schen Feld aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität. Grundlagen dieses Verfahrens sind die Denaturierung der vorliegenden Proteine, ihrer Maskierung mit einer negativen Überschussladung proportional zum Molekulargewicht, aus dem ein ähnliches Masse-zu-Ladungsverhältnis resultiert. Dies ermöglicht eine Auftrennung nach der Größe der Proteine, welche aufgrund der Denaturierung proportional zur Masse ist.⁵⁶ Diese Methode wird unter anderem eingesetzt um den Erfolg einer Proteinisolierung durch die Ermittlung von Reinheit und Molekulargewicht des Zielproteins, zu beurteilen. Hierzu wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel, welches in Sammel- (5%, pH 6.8) und Trenngel (12.5%, pH 8.8) (*vide infra*) unterteilt ist, in einem vertikalen Gelelektrophoresesystem (PerfectBlue Doppelgelsystem, PEQLAB, VWR Erlangen) angefertigt. Die zwei Gele unterscheiden sich in pH-Wert, Ionenstärke und Maschengröße. Zur Herstellung des Polyacrylamidgels wird die radikalische Polymerisation von Acrylamid-Bisacrylamid durch Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) initiiert und durch N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert. Zunächst wurde das noch flüssige Trenngel in die entsprechende Kammer der Apparatur gegossen, mit Isopropanol überschichtet und ungefähr 60 min ausgehärtet. Das Isopropanol wurde verworfen und die Lösung des Sammelgels über das Trenngel gegeben. Zur Formung der Probenaschen wurde ein Kamm in das Sammelgel gesteckt.

Die Zugabe des Detergenz SDS zu den Proteinproben führte bei gleichzeitigem Erhitzen auf 95 °C zur Denaturierung der Proteine. Aufgrund seiner negativen Ladung und der selektiven Bindung an hydrophobe Bereiche des Proteins fügt SDS eine stark negative Gesamtladung in das Proteingerüst ein. Diese Ladung ist so hoch, dass vorhandene Ladungen der Aminosäurenreste überdeckt werden und ein nahezu konstantes Masse-zu-Ladungsverhältnis der Proteine erreicht wird. Das im Probenpuffer (*vide infra*) enthaltene DTT (Dithiothreitol) reduziert vorhandene Disulfidbrücken und trägt zur Denaturierung bei.

Nach weiteren 60 min wurden die mit Laufpuffer (*vide infra*) gefluteten Probenaschen mit jeweils 10 µL der Proteinlösung und dem Probenpuffer beladen. Bei anschließendem Anlegen einer Gleichspannung, wurde der Strom pro Gel konstant gehalten ($I = 15 \text{ mA}$) und die Proben zunächst im Sammelgel aufkonzentriert. Durch die Unterschiede im pH-Wert und der Ionenstärke, werden die Proteine beim Übergang in das engermaschige Trenngel der Größe entsprechend aufgetrennt. In diesem Fall konnten kleine Proteine das poröse Polyacrylamidgel bei Anlegen eines elektrischen Feldes schneller durchlaufen. Um aus der Laufhöhe der Proteinbanden Rückschlüsse auf das Molekulargewicht ziehen zu können, wurde zusätzlich zu den Proben ein Marker ($V = 3 \text{ µL}$, LMW-SDS Marker

Kit, GE Healthcare Life Sciences Freiburg) aufgetragen, welcher Proteine bekannter Masse enthielt.

Nach beendeter Auftrennung ($t \approx 90$ min) wurden die Gele 15 min in einer Coomassie-Lösung angefärbt und anschließend über Nacht in einer Entfärbelösung (*vide infra*) auf einem Schwenkbrett entfärbt. Nachdem die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren, wurden die Gele aus der Entfärbelösung genommen, mit Wasser gespült und fotografiert.

Probenpuffer	175 mM Tris/HCl 0.3 M DTT 15% (w/v) Glycerin 5% (w/v) SDS 0.02% (w/v) Bromphenolblau pH 6.8
Laufpuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0.1% (w/v) SDS pH 8.3
Trenngel (12.5%)	2.1 mL 30% Acrylamid-Bisacrylamid (29:1) 1.6 mL H ₂ O 1.3 mL 1.5 M Tris/HCl 40 µL 10% (w/v) SDS 40 µL 10% (w/v) APS 2 µL TEMED pH 8.8
Sammelgel (5%)	0.33 mL 30% Acrylamid-Bisacrylamid (29:1) 1.4 mL H ₂ O 0.25 mL 1 M Tris/HCl 20 µL 10% (w/v) SDS 20 µL 10% (w/v) APS 2 µL TEMED pH 6.8

Coomassie Färbelösung 0.5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
45% (v/v) MeOH
18.5% (v/v) Eisessig

Entfärbelösung 7.5% (v/v) Eisessig
5% (v/v) EtOH

3.2.5 Umpufferung von Proteinlösungen

Die einzelnen Proteinfraktionen wurden nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung aus dem imidazolhaltigen Elutionspuffer in den E1-Puffer (vgl. 3.1.2) überführt. Hierzu wurden Dialyseschläuche mit einer Massenausschlussgrenze von 14 kDa verwendet. Die Schläuche wurden vor ihrer Verwendung in circa 10 cm lange Stücke geschnitten und 15 min in Reinstwasser eingeweicht. Zur anschließenden Reinigung wurden die Schläuche für 30 min in einer 10 mM NaHCO₃-Lösung und daraufhin zweimal für 30 min in einer 10 mM EGTA-Lösung auf 80 °C erhitzt. Anschließend wurden die Schläuche für weitere 30 min in Reinstwasser gelagert und abgekühlt. Zur Aufbewahrung wurden die abgekühlten Schlauchstücke in einer 10 mM NaN₃-Lösung bei 4 °C aufbewahrt. Zur Umpufferung wurden 3-4 mL der Proteinlösung in Dialyseschläuchen über Nacht bei 4 °C gegen ein 300fach größeres Puffervolumen dialysiert. Am nächsten Morgen wurde der verwendete Puffer gegen frischen Puffer ausgetauscht und für weitere 2-3 Stunden dialysiert.

3.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration c der umgepufferten Proteinlösung erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie. Hierbei wird die Extinktion E der Probe bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert und gegen eine Referenzprobe (E1-Puffer) vermessen. Die Bestimmung beruht auf der Tatsache, dass die aromatischen Aminosäureseitenketten von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin Licht bei 280 nm absorbieren. Über den Zusammenhang des Lambert-Beerschen Gesetzes⁵⁷ kann so die Proteinkonzentration c berechnet werden.

$$c = \frac{E_{280}}{\epsilon_{280} \cdot d} \quad (3.1)$$

Die Schichtdicke d der Küvette betrug 1 cm und der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{280} von Ezrin Wildtyp, Ezrin T567D und Ezrin T567A wurde zu $66900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und der von N-ERMAD auf $52400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ berechnet.⁵⁸

3.2.7 Fluoreszenzmarkierung von Ezrin

Die Fluoreszenzmarkierung von Ezrin diente dazu das gebundene Protein auf festkörperunterstützten Lipidmembranen nachzuweisen. Des Weiteren war es möglich aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen eine Oberflächenbelegung des gebundenen Proteins zu bestimmen.

Als Fluoreszenzmarker wurde AlexaFluor®488 C₅-Maleimid ($\lambda_{\text{ex}} = 493 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 516 \text{ nm}$, $\epsilon = 72000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Life Technologies, Eugene USA) verwendet (vgl. Abb. 3.2). Mit Hilfe dieses Farbstoffes und seiner Maleimidfunktionalität ist es möglich selektiv Cysteine in Proteinen zu markieren. Ezrin verfügt über zwei Cysteinreste, wobei einer in der N-terminalen Domäne (Position 153) und einer in der C-terminalen Domäne (Position 520) lokalisiert ist. Reduzierende Bedingungen bei der Kopplung des Fluorophors an das Protein sind essentiell, um Disulfidbrücken zu vermeiden und die Reaktivität der Cysteine zu gewährleisten.⁵⁹

Abbildung 3.2: Strukturformel von AlexaFluor®488 C₅-Maleimid.

Um eine Fluoreszenzmarkierung Ezrins durchführen zu können, musste das Protein zunächst aufkonzentriert ($c \approx 20 \mu\text{M}$, $V = 1 \text{ mL}$) werden. Anschließend wurde Dithiothreitol (DTT) in einem 10fachen molaren Überschuss zur Proteinlösung gegeben und für

40 min bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Hierdurch wurden mögliche Disulfidbrücken reduziert und über Nacht wurde die Lösung gegen einen DTT-freien Puffer dialysiert (MWCO = 14 kDA). Am nächsten Tag wurde der Fluorophor in eisgekühltem, entgastem Reinstwasser gelöst ($c = 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $V = 100 \text{ } \mu\text{L}$) und entsprechend der Konzentrationen in 20fachem Überschuss tropfenweise, unter Rühren zur Proteinlösung gegeben. Die Reaktion verlief bei 4 °C über Nacht unter Ausschluss von Licht. Die Reaktion wurde am nächsten Tag durch Zugabe von β -Mercaptoethanol ($c = 7 \text{ mM}$) gestoppt. Nach 30minütiger Inkubation wurde die Lösung auf eine Gelfiltrationssäule (G-25 Sephadex, GE Healthcare) gegeben, etwas Puffer zugeben ($V = 1.5 \text{ mL}$) und durch weitere Pufferzugabe ($V = 2.5 \text{ mL}$) eluiert. Die Proteinlösung wurde in 300 μL Fraktionen gesammelt. Der Erfolg der Fluoreszenzmarkierung Ezrins wurde über UV/Vis-Spektroskopie und SDS-PAGE bestimmt.

3.2.8 Aktinpolymerisation

Polymerisiertes Aktin (filamentöses Aktin, F-Aktin) wurde im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt um die Netzwerkorganisation gebunden an SLBs analysieren zu können (vgl. Abs. 5) sowie den Einfluss auf die Membranmechanik von PSLBs untersuchen zu können (vgl. Abs. 6). Hierzu wurden zwei verschiedene präparative Ansätze verfolgt: Einerseits wurde Aktin in einem Plastikgefäß vorpolymerisiert und andererseits in globulärer, monomerer Form auf Lipidmembranoberfläche gegeben, um eine *in situ* Polymerisation durchzuführen.

Hierzu wurde lyophilisiertes, globuläres, muskuläres (aus Skelettmuskel (Kanninchen), Reinheit >95%, 100% α -Aktin, Cytoskeleton, Denver USA) und nicht-muskuläres Aktin (aus nicht-muskulären Blutplättchen (Mensch), Reinheit >95%, 85% β -Aktin, 15% γ -Aktin, Cytoskeleton, Denver USA) verwendet. Das globuläre Aktin (G-Aktin) wurde in eisgekühltem Reinstwasser ($V = 100 \text{ } \mu\text{L}$) gelöst. Anschließend wurde die Proteinlösung ($c = 238 \text{ } \mu\text{M}$) in 10 μL Aliquots aufgeteilt, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei $-80 \text{ } ^\circ\text{C}$ gelagert.

Für die Polymerisation wurde ein G-Aktin Aliquot aufgetaut und mit G-Puffer ($V = 238 \text{ } \mu\text{L}$, *vide infra*), DTT ($V = 1.25 \text{ } \mu\text{L}$, $c = 0.5 \text{ mM}$) und Adenosintriphosphat (Natriumsalz, ATP, $V = 0.75 \text{ } \mu\text{L}$, $c = 0.2 \text{ mM}$) versetzt und für 1 h unter Eiskühlung inkubiert. Daraufhin wurde die Probe zentrifugiert ($t = 15 \text{ min}$, $T = 4 \text{ } ^\circ\text{C}$, $17000 \times g$), um Aggregate abzutrennen. Der Überstand wurde abgenommen und in ein Plastikgefäß überführt.

Die *in situ* Polymerisation, die sich bis zu diesem Punkt gleicht, wird im nächsten Abschnitt separat erläutert. Im Fall der Vorpolymerisation von F-Aktin wurde wie

folgt weiter verfahren: Zum Überstand wurde die F1-Salzlösung ($V = 25 \mu\text{L}$, *vide infra*) gegeben und so die Polymerisation gestartet. Nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das F-Aktin mittels AlexaFluor®488 Phalloidin (vgl. Abb. 3.3, $V = 5 \mu\text{L}$, 1:70 bezogen auf G-Aktinkonzentration) fluoreszenzmarkiert. Es ergab sich eine Endkonzentration bezogen auf G-Aktin von $c_A = 8.5 \mu\text{M}$ beziehungsweise $c_A = 0.36 \text{ mg/mL}$.

Im Fall der F-Aktinbindung an porenüberspannende Lipidmembranen wurden die Filamente mit Hilfe von Phalloidin stabilisiert, um die AFM-gestützte Charakterisierung der Lipidmembranen zu erleichtern. Hierzu wurde 10 min nach der Fluoreszenzmarkierung Phalloidin ($V = 5 \mu\text{L}$, 1:1 bezogen auf G-Aktinkonzentration) zur F-Aktinlösung gegeben.

G-Puffer 5 mM Tris
 0.2 mM CaCl_2
 0.8 μM NaN_3
 pH 7.4 (HCl)

F1-Lösung 500 mM KCl
 20 mM MgCl_2
 20 mM ATP

Abbildung 3.3: Strukturformel von AlexaFluor®488 Phalloidin.

Phalloidin ist ein bizyklisches Heptapeptid und zählt zu den Phallotoxinen, welche in giftigen Pilzen gefunden werden.⁶⁰ Es bindet mit höherer Affinität an polymere Aktinfilamente als an deren Monomere und verschiebt das Gleichgewicht hin zu Polymeren und verhindert die Depolymerisation.^{61,62} Die F-Aktinlösung wurde bis zur Verwendung (maximal 2 Tage) bei 4 °C gelagert.

***In situ* Aktinpolymerisation**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *in situ* Polymerisation ausschließlich auf festkörperunterstützten Lipidmembranen (vgl. Abs. 3.3.1) durchgeführt. Für die *in situ* Polymerisation wurde ein halbes vorbereitetes G-Aktin Aliquot (vgl. Abs. 3.2.8) direkt auf die Probe gegeben ($V_{\text{ges}} \approx 1 \text{ mL}$, $c_{\text{ges,Aktin}} \approx 1 \mu\text{M}$) und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Polymerisation wurde *in situ* durch Zugabe von F1-Lösung ($V = 50 \mu\text{L}$) gestartet. Daraufhin wurden die Proben über Nacht bei 4 °C gelagert und am nächsten Morgen mit AlexaFluor®488 Phalloidin ($V = 5 \mu\text{L}$, 1:35 bezogen auf G-Aktinkonzentration) fluoreszenzmarkiert.

Einsatz Aktin-bindender Proteine

Im Falle Aktin-bindender Proteine wurden diese während der Vorpolymerisation von Aktin hinzugefügt. Vor der Zugabe der F1-Lösung wurden die Proteine Fascin beziehungsweise α -Aktinin in einem Verhältnis von 1:10 oder 1:20 bezogen auf die G-Aktinkonzentration hinzugegeben. Nach fünfminütiger Inkubationszeit wurde durch Zugabe der F1-Lösung die Polymerisation initiiert und wie oben beschrieben weiter Verfahren.

3.3 Präparative Methoden

3.3.1 Siliciumwafer

Reinigung und Hydrophilisierung

Zur Präparation von artifiziellen Lipidmembranen auf Siliciumwafern wurden polierte Siliciumträger, auf deren Oberfläche je nach Anwendung eine 0.1 oder 5.0 μm dicke Siliciumdioxidschicht aufgebracht war, mit Hilfe eines faseroptischen Ritzgriffels in 1.8 cm lange Rechtecke variierender Breite (0.6-1.0 cm) geschnitten. Diese wurden anschließend gründlich mit Ethanol p.a. und Reinstwasser gespült und in einem Teflonhalter platziert.

Anschließend wurden die Siliciumträger in einer 70 °C heißen ammoniakalischen Wasserstoffperoxidlösung (NH_3 (25%) : H_2O_2 (30%) : H_2O , 1:1:5 (v/v/v)) für circa 30 min inkubiert, um eine gereinigte und hydrophilisierte Oberfläche zu generieren. So präpariert konnten die Siliciumwafer für 24 h in Reinstwasser gelagert und für nachfolgende Messungen verwendet werden.

Für eine Messung wurden die Siliciumplättchen gründlich mit Ethanol p.a. und Reinstwasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Um die Güte der Hydroxidschicht an der Oberfläche zu optimieren wurden die Wafer für 3 min im Sauerstoffplasma behandelt. Die Wafer wurden daraufhin sofort in die entsprechende Messzelle eingebaut.

Die Siliciumwafer mit 5.0 μm dicker Oxidschicht konnten nach erneuter Reinigung und Hydrophilisierung, sofern keine großen Defekte und Unregelmäßigkeiten sichtbar waren, wiederverwendet werden.

Präparation einer festkörperunterstützten Lipidmembran

Festkörperunterstützte Lipidmembranen (engl. *solid supported lipid bilayers*, SLBs) werden durch das Spreiten von Vesikeln auf sauberen, glatten, hydrophilen Oberflächen, wie Siliciumdioxid, Titandioxid oder Glimmer ausgebildet.⁶³ Der Vorteil dieser Lipidmembranen ist ihre Fluidität, welche durch einen zwischen Lipidmembran und Substratoberfläche eingeschlossenen 1-2 nm dicken Wasserfilm, aufrechterhalten wird.^{64,65}

Viele Faktoren beeinflussen den Mechanismus und die Kinetik der Ausbildung von SLBs wie: Oberflächenchemie, Oberflächenladung, Lipidkopfgruppe, Temperatur, osmotischer Druck und Ionen.⁶⁶ In den letzten Jahren rückte die Beachtung der Grenzflächenelektrostatik in den Fokus. Bei der Wahl geeigneter Spreitbedingungen müssen Faktoren wie pH-Wert der Lösung, Ladung der Lipidkopfgruppe und Gegenwart bestimmter Ionen beachtet werden.⁶⁷

Zur Präparation einer festkörperunterstützten Lipidmembran wurden die Siliciumwafer wie unter Abschnitt 3.3.1 beschrieben vorbereitet und im Fall der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen in einem Teflonhalter platziert. Die Vesikellösung ($V = 250 \mu\text{L}$, vgl. Abs. 3.1.2) wurde direkt auf den Siliciumwafer pipettiert und mit dem entsprechenden Puffer aufgefüllt, so dass die gesamte Waferoberfläche großzügig benetzt war. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Messkammer mit Puffer gespült um überschüssige nicht gespreitete Vesikel zu entfernen. Daraufhin wurde die Güte der festkörperunterstützten Lipidmembran mittels Fluoreszenzmikroskopie (vgl. Abs. 3.7) kontrolliert und weitere Präparationsschritte konnten folgen.

Für rasterkraftmikroskopische Messungen, in denen das Gelphasenlipid DPPC als Ma-

trixlipid verwendet wurde, erfolgten die Präparationsschritte bei 55 °C. Die Siliciumwafer wurden in vorgewärmte AFM-Messkammern eingebaut und die SUV-Lösung ($V = 300 \mu\text{L}$) bei 55 °C zugegeben. Anschließend wurden 700 μL des der Vesikellösung entsprechenden Puffers zugegeben, so dass sich eine Konzentration von 0.3 mg/mL pro Probe ergab. Es wurde für 2 h bei 55 °C inkubiert und anschließend mit dem E1-Messpuffer gespült. Die Ausbildung und Güte der Lipidmembran wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert.

Proteinbindung an eine festkörperunterstützte Lipidmembran

Nach Präparation einer festkörperunterstützten Lipidmembran erfolgte im nächsten Schritt die Proteinbindung. Hierzu wurde die Lipidmembran mit dem Proteinpuffer (E1-Puffer) gespült. Anschließend wurde das Protein (Ezrin wt, Ezrin T567D oder N-ERMAD) in die Lösung gegeben, so dass sich eine Gesamtkonzentration von $c = 0.5\text{--}1.5 \mu\text{M}$ ergab. Die Probe wurde für ungefähr 3 h bei 4 °C inkubiert und daraufhin vorsichtig mit dem Proteinpuffer gespült. Wiederum wurden Effekte der Proteinbindung auf die Güte der Lipidmembran mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Für die fluoreszenzmikroskopische Studie zur Untersuchung ausgebildeter F-Aktinnetzwerke an SLBs (vgl. Abs. 5) wurde die Probe mit dem F-Aktinpuffer (F-Puffer, *vide infra*) gespült. Anschließend wurde entweder vorpolymerisiertes F-Aktin auf die Probe gegeben oder G-Aktin wurde *in situ* polymerisiert (vgl. Abs. 3.2.8) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Probe vorsichtig mit F-Puffer gespült und konnte fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.

F-Puffer 20 mM Tris
 2 mM MgCl_2
 50 mM KCl
 0.1 μM NaN_3
 pH 7.4 (HCl)

3.3.2 Poröse Siliciumnitridsubstrate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden porenüberspannende Lipidmembranen (engl. *pore spanning lipid bilayers*, PSLBs) auf porösen Siliciumnitridsubstraten der Firma fluXXion (Eindhoven, Niederlande) präpariert. Die Substrate wiesen eine Siebstruktur mit einem

Porendurchmesser von $1.2\ \mu\text{m}$ und einer Porosität von 41% auf. Die Poren waren zylindrisch geformt, hexagonal angeordnet und nach unten hin geöffnet (vgl. Abb. 3.4A).

Reinigung und hydrophile Funktionalisierung

Die porösen Substrate wurden zunächst mit Ethanol p.a. und Reinstwasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurden sie für 3 min im Argonplasma gereinigt. Eine dünne adhäsive Titanschicht wurde mit Hilfe eines Sputter-Beschichters aufgebracht ($I = 40\ \text{mA}$, $t = 20\ \text{s}$, $p = 0.1\ \text{mbar}$). Hierauf wurde Gold gedampft mit einer Schichtdicke von $30\ \text{nm}$ und einer Abscheidungsrate von ungefähr $0.3\ \text{nm}\cdot\text{s}^{-1}$ (vgl. Abb. 3.4B).

Abbildung 3.4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von porösen Siliciumnitridsubstraten mit einem Porendurchmesser von $1.2\ \mu\text{m}$. **A:** Gezeigt ist die zylindrische Form und die hexagonale Anordnung der Poren. **B:** Die aufgedampfte Goldschicht (weiß) ist in sich geschlossen und weist eine deutliche Abgrenzung zum Poreninneren auf.

Das Substrat wurde über Nacht in einer β -Mercaptoethanol-Lösung (10 mM in Isopropanol) inkubiert. Durch Chemisorption entstand eine hydrophile Funktionalisierung durch Ausbildung einer selbstorganisierenden Monoschicht (engl. *self assembled monolayer*, SAM). Am nächsten Morgen wurden die Substrate großzügig mit Isopropanol gespült, mit PBS-Puffer umspült und in die Messkammer eingebaut. Hierbei war darauf zu achten, dass die anschließende Zugabe der GUV-Lösung rasch erfolgte.

Präparation von porenüberspannenden Lipidmembranen

Nach der Vorbereitung der porösen Substrate konnten im nächsten Schritt wenige Mikroliter ($V = 2\text{--}10\ \mu\text{L}$) der GUV-Lösung zur Probe gegeben werden. Nach Zugabe der GUVs wurde die Probe für ungefähr 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Dichtegradient und

die hydrophile Oberfläche sorgen für ein rasches Absinken der GUVs auf die poröse Oberfläche und ein anschließendes Spreiten der Vesikel. Prinzipiell entsteht durch jeden auf der porösen Oberfläche gespreiteten Vesikel eine PSLB (vgl. Abb. 3.5), ein Lipidmembranfleck, welcher einige dutzend Poren überspannt. Anschließend wurden die Probe vorsichtig mit E1-Puffer (PIP₂) beziehungsweise PBS-Puffer (DOEPC) ($V = 10 \text{ mL}$) gespült.

Abbildung 3.5: Schematische Darstellung einer porenüberspannenden Lipidmembran (rechts) auf einem porösen goldbedampften und funktionalisierten Substrat (links) nach Spreiten eines GUVs (Mitte: fluoreszenzmikroskopische Darstellung eines GUVs).

Die Güte der ausgebildeten PSLBs wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Darauf folgte die rasterkraftmikroskopische Charakterisierung (vgl. Abs. 3.8.3) der porenüberspannenden Lipidmembranen.

Proteinbindung an porenüberspannende Lipidmembranen

Nach Präparation porenüberspannender Lipidmembranen (engl. *pore spanning lipid bilayers*, PSLBs) erfolgte im nächsten Schritt die Proteinbindung. Hierzu wurde die poröse Oberfläche zunächst mit Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA, $V = 100 \mu\text{L}$, $c = 2 \text{ mM}$) passiviert. Dies ist notwendig, da poröse Substrate im Vergleich zum planaren Festkörper eine hohe spezifische Oberfläche aufweisen und nur ein niedriger Belegungsgrad mit PSLBs erzielt wird. Somit wird durch BSA eine unspezifische Bindung der Proteine zum Substrat verhindert. Anschließend wurde vorsichtig mit dem Proteinpuffer (F- bzw. E1-Puffer) gespült.

Im Fall der PIP₂-haltigen PSLBs wurde nun Ezrin T567D ($V = 100\text{-}150 \mu\text{L}$, $c = 4\text{-}6 \mu\text{M}$) zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte die fluoreszenzmikroskopische und rasterkraftmikroskopische Charakterisierung. Vor Zugabe von F-Aktin wurde die Probe zunächst mit F-Puffer gespült.

Abschließend wurde sowohl zu den PIP₂-Ezrin T567D als auch zu den DOEPC-Proben

ein Aliquot vorpolymerisiertes F-Aktin (vgl. Abs. 3.2.8) gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurde die Probe vorsichtig mit F-Puffer gespült und daraufhin sowohl fluoreszenz- als auch rasterkraftmikroskopisch charakterisiert.

3.4 Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS)

Direkte optische Methoden eignen sich insbesondere um sensitive biomolekulare Interaktionen zu untersuchen. Der große Vorteil besteht in der Möglichkeit der *in situ* Messung und der nicht-invasiven Vorgehensweise.⁶⁸ In den letzten Jahrzehnten wurden neben den bekannten faseroptischen Sensoren auch Sensoren weiterentwickelt, welche auf dem Prinzip der Reflektometrie beruhen. Hierzu zählt die reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) als ein zeitaufgelöster, markierungsfreier, biochemischer Sensor mit dem sich optische Schichtdicken bestimmen lassen.⁶⁹

3.4.1 Physikalische Grundlagen

Die Methode basiert auf der FABRY PEROT Interferenz von Weißlicht an dünnen transparenten Schichten.^{70,71} Aus Veränderungen in Interferenzmustern lassen sich kleinste Änderungen in der optischen Dicke der Schicht ableiten und somit Prozesse wie Proteinbindung mittels RIfS detektieren.

Ausgangspunkt der Reflektometrie ist das SNELLIUSSCHE Brechungsgesetz, welches die Lichtbrechung an Grenzen von Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes n beschreibt, wobei α den Einfallswinkel und ϕ den Brechungswinkel beschreiben.⁵⁷

$$n_1 \sin(\alpha) = n_2 \sin(\phi). \quad (3.2)$$

Hierbei können drei Fälle unterschieden werden (vgl. Abb. 3.6), welche sich durch Unterschiede in den Brechungsindizes erklären.

Abbildung 3.6: Prinzip des SNELLIUSSCHEN Brechungsgesetzes. Die Brechung von einfallendem Licht mit dem Einfallswinkel α aus einem Medium mit dem Brechungsindex n_1 in ein Medium mit dem Brechungsindex n_2 und dem Brechungswinkel ϕ . **A:** Das Licht wird nicht gebrochen, wenn $n_1 = n_2$, das einfallende Licht wird transmittiert, so dass gilt $\alpha = \phi$. **B:** Der Lichtstrahl wird zum Lot hin unter dem Winkel ϕ geneigt, wenn $n_1 < n_2$ gilt. **C:** Der Lichtstrahl wird vom Lot weg geneigt, wenn $n_1 > n_2$ gilt.

In Abbildung 3.6A ist $n_1 = n_2$, so dass das einfallende Licht sowohl im gleichen Winkel reflektiert als auch transmittiert wird ($\alpha = \phi$). Ist $n_1 < n_2$, so gilt $\alpha > \phi$, das transmittierte Licht wird zum Lot hin geneigt und daher als refraktiert bezeichnet (vgl. Abb. 3.6B). Wenn $n_1 > n_2$ ist, so gilt $\alpha < \phi$ und das transmittierte Licht wird vom Lot weg geneigt (vgl. Abb. 3.6C).

Trifft Weißlicht mit dem Einfallswinkel α aus dem umgebenden Medium Wasser, mit dem Brechungsindex $n_1 = 1.333$ ($T = 20^\circ\text{C}$, $\lambda = 589\text{ nm}$, $p = 0.1\text{ MPa}$),⁷² auf die Grenzfläche zur Siliciumdioxidinterferenzschicht der physikalischen Schichtdicke d , so wird es sowohl im gleichen Winkel reflektiert (I_1) als auch transmittiert. Beim Eintritt in die Interferenzschicht mit größerem Brechungsindex $n_2 = 1.458$ (SiO_2 , $T = 20^\circ\text{C}$, $\lambda = 589\text{ nm}$)⁷³ wird der transmittierte Strahl im Winkel ϕ gebrochen.

Abbildung 3.7: Strahlengang bei der reflektometrischen Interferenzspektroskopie. Die lichtdurchlässige Siliciumdioxidschicht (Interferenzschicht) befindet sich auf dem lichtundurchlässigen Siliciumsubstrat. Trifft Weißlicht mit dem Einfallswinkel α aus dem umgebenden Medium (Wasser) mit dem Brechungsindex n_1 auf die Grenzfläche zur Siliciumdioxidschicht, so wird der Strahl teilweise reflektiert beziehungsweise transmittiert. Der transmittierte Strahl wird im Interferenzmedium mit dem größeren Brechungsindex n_2 unter dem Winkel ϕ gegen das Lot geneigt, trifft auf die lichtundurchlässige Siliciooberfläche und wird reflektiert.⁷⁴

Nach Durchlaufen der Schicht trifft der Strahl auf die lichtundurchlässige Siliciooberfläche, wird reflektiert (I_2) und beim Austritt ins wässrige Medium wiederum gebrochen. Der durch das Interferenzmedium transmittierte Strahl hat einen um die Strecke s längeren Weg zurückgelegt als der zuvor reflektierte Strahl. Diese lässt sich definieren als:

$$s = \frac{2d}{\cos(\phi)}. \quad (3.3)$$

Unter Berücksichtigung des Brechungsindex n_2 und der Strecke s ergibt sich ein Unterschied in der optischen Weglänge Δs :

$$\Delta s = \frac{2n_2d}{\cos(\phi)}. \quad (3.4)$$

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Messaufbau wird das Licht senkrecht zur Probe eingestrahlt, so dass $\alpha = \phi = 0$ gilt und Gleichung 3.4 sich zu Gleichung 3.5 vereinfacht :

$$\Delta s = 2n_2d. \quad (3.5)$$

Die Lichtstrahlen der Intensität I_1 und I_2 haben unterschiedliche optische Weglängen zurückgelegt, so dass hieraus eine Phasenverschiebung $\Delta\varphi$ resultiert. Dieser Phasenunterschied führt zur Verschiebung der Maxima und Minima der Wellen gegeneinander, so dass nach Superposition der Wellen ein spezifisches Interferenzmuster durch konstruktive und destruktive Interferenz entsteht. Die maximale konstruktive Interferenz bei maximaler Intensität tritt auf, wenn die optische Weglänge ein Vielfaches der Wellenlänge λ ist und somit gilt:

$$m\lambda_{\max} = 2n_2d \quad \text{mit } m \in \mathbb{N}. \quad (3.6)$$

Ein Minimum der Intensität, welches maximale destruktive Interferenz widerspiegelt, wird beschrieben durch:

$$\left(m + \frac{1}{2}\right)\lambda_{\min} = 2n_2d \quad \text{mit } m \in \mathbb{N}. \quad (3.7)$$

Die Phasenverschiebung $\Delta\varphi$ zweier Lichtstrahlen mit den Intensitäten I_1 und I_2 wird beschrieben durch:

$$\Delta\varphi(\lambda) = \frac{2\pi}{\lambda}n_2d\cos(\phi). \quad (3.8)$$

Da der Einfallswinkel α aufgrund der senkrechten Einstrahlung Null ist, ergibt sich für $\cos(\phi) = 1$ und Gleichung 3.8 vereinfacht sich zu:

$$\Delta\varphi(\lambda) = \frac{2\pi}{\lambda}nd = \frac{2\pi}{\lambda}OT. \quad (3.9)$$

Das Produkt aus n und der physikalischen Schichtdicke d wird als optische Schichtdicke OT bezeichnet und durch die Adsorption von Molekülen beeinflusst.

Zusammenhang zwischen Reflektivität und optischer Schichtdicke

Die Grundlage jeder Messung ist ein Intensitätsspektrum eines polierten Aluminiumsubstrats. Dieses dient als Referenz und gewährleistet eine nahezu vollständige Reflexion. Die Intensitätsspektren wurden bei optimaler Integrationszeit bezogen auf die maximale Intensitätsauflösungsgrenze des Spektrometers belichtet und unbelichtet aufgenommen und für folgende Messungen als Referenzspektrum (I_r) beziehungsweise Dunkelspek-

trum (I_d) verwendet. Somit erfolgte die Darstellung eines Reflektivitätsspektrums $R(\lambda)$ (vgl. Abb. 3.8) mit Hilfe des Programms SPECTRA SUITE unter Berücksichtigung des gemessenen Intensitätsspektrums (I_m) der Probe und der Referenzen I_r und I_d :

$$R(\lambda) = \frac{I_m - I_d}{I_r - I_d}. \quad (3.10)$$

Abbildung 3.8: Ermittlung des Reflektivitätsspektrums. Das Reflektivitätsspektrum (C) wurde aus den Intensitätsspektren des Siliciumwafers (A) und der Referenzspektren (B) I_r (blau) und I_d (rot) berechnet.⁷⁵

Die Reflektivität ist für nicht-absorbierende Schichten definiert über den FRESNEL-Reflexionkoeffizienten r_{123} als:⁷⁶

$$R(\varphi) \equiv |r_{123}|^2 = \frac{r_{12}^2 + r_{23}^2 + 2r_{12}r_{23} \cos(2\varphi)}{1 + r_{12}^2 r_{23}^2 + 2r_{12}r_{23} \cos(2\varphi)}. \quad (3.11)$$

Wobei ein FRESNEL-Koeffizient r_{xy} allgemein wie folgt definiert ist:

$$r_{xy} = \frac{n_x - n_y}{n_x + n_y}. \quad (3.12)$$

Setzt man den unter Gleichung 3.9 gezeigten Zusammenhang für die Phasenverschiebung φ in Gleichung 3.11 ein, ergibt sich:

$$R(\lambda, OT) = \frac{r_{12}^2 + r_{23}^2 + 2r_{12}r_{23} \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} OT\right)}{1 + r_{12}^2 r_{23}^2 + 2r_{12}r_{23} \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} OT\right)}. \quad (3.13)$$

Das gemessene Reflektivitätsspektrum (vgl. Abb. 3.8C) liefert nach Anpassung an Gleichung 3.13 die optische Schichtdicke OT . Durch eine zeitaufgelöste Messung von mehreren Reflektivitätsspektren ist eine Auftragung der optischen Schichtdicke OT gegen die Zeit t möglich.

Des Weiteren zeichnet sich Weißlicht im Gegensatz zu Laserlicht durch eine kurze Kohärenzlänge aus, so dass nur dann Interferenzen auftreten, wenn der Gangunterschied der reflektierten Teilstrahlen kleiner als die Kohärenzlänge ist. Dies wiederum hat zur Folge, dass die reflektierenden Grenzflächen in einem Abstand von 0.5-30 μm zueinander liegen müssen, das heißt innerhalb der Kohärenzlänge des Lichts, damit Interferenzen auftreten.^{68,77} Um biologisches Material untersuchen zu können, dessen Dicke sich im Fall einer monomolekularen Schicht im Bereich von 5-10 nm bewegt, wird eine zusätzliche transparente, 5 μm dicke Siliciumdioxidschicht verwendet, um den minimalen Grenzwert zu überschreiten. Diese Interferenzschicht wird um die biologische Schicht erweitert und muss daher einen ähnlichen Brechungsindex im Vergleich zur biologischen Schicht ($n = 1.46^{78}$) besitzen. Die Adsorption von Molekülen an der oberen lichtdurchlässigen Grenzfläche (SiO_2 , $n = 1.458^{73}$) hat daher kaum Einfluss auf den Brechungsindex n , sondern verändert in erster Linie die physikalische Schichtdicke d .

Im Gegensatz zur Ellipsometrie, wo Brechungsindex und physikalische Schichtdicke separiert detektiert werden können, kann mit Hilfe von RIfS nur das Produkt aus beiden detektiert werden. Die Anlagerung von Molekülen an die Interferenzschicht führt zu einer Rotverschiebung im Interferenzmuster und ist somit ein direkter Parameter für die Änderung der optischen Schichtdicke. Bis jetzt konnten Änderungen der OT von bis zu 1 pm aufgelöst werden, ein limitierender Faktor ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis.⁶⁹

3.4.2 Messaufbau

Die Messzelle (siehe Abb. 3.9) ist aus einem Acrylglasdeckel und einem Aluminiumboden aufgebaut. In den Aluminiumboden ist eine quadratische Fläche von 2.0 x 2.0 cm^2 eingelassen. Hier wird der Siliciumwafer aufgelegt. Der Acrylglasdeckel wird über kleine Schrauben auf dem Aluminiumblock fixiert. In der Mitte des Deckels befindet sich in voller Breite des Acrylglases, über der Position des Wafers, eine Einbuchtung. Somit ist der Deckel an dieser Stelle nur noch wenige Millimeter dick. In dieser Einbuchtung wird die optische Faser, die oberhalb fest verankert ist, platziert. Die gegabelte optische Faser ist aus sechs kreisförmig angeordneten beleuchteten Fasern einer Wolfram-Halogenlampe

Abbildung 3.9: Schematischer Aufbau der RfS-Messzelle. **A:** Querschnitt. **B:** Perspektivische Ansicht. Angefertigt nach:⁷⁵ **1:** Acrylglasdeckel, **2:** Aluminiumboden, **3:** Siliciumwafer mit SiO₂-Schicht, **4:** Flussweg, **5:** optische Faser.

(350-950 nm) und einer mittig angeordneten sammelnden Faser, die das Signal zum linearen UV/Vis-Silicium-CCD-Detektor (2048 Pixel) führt, aufgebaut. Unterhalb der optischen Faser und dem Deckel befindet sich der Siliciumwafer. Das Probenvolumen wird über einen Kanal im Acrylglasdeckel über eine Kontaktfläche von 30 mm² der Siliciumdioxidschicht geleitet. Diese direkte Kontaktfläche wird mit einem Kunststoffring abgedichtet. Die optische Faser wiederum erfasst 1 mm² des Probenbereichs. Der gesamte Messaufbau ist in Abbildung 3.10 gezeigt.

Abbildung 3.10: Schematischer Aufbau der RfS-Apparatur. Das Licht einer Wolfram-Halogenlampe wird in eine Y-förmige optische Faser gekoppelt. Das Licht wird zur Flusszelle mit enthaltener Probe geleitet. Das dort reflektierte Licht wird von der Faser erfasst und über einen CCD-Detektor mittels einer MATLAB-Routine am Computer ausgewertet. Angefertigt nach:⁷⁵

Die Messzelle wird über ein Schlauchsystem mit Hilfe einer Peristaltikpumpe kontinuierlich ($1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) mit Flüssigkeit durchflutet. Hierbei kann von einem offenen (Spülen) in einen geschlossenen (Zugaben) Kreislauf gewechselt werden.

3.4.3 Experimentelle Durchführung

Während einer Messung wurden in definierten Abständen (2 s) Reflektivitätsspektren mit der Software SPECTRA SUITE der Firma OCEAN OPTICS aufgenommen. Im Rahmen der Arbeit wurde die von DR. M. STEPHAN entwickelte Matlab-Routine von DR. I. MEY überarbeitet. Somit wurden die Messungen nach beiden Routinen durchgeführt und ausgewertet, welche sich in ihrer Nutzerfreundlichkeit und Kompatibilität unterscheiden. Hierzu wurde jeweils das Reflektivitätsspektrum zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ s}$ innerhalb des Wellenlängenbereichs von $\lambda = 500\text{-}700 \text{ nm}$ angepasst. Diese Parameter wurden dann für alle Reflektivitätsspektren der gleichen Messung verwendet.

Zur Durchführung einer RIfS-Messung wurde ein zuvor gereinigter und hydrophilisierter Siliciumwafer in die Messkammer eingebaut. Nun wurde das System mit Hilfe der Peristaltikpumpe für circa 3 min mit Puffer gespült und anschließend die Messung über die Programme SPEKTRA SUITE und MATLAB R2008A gestartet. Nach Einstellen einer konstanten Basislinie konnte mit Zugabe der Vesikellösung begonnen werden. Hierzu wurden die SUVs (vgl. Abs. 3.1.2) im geschlossenen Kreislauf zugegeben und eine festkörperunterstützte Lipidmembran konnte sich auf der 30 mm^2 großen Kontaktfläche des Siliciumwafers ausbilden. Die Bildung der Membran konnte zeitaufgelöst mit der Software verfolgt werden. Typischerweise lag die Zunahme der optischen Schichtdicke OT im Bereich von $5.8\text{-}6.2 \text{ nm}$ für eine Lipiddoppelschicht.⁷⁹ Nach Ausbildung der Membran wurden überschüssige Vesikel durch fünfminütiges Spülen des Systems im offenen Kreislauf entfernt. Daraufhin konnte die Proteinlösung im geschlossenen Kreislauf zugegeben werden. Nach Proteinzugabe wurde wiederum mit Puffer gespült um unspezifisch gebundenes und ungebundenes Protein zu entfernen. Nach erfolgter Messung wurde das Schlauchsystem stets mit Reinstwasser gespült und trockenlaufen gelassen.

3.5 ATR-FTIR-Spektroskopie

Die Infrarot-(IR)-Spektroskopie ist eine klassische Methode um die Struktur kleiner Moleküle zu bestimmen. Des Weiteren kann diese Methode aber auch eingesetzt werden um die Sekundärstruktur von Polypeptiden und Proteinen zu bestimmen.⁸⁰ Der Vorteil der

IR-Spektroskopie liegt in ihrem breiten Anwendungsspektrum, kurzen Messzeiten, geringer Probenkonzentrationen und moderaten Kosten.⁸¹ Das gemessene Signal wird nach Durchführung einer Fourier-Transformation (FT) in das eigentliche IR-Spektrum umgerechnet.

Die abgeschwächte Totalreflexions-IR-Spektroskopie (engl. *attenuated total reflection*, ATR) stellt eine Variante der IR-Spektroskopie dar, welche es, mit Hilfe eines speziellen Reflexionselements, ermöglicht Proben an Oberflächen untersuchen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sekundärstruktur von Ezrin und N-ERMAD mittels ATR-FTIR-Spektroskopie nach Bindung an eine festkörperunterstützte Lipidmembran bestimmt.

3.5.1 Physikalische Grundlagen

Infrarotspektroskopie an Proteinen

Elektromagnetische Strahlung in einem Wellenlängenbereich von 780 nm bis 1 mm wird als infrarote Strahlung bezeichnet. Klassischer Weise werden IR-Spektren gegen die Wellenzahl in der Einheit reziproker Zentimeter [cm^{-1}] aufgetragen. Wobei das Spektrum nach Konvention von hohen zu niedrigen Wellenzahlen verläuft, unter Berücksichtigung der steigenden Wellenlängen.⁸² Der Zusammenhang zwischen Wellenzahl $\tilde{\nu}$ und Wellenlänge λ lautet:

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda}. \quad (3.14)$$

Die Wellenzahl ist auch direkt abhängig von der Frequenz ν und der Lichtgeschwindigkeit c . Für die IR-Spektroskopie ergibt sich ein Wellenzahlbereich von $12\,800\text{ cm}^{-1}$ bis 10 cm^{-1} .

Bei der IR-Spektroskopie werden Übergänge zwischen Schwingungszuständen, in der Regel zwischen dem Grundzustand und dem ersten angeregten Zustand, gemessen.⁸³ Die Schwingungsanregung der Moleküle ist an ihr Dipolmoment gekoppelt. Während der Schwingung muss sich das Dipolmoment in mindestens einer Raumrichtung ändern. Unter Normalschwingungen versteht man voneinander linear unabhängige Schwingungen. Ein N -atomiges Molekül besitzt $3N-6$ Normalschwingungen (im Fall von linearen Molekülen $3N-5$), welche durch spezifische Frequenzen angeregt werden.

Größere Moleküle, wie zum Beispiel Proteine, können eine Vielzahl an Normalschwingungen aufweisen. Beispielsweise besitzt ein Protein mit 500 Aminosäuren, was in ähn-

licher Größenordnung der Aminosäureanzahl von Ezrin liegt, 20 000 Normalschwingungen.⁸⁴ Aufgrund der Vielzahl an möglichen Schwingungen in biologischen Molekülen ist eine spektrale Vereinfachung nötig. Das Konzept der charakteristischen Gruppenfrequenzen ist hier eine nützliche Näherung und basiert auf der Tatsache, dass spezifische Gruppen von Atomen, je nach chemischer Umgebung, nur geringfügig verschobene Anregungsfrequenzen ausweisen.⁸⁵

Für Proteine ist die Peptidbindung ein immer wiederkehrendes Strukturelement und führt mit den sogenannten Amid-Schwingungen zu spezifischen IR-Signalen (vgl. Tab. 3.3).

Tabelle 3.3: Charakteristische IR-Banden der Peptidbindung.*

Bezeichnung [†]	Wellenzahl [cm^{-1}]	Beschreibung [‡]
Amid A (s)	3300	NH_s
Amid B (s)	3100	NH_s
Amid I (s)	1690-1600	CO_s (80%), CN_s , CCN_d
Amid II (m)	1575-1490	NH_{ib} (50%), CN_s (30%), CO_{ib} , CC_s , NC_s
Amid III (w)	1300-1230	NH_{ib} (50%), CC_s (20%), CN_s , CO_{ib}
Amid V (s)	800-640	CN_t (75%), NH_{ab}
Amid IV (w)	765-625	CO_{ib} (45%), CC_s (35%), CNC_d

* basiert auf Studien an *N*-Methylacetamid, angepasst nach KONG und BANDEKAR^{80,86}

[†] s: stark, m: mittelstark, w: schwach

[‡] s: Streckung, d: Deformation, ib: In-der-Ebene Biegung, t: Torsion, ab: Aus-der-Ebene Biegung.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konzentrieren sich vor allem auf die Amid I-Bande im mittleren IR-Bereich (MIR) bei etwa 1650 cm^{-1} . Dieses Signal lässt sich größtenteils auf die $\text{C}=\text{O}$ Streckschwingung der Peptidbindungen (vgl. Abb. 3.11), aber auch auf Anteile der gegenphasigen CN Streck- und CCN Deformationsschwingungen zurückführen.

Abbildung 3.11: Schematische Darstellung der $\text{C}=\text{O}$ Streckschwingung einer Peptidbindung.

Die ungefähre Position von Infrarot-Absorptionsbanden lassen sich durch die Schwingungsmasse und die Art der Bindung vorhersagen, die exakte Position wird allerdings

durch inter- und intramolekulare Wechselwirkungen beeinflusst.⁸¹ Für Proteine ist der Einfluss durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen am stärksten. Gerade die Streckschwingungen von Donorgruppen können sich um mehrere Hundert Wellenzahlen verändern, Akzeptorgruppen hingegen, wie zum Beispiel C=O, werden wenig beeinflusst (Verschiebung um $5\text{-}25\text{ cm}^{-1}$).⁸³

Durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Peptidbindungen verschiedener Aminosäurestränge wird die Sekundärstruktur von Proteinen bestimmt. Unterschiede in der Geometrie der Wasserstoffbrückenbindungen führen zu α -helikalen, β -Faltblatt-, β -Schleifen- oder ungeordneten Strukturen, welche die Schwingung der Peptidbindungen beeinflussen. Da die Form der Amid I-Bande kaum von der Art der Aminosäureseitenketten, sondern von der Sekundärstruktur des Grundgerüsts abhängt, wird die Amid I-Bande bevorzugt zur Sekundärstrukturanalyse herangezogen.⁸⁴ Proteine, welche aus verschiedenen Sekundärstrukturelementen aufgebaut sind, zeigen im Bereich der Amid I-Bande ein breites Signal. Dieses setzt sich aus den überlagerten Signalen, unterschiedlicher Intensität und Position der Strukturelemente zusammen. Die ungefähre Bandenposition der einzelnen Strukturelemente ist literaturbekannt und in Tabelle 3.4 aufgelistet:

Tabelle 3.4: Zuordnung der Sekundärstrukturelemente zur Amid I-Bandenposition in $^1\text{H}_2\text{O}$.⁸⁷

Sekundärstrukturelement	Mittelwert [cm^{-1}]	Bereich [cm^{-1}]
β -Faltblatt	1684	1695-1674
	1633	1641-1623
β -Schleifen	1672	1686-1662
α -Helix	1654	1657-1648
Ungeordnet	1654	1657-1642

Inwiefern sich aus der Amid I-Bande auf die Anteile der einzelnen Strukturelemente zurückschließen lässt, wird in Kapitel 4.4.3 näher erläutert.

Prinzip und Aufbau eines FOURIER-Transform-IR-Spektrometers

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein IR-Spektrometer VERTEX 70 der Firma BRUKER verwendet. Hierbei handelt es sich um ein FOURIER-Transform-IR-Spektrometer (FTIR-Spektrometer). Als zentrales Bauteil dient ein MICHELSON-Interferometer, dessen Aufbau in Abbildung 3.12 schematisch dargestellt ist.⁸⁸

Durch einen halbdurchlässigen Spiegel wird der einfallende Strahl in zwei Teile geteilt. Die Strahlen werden von zwei Spiegeln reflektiert, wobei einer der Spiegel beweglich

angebracht ist. Nach erneutem Auftreffen auf den halbdurchlässigen Spiegel werden die beiden Teilstrahlen wieder zusammengeführt und laufen weiter in Richtung der Probenkammer. Über den beweglichen Spiegel kann die Wegstrecke einer der beiden Teilstrahlen bis zum erneuten Auftreffen auf den Strahlteiler variiert werden und somit ein Gangunterschied zwischen den Strahlen generiert werden. Je nach Wellenlänge kommt es zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz. Das Gerät misst nach Durchlaufen der Probenkammer die Lichtintensität in Abhängigkeit der Position des beweglichen Spiegels. Aus dem sogenannten Interferogramm wird ein wellenzahlabhängiges IR-Spektrum über eine FOURIER-Transformation berechnet.

Abbildung 3.12: Schematischer Aufbau eines MICHELSON-Interferometers.

Am Ende des Strahlenganges befindet sich der Detektor. Das BRUKER VERTEX 70 verfügt über zwei Detektoren, wobei der verwendete Halbleiterdetektor zur Minimierung des thermischen Rauschens mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird. Die Aufzeichnung und Teile der Auswertung der Spektren erfolgt computergestützt mit der Software OPUS der Firma BRUKER. Der Vorteil eines FTIR-Spektrometers im Vergleich zu dispersiven IR-Spektrometern, bei denen die Wellenzahlabhängigkeit über ein Beugungsgitter oder Prisma als Monochromator bestimmt wird, ist, dass die gesamte Strahlungsintensität gleichzeitig gemessen wird. Als Konsequenz ergibt sich ein deutlich verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis sowie eine hohe Messgeschwindigkeit.⁸¹

Prinzip und Aufbau einer abgeschwächten Totalreflexions-(ATR)-Messzelle

Im Gegensatz zum klassischen Transmissionsaufbau nutzt der ATR-Aufbau das Prinzip der Totalreflexion und ermöglicht Studien an oberflächenadsorbierten Proteinen in wässrigen Medien. Hier besteht der große Vorteil darin, dass Proteine markierungsfrei in ihrer natürlichen Membranumgebung untersucht werden können. Diese Technik ermöglicht zusätzlich die strukturelle Charakterisierung von Membranproteinen.⁸⁹ Weitere Vorteile sind die hohe Sensitivität der Methode, die geringe Probenkonzentrationen ermöglicht, und der deutlich reduzierte Einfluss der Wasserabsorption.⁹⁰

In dieser Arbeit wurde eine BRUKER BIOATR II Messzelle verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Messzelle, die nach dem Prinzip der abgeschwächten Totalreflektion (engl. *attenuated total reflectance*, ATR) arbeitet. Es wird an der Grenzfläche zwischen der Probe und einem dünnen transparenten Material (Silicium-Kristall) mit hohem Brechungsindex n_1 gemessen. Der IR-Strahl wird mit einem definierten Einfallswinkel in das innere Reflektionselement (engl. *internal reflection element*, IRE $\hat{=}$ Si-Kristall) eingekoppelt und mehrfach an der Grenzfläche zum optisch dünneren Probenmaterial n_2 totalreflektiert. Die Amplitude der elektromagnetischen Welle fällt aufgrund von quantenmechanischen Stetigkeitsbedingungen nicht abrupt auf Null ab, sondern es kommt zur Ausbreitung einer evaneszenten Welle gleicher Frequenz in das optisch dünnere Medium. Absorbiert das Probenmaterial im IR-Bereich, so findet eine Abschwächung der Strahlung in dem entsprechenden Frequenzbereich statt. Durch mehrere Totalreflexionen an der Kristall-Proben-Grenzfläche kommt es zu einer Verstärkung der Absorption.

An der Kristall-Puffer-Grenzfläche kommt es aufgrund des deutlich höheren Brechungsindex des IRE n_1 zur Totalreflexion. Der Einfallswinkel ϕ der Strahlung muss hierzu größer sein als der kritische Winkel ϕ_c ,⁹¹ welcher wie folgt definiert ist:

$$\phi_c = \sin^{-1} \left(\frac{n_2}{n_1} \right). \quad (3.15)$$

Die Brechungsindices n_1 und n_2 beziehen sich einerseits auf das IRE-Kristallmaterial (Silicium, $n_1 = 3.421$) und andererseits auf das Probenmaterial (Puffer/Wasser, $n_2 = 1.333$).^{72,92} Berechnet man nach Gleichung 3.15 an der Grenzfläche der zuvor aufgeführten Materialien den kritischen Winkel der Totalreflexion, so ergibt sich $\phi_c = 23^\circ$.

Bei der Totalreflexion tritt ein Teil der Strahlung als evaneszente Welle in die Pufferlösung, das optisch dünnere Material, ein. Die Amplitude E fällt exponentiell mit der

Entfernung z nach folgendem Zusammenhang ab:⁹⁰

$$E = E_0 \cdot \exp\left(-\frac{z}{d_p}\right). \quad (3.16)$$

Wobei E_0 die Anfangsamplitude und d_p die Eindringtiefe beziehungsweise charakteristische Abklinglänge darstellt, welche definiert ist als:⁹¹

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \cdot \sqrt{\sin^2 \phi - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}}. \quad (3.17)$$

Die Eindringtiefe d_p hängt neben den Brechungsindizes n_1 und n_2 auch von der Wellenlänge λ der eingekoppelten IR-Strahlung und dem Einfallswinkel ϕ ab. Nimmt man für den Winkel $\phi = 45^\circ$ an und setzt die zuvor genannten Brechungsindices ein, so ergibt sich für die IR-Strahlung im untersuchten Bereich mit einer mittleren Wellenzahl von $\tilde{\nu} = 1650 \text{ cm}^{-1}$ und somit einer Wellenlänge von $\lambda = 6.06 \text{ }\mu\text{m}$ eine Eindringtiefe von $d_p = 479 \text{ nm}$.

3.5.2 Experimentelle Durchführung

Für eine störungsarme Detektion des Messsignals war es notwendig, dass das Spektrometer durchgängig mit getrockneter Luft gespült und der Halbleiterdetektor mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde. Vor jeder Messung beziehungsweise zwischen den Messungen musste der ATR-Kristall gereinigt werden. Die Oberfläche des Kristalls wurde zweimal mit einem in Ethanol p.a. getränkten Wattestäbchen gereinigt und mit Ethanol p.a. (2x 100 μL) und MilliQ (5x 100 μL) gespült. Der Teflonstempel wurde mit einem feuchten, fusselfreien Labortuch gereinigt. Die Messzelle wurde mit Hilfe eines Thermostaten bei konstanter Temperatur ($T = 20^\circ\text{C}$) und über eine Peristaltikpumpe (Flussrate = 800 $\mu\text{L min}^{-1}$) im Durchfluss betrieben. Vor Beginn der Messung wurde die Messzelle mindestens 5 min mit Citrat-Puffer bei Messungen mit POPC/PIP₂-Lipidmembranen beziehungsweise Ca²⁺-haltiger-Puffer bei Messungen mit DOPC/DOGS-Ni-NTA-Lipidmembranen im offenen Kreislauf gespült. Die Steuerung der Messung und die zeitaufgelöste Darstellung sowie ein Teil der anschließenden Auswertung (vgl. Abs. 3.5.3) wurde mit der Software OPUS der Firma BRUKER statt. Folgende Parameter wurden für alle Messungen gleich gewählt:

Auflösung:	2 cm^{-1}
Messzeit Hintergrund:	120 scans (pro Spektrum)
Messzeit Probe:	60 scans (pro Spektrum)
Spektralbereich:	$4000\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$

Ergänzend wurde eine atmosphärische Kompensation durchgeführt, welche Signale hervorgerufen durch Wasserdampf und Kohlenstoffdioxid aus dem Spektrum herausrechnet. Vorbereitend für die Präparation der Lipidmembran auf der Kristalloberfläche wurde ein Hintergrundspektrum (des Puffers) aufgenommen und vom Messsignal abgezogen. Hierdurch stellte sich eine konstante Basislinie ein, die sich erst bei Zugabe der Vesikellösung veränderte. Die durch das Spreiten von Vesikeln an der Kristalloberfläche hervorgerufene Anreicherung der Lipide konnte durch die Zunahme typischer Absorptionsbanden von Lipiden im Bereich von 3000 cm^{-1} bis 2800 cm^{-1} (CH-Streckschwingungen) und um 1730 cm^{-1} (CH-Deformationsschwingungen der Fettsäuren) verfolgt werden. Nachdem keine Intensitätsänderungen der Banden mehr beobachtet werden konnten, wurde mit E1-Puffer im offenen Kreislauf gespült, um überschüssige Vesikel aus dem System zu entfernen. Nach Einstellen eines konstanten Messsignals/Spektrums wurde eine erneute Hintergrundmessung durchgeführt.

Anschließend erfolgte die Zugabe der Proteinlösung im geschlossenen Kreislauf, so dass sich eine Gesamtkonzentration von $c \approx 1\text{ }\mu\text{M}$ im System ergab. Zwei typische Spektren vor und nach Proteinzugabe sind in Abbildung 3.13 dargestellt.

Abbildung 3.13: ATR-FTIR-Absorptionsspektrum vor (grau) und nach (blau) Proteinzugabe im Bereich von $3100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ von Ezrin T567D gebunden an einer PIP_2 -haltigen Lipidmembran.

Die Proteinanbindung zeigt typische Banden im Bereich der Amid I-Bande (um 1650 cm^{-1}), der Amid II-Bande (um 1550 cm^{-1}) und der Amid B-Bande (2900 cm^{-1}). Abschließend wurde mit E1-Puffer im offenen Kreislauf gespült. Nachdem die Messung beendet war, wurde die Messzelle mit Reinstwasser gespült und wie anfangs beschrieben gereinigt.

3.5.3 Auswertung der ATR-FTIR-Spektren

Die Grundlage der Auswertung bildet pro Messung ein aus allen Proteinspektren gemitteltetes ATR-FTIR-Spektrum. Pro Messung wurden insgesamt 35 Spektren (aus jeweils 60 Spektren gemittelt) mit Hilfe der OPUS Software im Bereich der Amid I-Bande ($1720\text{--}1590\text{ cm}^{-1}$) ausgeschnitten und grundlinienkorrigiert. Des Weiteren wurden die Spektren normiert und stark abweichende Spektren gelöscht (besonders die Spektren direkt nach Proteinzugabe wichen stark ab). Abschließend wurde aus den übrigen Spektren ein Mittelwertspektrum generiert, welches mittels der PEAKFIT Software weitergehend analysiert wurde.

Das Anpassen der Amid I-Bande erfolgte nach zwei unterschiedlichen mathematischen Methoden: Das erste Verfahren nutzt die zweite Ableitung des Spektrums als Ausgangspunkt der Verfeinerung (*Second Derivative*-Methode), das Zweite beruht auf einer Bandenverschmälerungsmethode über FOURIER-Transformationen (*FOURIER Self-Deconvolution*-Methode).

Beide Methoden führten zur Anpassung von fünf GAUSS-LORENTZ-Kurven an die Daten, welche anschließend durch eine *Least-Square*-Anpassung verfeinert wurden. Die Integrale der Kurven entsprechen den Sekundärstrukturanteilen, welche anhand ihrer Position im Spektrum abzuleiten sind.⁸⁷ Die für die jeweilige Methode gewählten Startparameter sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Tabelle 3.5: Startparameter für die beiden Auswertemethoden mittels PEAKFIT.

<i>Second Derivative</i>	
Parameter	Wert
Smoothing	Sm% 11
Peak Type	Spectroscopy, Gauss+Lor Area, Amp% 15
AutoScan	Vary Width: Off, Vary Shape: Off, Refine Shape: On
<i>FOURIER Self-Deconvolution</i>	
Parameter	Wert
Deconvolution	Width: 20(FWHM), Filter: 85
Peak Type	Spectroscopy, Gauss+Lor Area, Amp% 15
AutoScan	Vary Width: Off, Vary Shape: Off, Refine Shape: On

Nachdem die Anpassungen mit den in Tabelle 3.5 genannten Parametern initialisiert wurden, wurde die Verfeinerung an die Daten so oft wiederholt bis keine Änderung des Bestimmtheitsmaßes r^2 mehr zu beobachten war. Die Ergebnisse der Anpassungen konnten sowohl in tabellarischer als auch graphischer Form ausgegeben werden. Voraussetzung für ein aussagekräftiges Ergebnis, bezüglich der ermittelten Sekundärstrukturverteilungen, war eine Übereinstimmung der Ergebnisse durch beide Auswertemethoden.

3.6 CD-Spektroskopie

Die CD (engl. *circular dichroism*, Zirkulardichroismus)-Spektroskopie stellt eine verbreitete Messtechnik dar, um die Struktur von Proteinen in Lösung zu untersuchen.⁹³ Darüber hinaus lässt sich die Konformation und Stabilität von Proteinen unter verschiedenen Bedingungen, wie variierender Temperatur, Ionenstärke, der Gegenwart von Lösungsmitteln oder kleinen Molekülen analysieren.⁹⁴

3.6.1 Zirkulardichroismus

Der Zirkulardichroismus bezeichnet die Eigenschaft chiraler, optisch aktiver Moleküle mit zirkular polarisiertem Licht zu wechselwirken. Hierbei absorbieren die beiden Enantiomere des Moleküls je nach Polarisationsrichtung des Lichts unterschiedlich stark.^{93,95} Zirkular polarisiertes Licht ist eine Kombination zweier sich orthogonal überlagernder linear polarisierter Wellen. Die beiden Wellen weisen einen Phasenunterschied zueinander auf, welcher $\Delta\lambda = \pm\lambda/4$ entspricht. Die Polarisation des Lichts liegt hierbei mit (rechts

polarisiert) oder gegen (links polarisiert) den Uhrzeigersinn vor. Zur Strukturaufklärung wird die Absorptionsdifferenz zirkular polarisierten Lichts in Abhängigkeit der Wellenlänge gemessen und ein CD-Spektrum generiert (vgl. Abb. 3.14).

Abbildung 3.14: Schematisch dargestelltes Prinzip eines CD-Spektrometers. Angefertigt nach:⁹⁵

Die Absorptionsdifferenz ΔA von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht ist definiert als:

$$\Delta A = A_L - A_R. \quad (3.18)$$

Zwischen der Absorptionsdifferenz und der Elliptizität θ_{abs} , in welcher der CD-Effekt in der Regel angegeben wird, herrscht ein einfacher numerischer Zusammenhang:⁹³

$$\theta_{\text{abs}}[\text{mdeg}] = \Delta A \cdot 32.98. \quad (3.19)$$

Bei Proteinspektren findet eine zusätzliche Normierung der absoluten gemessenen Elliptizität θ_{abs} auf die Proteinkonzentration c und die Aminosäureanzahl n_{AS} statt (vgl. Gl. 3.20).

$$\theta = \frac{\theta_{\text{abs}}[\text{mdeg}]}{c[\text{M}] \cdot l[\text{cm}] \cdot n_{\text{AS}} \cdot 10} [\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}]. \quad (3.20)$$

Hierbei steht l für die optische Weglänge der Küvette ($l = 0.1 \text{ cm}$) und θ wird als mittlere residuale Elliptizität bezeichnet.

Die Sekundärstruktur von Proteinen lässt sich mittels CD-Spektroskopie bestimmen, da die Peptidbindung asymmetrisch ist und im fernen UV-Bereich unter 250 nm absorbiert.

Die Amidbindung zeichnet sich durch zwei elektronische Übergänge aus, welche das CD-Spektrum im fernen UV-Bereich dominieren: ein $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei 220 nm und ein $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei 190 nm.⁹⁴ Wie auch bei der IR-Strahlung, ist die Absorption der UV-Strahlung abhängig von der chemischen Umgebung der Peptidbindung und somit der Sekundärstruktur des Proteins. Die Sekundärstrukturverteilung von Protein lässt sich aus CD-Spektren, welche sich aus überlagerten Signalen der einzelnen Sekundärstrukturelemente zusammensetzen, über Anpassungsroutinen berechnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die CD-Spektren mittels des Online-Analyseportals DICHROWEB nach dem Algorithmus CDSSTR und dem Referenzdatensatz 4 ausgewertet.⁹⁶⁻⁹⁸

3.6.2 Experimentelle Durchführung

Die Proteinlösungen wurden zunächst in Phosphatpuffer überführt, um die starke Absorption im fernen UV-Bereich durch Pufferbestandteile des E1-Puffers (wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)) zu vermeiden. Für die CD-spektroskopischen Untersuchungen wurde ein Probenvolumen von 200 μL und eine Proteinkonzentration von ungefähr 1 μM eingesetzt. Vor jeder Messung wurde die Proteinkonzentration über die UV/vis-Spektroskopie genau bestimmt. Für Messungen in Gegenwart von submizellaren PIP_2 -Konzentrationen wurde ein Protein-zu-Lipid-Verhältnis von 1:2 gewählt, woraus eine Konzentration von 2 μM PIP_2 resultierte.

Vor und nach Durchführung einer Messung wurde die Küvette für 20 min in HELLMANEX-Lösung bei 80 °C gereinigt. Die Messungen erfolgten an einem CD-Spektrometer J-810 der Firma JASCO bei 20 °C. Vor Beginn der Messung wurde die Argon-Lichtbogenlampe eingeschaltet und das Gerät 5 min mit Stickstoff gespült, um Sauerstoff zu verdrängen. Während der Messung wurde weiter mit Stickstoff gespült. Die computer-gestützte Steuerung der Messung erfolgte über die Software SPECTRAMANAGER I der Firma JASCO. Die in Tabelle 3.6 aufgelisteten Messparameter wurden eingestellt.

Tabelle 3.6: Messparameter der CD-spektroskopischen Messung im fernen UV-Bereich.

Parameter	Wert
Sensitivity	Standard 100 mdeg
Start	260 nm
End	190 nm
Data Pitch	0.1
Scanning Mode	Continuous
Scanning Speed	10 nm·min ⁻¹
Response	1 sec
Band Width	1.0 nm
Accumulation	5 (Puffer) oder 10 (Protein)

Hintergrundmessungen (Puffer) wurden fünfmal gemessen und vom Messsignal subtrahiert. Die Aufnahme des Proteinspektrums erfolgte zehnmal und wurde im Anschluss geglättet (SAVITZKY-GOLAY-Filter, Faktor: 15). Nach beendeter Messung wurde die Argon-Lichtbogenlampe ausgeschaltet und das Gerät noch für 5 min mit Stickstoff gespült.

3.7 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde insbesondere genutzt um die Planarität festkörperunterstützten Lipidmembranen und Organisation von Proteinen zu untersuchen. Die Visualisierung über lipidgekoppelte Fluorophore war essentiell für darauffolgende Präparationsschritte, welche wiederum proteingekoppelte Fluorophore umfassten.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie handelt es sich um eine optische, nicht-invasive Methode, die es ermöglicht Strukturen und Prozesse auf der Mikrometerskala sichtbar zu machen. Diese spezielle Form der Lichtmikroskopie nutzt das physikalische Phänomen der Fluoreszenz, bei der Moleküle mit Licht einer definierten Wellenlänge angeregt werden können und diese Energie in Form von Fluoreszenzstrahlung wieder emittieren. Hierzu werden fluoreszierende Moleküle beispielsweise an Proteine, Nukleinsäuren oder Lipide gebunden und die Intensitätsverteilung des angeregten Bereichs wird detektiert. Hierbei wird im Folgenden zwischen der Epifluoreszenzmikroskopie und der Konfokalmikroskopie unterschieden.

3.7.1 Physikalische Grundlagen

Fluoreszenz ist die Eigenschaft eines Moleküls Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und spontan bei einer längeren Wellenlänge wieder zu emittieren. Dieser Effekt beruht darauf, dass bei der Absorption von Licht das Molekül vom elektronischen Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_1 übergeht (siehe Abb. 3.15).

Abbildung 3.15: Jablonski-Diagramm.

Aus dem Schwingungsgrundzustand des angeregten Zustandes S_1 ist eine Relaxation in den elektronischen Grundzustand S_0 möglich. Die dabei freiwerdende Energie kann in Form von Fluoreszenz abgestrahlt werden. Da das Molekül bei diesem Prozess immer auch Schwingungsrelaxation erfährt, ist die emittierte Strahlung stets energieärmer und somit langwelliger als die absorbierte, kurzwelligere Strahlung. Dieses Phänomen wird als *Stokes-Shift* bezeichnet.^{57,99}

3.7.2 Epifluoreszenzmikroskopie

Bei der Epifluoreszenzmikroskopie wird im Allgemeinen das Licht einer Quecksilberdampf- oder Xenonlampe über das Objektiv des Mikroskops auf die Probe fokussiert und regt so die Fluoreszenzmoleküle der Probe an. Der schematische Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops ist in Abbildung 3.16 gezeigt.

Das kontinuierliche Spektrum der Lichtquelle wird durch einen Anregungsfilter geleitet, der nur für den Wellenlängenbereich durchlässig ist, den die Probe absorbiert. Anschließend trifft der nahezu monochromatische Strahl auf einen dichroitischen Spiegel (Strahlteiler), der kürzere Wellenlängen reflektiert und längere Wellenlängen transmittiert. Der

Abbildung 3.16: Schematischer Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops.

Strahlteiler lenkt das Licht auf die Probe und regt deren Fluoreszenz an. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht gelangt durch das Objektiv zurück zum dichroitischen Spiegel, der dieses an den dahinterliegenden Emissionsfilter transmittiert. Der Emissionsfilter lässt nur Licht des gewählten Wellenlängenbereichs durch und somit kann kein Streulicht das Okular beziehungsweise die Kamera erreichen.

Die Auflösung eines Epifluoreszenzmikroskops ist im Wesentlichen durch das Abbé-Limit begrenzt.¹⁰⁰ Die Beugung des Lichts an den optischen Komponenten des Mikroskops führt dazu, dass die Auflösungsgrenze bei etwa der Hälfte der Wellenlänge des beobachteten Lichts liegt. Das bedeutet, dass mit dem eingestrahlten, fokussierten Licht nicht ein beliebig kleiner Punkt der Probe beleuchtet wird, sondern ein gewisser Ausschnitt. Dies hat zur Folge, dass auch ein Teil der Fluoreszenz außerhalb der Fokusebene angeregt wird. Dadurch wird die Bildqualität verschlechtert, denn auch Fluoreszenzlicht aus den Ebenen ober- und unterhalb des Fokusses erreicht den Detektor. Das resultierende Fluoreszenzbild setzt sich demnach aus einer scharfen Abbildung der Fokusebene und

unscharfen Abbildungen der Bildpunkte ober- und unterhalb der Brennebene zusammen. Das Erkennen von optischen Details wird erschwert und das Bild erscheint unscharf.

3.7.3 Konfokalmikroskopie

Mit dem Konfokalmikroskop wird eine bessere Auflösung als mit dem Epifluoreszenzmikroskop erreicht. Grundlage der Konfokalmikroskopie ist das Konzept das MINSKY 1955 entwickelte. Der wesentliche Unterschied eines Konfokalmikroskops im Vergleich zu einem Weitfeldmikroskops ist die Einführung von Lochblenden und der Verwendung eines kohärenten Lasers zur Beleuchtung der Probe. Das eingestrahlte Laserlicht wird, um die Auflösung zu optimieren, vor dem Auftreffen auf der Probe moduliert, so dass es sich eher um eine analoge als digitale Technik handelt (vgl. Abb. 3.17).¹⁰¹

Abbildung 3.17: Schematischer Aufbau eines Konfokalmikroskops.

Das Laserlicht passiert zunächst einen Kollimator, welcher einen parallelen Strahlenverlauf erzeugt. Das Licht wird über einen dichroitischen Spiegel auf die Probe gelenkt, so dass die Probe gezielt über einen oszillierenden x-y-Scanspiegel beleuchtet wird.

Die Konfokalmikroskopie wird häufig auch als konfokale Laserrastermikroskopie (engl. *confocal laser scanning microscopy*, CLSM) bezeichnet. Denn um ein zweidimensionales Bild zu generieren, wird jeder Punkt aus dem sich die Fokusebene zusammensetzt nacheinander abgerastert. Hierbei wird nur ein kleiner fokaler Raum der Probe belichtet und stellt somit eine sensitivere Methode im Vergleich zur Epifluoreszenzmikroskopie dar. Das emittierte Fluoreszenzlicht passiert den dichroitischen Spiegel und wird über eine Tubuslinse gesammelt. Essentiell ist im Folgenden das einstellbare konfokale Pinhole, dieses sorgt dafür, dass nur Licht aus der Fokusebene den Detektor erreicht. Das Fluoreszenzlicht welches aus den Ebenen ober- und unterhalb der Brennebene emittiert wird (gestrichelte Linien) liegt meist nicht konfokal zum Pinhole. Dadurch kann das Fluoreszenzlicht, welches nicht im Fokus liegt, die Lochblende zwar erreichen, allerdings wird der Großteil des Lichts dort vom Pinhole ausgeschlossen.

Nach diesem Prinzip lässt sich die Tiefenschärfe der Abbildung deutlich verbessern, da die Hintergrundfluoreszenz deutlich vermindert wird und Bereiche außerhalb des Fokus erscheinen daher dunkler. Somit ergibt sich bei der Konfokalmikroskopie eine signifikant verbesserte Auflösung entlang der optischen Achse. Dies ermöglicht auch ein Rastern der verschiedenen z-Ebenen eines Objekts und damit eine 3D-Rekonstruktion der Probe.¹⁰²

Konfokale Fluoreszenzmikroskopie verbessert die x-y-Auflösung im Vergleich zur Epifluoreszenzmikroskopie. Die x-y-Auflösung d einer Aufnahme wird über das ABBÉ-Gesetz beschrieben:¹⁰⁰

$$d = \frac{\lambda_{\text{ex}}}{2n \cdot \sin \alpha} = \frac{\lambda_{\text{ex}}}{2 \cdot \text{NA}}. \quad (3.21)$$

Hierbei ist n der Brechungsindex des Linsenmediums und α der halbe Winkel der Objektivausrichtung zur Probe. Bei Verwendung von Objektiven mit hoher numerischer Apertur (NA) kann die Auflösung verbessert werden. Typischerweise liegt diese bei $\text{NA} \approx 1$, so dass die Auflösung ungefähr der halben Anregungswellenlänge λ_{ex} entspricht.

3.7.4 Experimentelle Einstellungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem konfokalen Mikroskop LSM 710 der Firma ZEISS (Jena, Deutschland) gearbeitet. Dieses war ausgerüstet mit einem Wasserimmersions-Objektiv mit 63facher Vergrößerung ($\text{NA} = 1$, W Plan Apochromat,

CARL ZEISS, Jena, Deutschland) und der Software ZEN 2012.

Die Lipidmembran-gekoppelten Fluorophore (vgl. Tab. 3.7) wurden mit folgenden Einstellungen angeregt und detektiert:

- TexasRed®1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (TxR-DHPE) Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 594$ nm mit einem Helium-Neon-Laser (2 mW, 5%), Detektionsbereich von $\lambda_{\text{em}} = 599$ -690 nm.
- Perylen Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 405$ nm mit einem Diodenlaser (30 mW), Detektionsbereich von $\lambda_{\text{em}} = 408$ -479 nm.
- BODIPY®TMR Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (BT-PIP₂) Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 561$ nm mit einem Festkörperlaser (engl. *diode-pumped solid-state laser* DPSS, 20 mW), Detektionsbereich von $\lambda_{\text{em}} = 574$ -619 nm.

Die Protein-gekoppelten Fluorophore wurden mit folgenden Einstellungen angeregt und detektiert:

- AlexaFluor®488 C₅-Maleimid (vgl. Abs. 3.2.7) Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm mit Argonlaser (25 mW, 5%), Detektionsbereich von $\lambda_{\text{em}} = 493$ -560 nm.
- AlexaFluor®488 Phalloidin (vgl. Abs. 3.2.8) Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm mit Argonlaser (25 mW, 3%), Detektionsbereich von $\lambda_{\text{em}} = 493$ -560 nm.
- Cy®3 (Cyanin®3 vgl. Abs. 4.4.4) Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 561$ nm mit einem DPSS-Laser (20 mW), Detektionsbereich von $\lambda_{\text{em}} = 493$ -560 nm.
- eGFP (engl. enhanced green fluorescent protein, vgl. Abs. 4.4.4) Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm mit Argonlaser (25 mW, 5%), Detektionsbereich von $\lambda_{\text{em}} = 493$ -560 nm.

3.7.5 Lipidmembran-gekoppelte Fluorophore

Tabelle 3.7: Übersicht der eingesetzten Lipidmembran-gekoppelten Fluorophore mit dazugehöriger Strukturformel und molarer Masse.

Fluorophor	Molare Masse M
<p>TexasRed®1,2-Dihexadecanoyl-<i>sn</i>-glycero-3-phosphoethanolamin (TxR-DHPE)</p>	1096.4 g·mol ⁻¹
<p>Perylen</p>	1057.0 g·mol ⁻¹
<p>BODIPY®TMR Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (BT-PIP₂)</p>	1704.78 g·mol ⁻¹

3.7.6 FRAP-Experimente

Zur Bestimmung der lateralen Mobilität von fluoreszierenden Molekülen eignen sich FRAP (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*)-Experimente, welche im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe einer Funktion der ZEN Software durchgeführt wurden.¹⁰³ Die Fluoreszenz einer festkörperunterstützten Lipidmembran oder markierten, SLB-gebundenen Proteinen mit der Anfangsfluoreszenzintensität I_A wurde hierzu in einem kreisförmigen Bereich (engl. *region of interest*, ROI) mit einem starken Laserpuls auf die Intensität I_0 geblichen und das Wiederkehren der Fluoreszenz über die Zeit bis zu

einer Gleichgewichtsintensität I_G detektiert.

Um aus dem zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität eines FRAP-Experiments eine Diffusionskonstante bestimmen zu können wurde dieser an Gleichung 3.22 angepasst.

$$I(t) = I_G - I_1 \cdot \exp \frac{-t}{T_1} . \quad (3.22)$$

Hierbei ist $I_1 = I_G - I_0$: der Intensitätsunterschied, welcher durch den mobilen Anteil und der Zeitkonstante T_1 hervorgerufen wird. Aus der Zeitkonstante lässt sich die charakteristische Diffusionszeit τ_D und hieraus die Diffusionskonstante D bei bekanntem Radius r des ROIs bestimmen.¹⁰⁴

$$\tau_D = \log 0.5 \cdot (-T_1) , \quad (3.23)$$

$$D = \frac{r^2}{4\tau_D} . \quad (3.24)$$

Der mobile Anteil F_m wurde nach folgendem Zusammenhang bestimmt (vgl. Gl. 3.25):

$$F_m = \frac{I_1}{I_A - I_0} . \quad (3.25)$$

Aufgrund des vereinfachten Diffusionsmodells handelt es sich bei den bestimmten Werten um eine qualitative Beschreibung der lateralen Mobilität.

3.7.7 Akzeptor-Photobleichexperimente

Eine Möglichkeit den FÖRSTER-Resonanzenergietransfer (FRET) zwischen zwei fluoreszierenden Molekülen zu untersuchen, stellen Akzeptor-Photobleichexperimente (basierend auf FRAP-Experimenten) dar. Der FRET-Effekt beschreibt einen strahlungslosen Energietransfer zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor (in den vorliegenden Experimenten Donor:eGFP und Akzeptor:Cy®3) der stark vom Abstand der beiden Fluorophore abhängt und somit Hinweise zu Konformationsänderungen liefern kann.¹⁰⁵ Die FRET-Effizienz ist definiert als der Anteil der vom Donor absorbierten Photonen, dessen Energie an den Akzeptor übertragen wird. Im Fall eines 1:1 Verhältnisses von Donor und Akzeptor hängt die FRET-Effizienz (%FRET) direkt vom Abstand r zwischen Donor und Akzeptor ab.¹⁰⁶

$$\%FRET = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6} . \quad (3.26)$$

Hierbei steht R_0 für den FÖRSTER-Radius, bei welchem die FRET-Effizienz 50% beträgt.

Das Prinzip von Akzeptor-Photobleichexperimenten beruht darauf, dass das Photobleichen des Akzeptors den vorliegenden FRET herabsetzt beziehungsweise zerstört und die Fluoreszenzintensität des Donors als Folge ansteigt. Zur Bestimmung der FRET-Effizienz wird die Fluoreszenzintensität des Donors vor dem Bleichvorgang (I_{DvorB} , in Gegenwart des Akzeptors) von der Fluoreszenzintensität des Donors nach dem Bleichvorgang (I_{DnachB}) subtrahiert und gegen den Wert nach dem Photobleichen normiert (vgl. Gl. 3.27).¹⁰⁷

$$\%FRET = \frac{I_{DnachB} - I_{DvorB}}{I_{DnachB}} \cdot 100\% . \quad (3.27)$$

Experimentelle Durchführung und Auswertung

Für die Untersuchung eines konformationsabhängigen FRET-Effekts von Ezrin an festkörperunterstützten Lipidmembranen wurden die SLBs, wie unter Abschnitt 3.3.1 beschrieben, präpariert. Anschließend wurde im Fall der doppelt fluoreszenzmarkierten Ezrinkonstrukte (Cy3-Ezrin wt-eGFP beziehungsweise Cy3-Ezrin T567D eGFP) mit je $1.5 \mu\text{M}$ und im Fall der einfach fluoreszenzmarkierten Ezrinkonstrukte (1:1-Mischungen aus: Cy3-Ezrin wt und Ezrin wt-eGFP beziehungsweise Cy3-Ezrin567D und Ezrin T567D-eGFP) mit je $0.75 \mu\text{M}$ inkubiert, so dass sich eine Gesamtproteinkonzentration von $c = 1.5 \mu\text{M}$ ergab. Unter der Annahme, dass alle Proteine mit einer ähnlichen Affinität und Kinetik binden, sollte ein 1:1 Verhältnis von Donor zu Akzeptor an der Lipidmembran vorliegen. Nach einer Inkubationszeit von 12-24 h bei 4°C wurde mit dem entsprechenden Puffer gespült.

Die FRET-Effizienz wurde durch Akzeptor-Photobleichexperimente bestimmt, in dem der Akzeptor mit einer Laserstrahlung von 561 nm in einem definierten Bereich (engl. *region of interest*, ROI) geblichen wurde.

Die Auswertung der FRET-Effizienzen aus den Akzeptor-Photobleichexperimenten erfolgte mit Hilfe des IMAGEJ Zusatzprogramms FRETALC.¹⁰⁸

Zur Auswertung der Zeitserien wurden vier repräsentative Aufnahmen benötigt. Je eine Aufnahme der Donor- und Akzeptorfluoreszenz vor und nach dem Bleichvorgang wurde ausgewertet.

3.7.8 Auswertung der Maschengrößen und Segmentlängen von F-Aktinnetzwerken

Auswertung der Maschengrößen

Die Auswertung der Maschengrößen fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken wurde anhand einer MATLAB-Routine entwickelt von DR. I. MEY durchgeführt. Sie basiert auf der Detektion der Filamentstrukturen und zusammenhängender, Filament-freier Flächen. Die Größen der Filament-freien Flächen werden über maximal große Kreise beschrieben und über deren Kreistradien ausgewertet.

Für die Auswertung wurden die Graustufen-Aufnahmen bearbeitet, in dem der Kontrast erhöht, eine Glättung durchgeführt und ein Schwellwert definiert wurde. Die .tif-Dateien konnten dann mittels der MATLAB-Kreisanalyse ausgewertet werden.

Auswertung der Segmentlängen

Die Auswertung der Segmentlängen fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken erfolgte mit Hilfe der frei erhältlichen Software SOAX.¹⁰⁹ SOAX ermöglicht es Parameter wie Länge, Orientierung und Kreuzungspunkte von Filamenten, aus Aufnahmen von 2D- und 3D-Netzwerken voll automatisiert zu extrahieren.¹¹⁰

Für die Auswertung wurden 16-bit Graustufen .tif-Dateien in das Programm geladen und die in Abbildung 3.18 dargestellten Parameter verwendet.

Abbildung 3.18: Parameter für Segmentlängenauswertung mittels SOAX.

Detektierte Filament(-segment)e werden als *Snakes* bezeichnet. Zunächst wird die Detektion der *Snakes* initialisiert (*Initialize Snakes*) und die Detektion dann gestartet (*Deform Snakes*). Hierbei wachsen die *Snakes* entlang der helleren Zentrallinie der Filamente indem sie eine Energiefunktion minimieren.¹¹¹ Nach der Bildanalyse, kann unter den Optionen des Programms die entsprechende Pixelgröße der Aufnahme angegeben werden, um die Segmentlänge auszugeben. Aufgrund der dichten F-Aktinnetzwerke, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, können mit Hilfe von SOAX keine Gesamtlängen, sondern nur Segmentlängen ausgewertet werden. Filamentsegmente sind definiert durch die Länge der Filamente zwischen zwei Kreuzungspunkten. Der nachträgliche Befehl *Cut snakes at junctions* stellt sicher, dass nur Segmentlängen detektiert werden, welche in tabellarischer Form ausgegeben werden.

3.8 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (engl. *atomic force microscopy*, AFM) ist eine hochauflösende Mikroskopietechnik, welche 1985 von G. Binnig, C.F. Quate und C. Gerber als Variante des Rastertunnelmikroskops entwickelt wurde.¹¹² Mit dieser Technik ist es möglich Topographien von Probenoberflächen in hoher Auflösung dreidimensional darzustellen. Eine axiale Auflösung von bis zu 0.1 nm und eine laterale Auflösung von bis zu 1.0 nm ist möglich.¹¹³ Ein großer Vorteil dieser Methode ist ihre Anwendbarkeit in wässrigen Medien, sowie die Untersuchung von nicht-leitenden Oberflächen. Dies ermöglicht es auch

biologische Proben unter physiologischen Bedingungen charakterisieren zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden AFM-Messungen durchgeführt, um einerseits mechanische Eigenschaften von porenüberspannenden Lipidmembranen durch Indentationsexperimente zu bestimmen. Im Fokus stand hier der Einfluss von gebundenem F-Aktin auf die Membranmechanik. Andererseits wurde Ezrin an festkörperunterstützte Lipidmembranen gebunden und die mittlere Höhe der Proteinschicht mittels AFM bestimmt.

3.8.1 Messprinzip

In der Rasterkraftmikroskopie wird die Probe durch Kontakt mit der Messspitze, welche an einem Federbalken (engl. *cantilever*) angebracht ist, abgetastet. Hierbei wird die Kraft welche zwischen Spitze und Probe herrscht bestimmt, indem die Auslenkung des Cantilevers gemessen wird. Somit lässt sich die Topographie der Probenoberfläche durch die Auftragung der Auslenkung des Cantilevers gegen die Position der Probe darstellen.¹¹⁴

Abbildung 3.19: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einem AFM MFP-3D der Firma ASYLUM RESEARCH (Santa Barbara, USA) gearbeitet. Hier wird der Cantilever an dem die Spitze lokalisiert ist, mit Hilfe eines z-Piezoscanners positioniert. Die Probe wiederum kann über einen x-y-Piezotisch in der Ebene bewegt werden. Grundlage ist das optische Lichtzeigerprinzip, bei dem die Auslenkung des Cantilevers als Antwort auf die Interaktion mit der Probe gemessen wird.¹¹⁵ Hierzu wird ein Lichtstrahl auf der reflektierenden Rückseite des

Cantilever fokussiert und über einen Kollimator und beweglichen Spiegel auf den Photodetektor gelenkt (vgl. Abb. 3.19). Die laterale oder vertikale Auslenkung des Cantilevers durch attraktive oder repulsive Krafteinwirkung führt zur Verschiebung des Lichtstrahls auf der Photodiode und somit einer Änderung des Messsignals.

Die Piezoelemente dienen sowohl der zweidimensionalen x-y-Rasterbewegung als auch einer z-Beweglichkeit, um den Abstand zur Probenoberfläche variieren zu können. Hierdurch ist es möglich, über die Auslenkung des Cantilevers, mit einer konstanten Kraft oder einem konstanten Abstand zu messen. Dies wird wiederum über eine Rückkopplungsschleife im AFM-Regler bewerkstelligt, welcher die Bewegung des z-Piezoelements steuert.¹¹⁶

3.8.2 Messmodi

Ein Rasterkraftmikroskop kann in drei unterschiedlichen Messmodi betrieben werden: Man unterscheidet den Kontakt-, kontaktlosen und den periodischen Kontakt-Modus. Diese Einteilung berücksichtigt die Art und Dynamik der Wechselwirkung mit der Probe. Der kontaktlose Messmodus soll an dieser Stelle nicht weiterbehandelt werden, da er für diese Arbeit nicht von Relevanz ist.

Der Kontaktmodus kann bei Einhaltung einer konstanten Höhe oder einer konstanten Kraft durchgeführt werden. Hierbei stehen die Messspitze und die Probe in direktem mechanischen Kontakt zueinander. Im Fall des konstanten Kraftmodus entsteht eine Abbildung der Oberflächentopographie durch die z-Piezo Regulation. Häufig wird dieser Modus zum Abrastern harter Oberflächen eingesetzt, denn die aufkommenden Reibungskräfte können zum Beispiel biologische Materialien beschädigen.¹¹⁴ Des Weiteren ist es möglich neben der Oberflächentopographie auch mechanische Eigenschaften der Probe zu bestimmen. Mittels Kraft-Abstandsmessungen ist es möglich Zellen und artifizielle Membransysteme zu untersuchen oder aber Einzelmolekül-Experimente durchzuführen.^{117–119} Indentationsexperimente eignen sich unter anderem dazu artifizielle Membransysteme bezüglich ihrer elastischen Eigenschaften zu untersuchen.¹²⁰ Hierzu werden Kraft-Abstandskurven gemessen, welche die Kraftantwort F des Cantilevers gegen den Proben-Spitzen-Abstand d darstellen (vgl. Abb. 3.20).

Abbildung 3.20: Schematische Darstellung einer Kraft-Abstandskurve. Während der Annäherung (A) interagieren Spitze und Probe nicht miteinander. An Punkt B, treten Probe und Spitze in Kontakt und der Cantilever reagiert abrupt aufgrund attraktiver Kräfte. Weitere Annäherung an die Probe führt zu einem Kraftanstieg durch die Indentation und den direkten Kontakt mit der Probe, bis ein bestimmter Grenzwert (C) erreicht ist. Bei dem Rückzug des Cantilevers bleibt die Spitze in Kontakt mit der Probe bis die Adhäsionskraft überwunden wird (D). Nach Überwinden dieser Kraft stellt sich wieder eine Basislinie ein, bei der Spitze und Probe nicht mehr in Kontakt stehen (E).

Ausgehend von der gemessenen Auslenkung des Cantilevers Z_c und der z-Piezo Position kann eine Kraft-Abstandskurve bei Kenntnis der Federkonstante des Cantilevers k_c abgeleitet werden. Nach dem HOOKSCHEN Gesetz ergibt sich für die gemessene Kraft F folgender Zusammenhang:

$$F = k_c Z_c. \quad (3.28)$$

Daher wurde vor jeder Messung die Federkonstante des verwendeten Cantilevers über die Kalibrierungsmethode des thermischen Rauschens bestimmt.¹²¹

Der periodische Kontaktmodus (engl. *intermittent contact mode* oder *tapping mode*) eignet sich besonders für die Untersuchung und Charakterisierung empfindlicher Proben wie zum Beispiel biologischem Material. Hierbei handelt es sich um einen dynamischen Messmodus, bei dem der Cantilever im Bereich seiner Resonanzfrequenz zur Schwingung angeregt wird. Die Amplitude der sinusförmigen Schwingung wird während der

Messung konstant gehalten und der Abstand zwischen Messspitze und Probe variiert.¹²² Zum Kontakt zwischen Messspitze und Probe kommt es im unteren Scheitelpunkt der Schwingung. Hierdurch werden mögliche Scherkräfte deutlich reduziert. Der *tapping mode* wird meist bei reduzierter Geschwindigkeit ausgeführt, um Ungenauigkeiten zu verhindern. Aufgrund der beschriebenen Vorteile wurde die Höhenanalyse der Ezrin-Proteinschicht auf festkörperunterstützten Lipidmembranen in diesem Messmodus durchgeführt (vgl. Abb. 3.21).

Abbildung 3.21: Schematische Darstellung einer AFM-Messung im periodischen Kontaktmodus. Gezeigt ist eine festkörperunterstützten Lipiddoppelschicht mit gebundenem Ezrin, welche bei konstanter Schwingungamplitude abgerastert wird.

3.8.3 Allgemeine experimentelle Durchführung

Zu Beginn der AFM Messung wurde zunächst der Cantilever mittels einer Schraube auf einem Glashalter fixiert. Die Halterung wurde in den AFM-Kopf eingebaut und die Probe unterhalb des AFM-Kopfes in einer Einbuchtung des x-y-Tisches platziert.

Der Cantilever wurde dann manuell mit der Pufferlösung in Kontakt gebracht, indem der AFM-Kopf über Stellschrauben heruntergefahren wurde. Das System wurde für 30 min thermisch äquilibriert und der Laserstrahl währenddessen mittig auf den vorderen Bereich des Cantilevers fokussiert, um ein maximales Signal zu erhalten. Darauf folgte eine Referenzmessung (Kraft-Abstandskurve) auf harter Oberfläche des Substrats, diese diente der Bestimmung des Kontaktpunktes der Messspitze, sowie der Sensitivität des Photodetektors. Des Weiteren wurde vor jeder Messung die Federkonstante des Cantilevers bestimmt. Diese wurde über das thermische Rauschen nach folgendem

Zusammenhang bestimmt (implementiert in der IGORPRO MFP3D Software):¹²¹

$$k_c = \frac{k_B T}{\langle \Delta Z_c^2 \rangle}. \quad (3.29)$$

Die mittlere, quadratische Cantilever Auslenkung $\langle Z_c^2 \rangle$, die Boltzmann Konstante k_B und die Temperatur T sind bekannte Parameter.

Nach erfolgter Äquilibration und Kalibration konnte manuell an die Probenoberfläche angenähert werden und die entsprechende Messung gestartet werden.

3.8.4 Durchführung von Indentationsexperimenten

Zur Durchführung von Indentationsexperimenten an porenüberspannenden Lipidmembranen ohne und mit gebundenem F-Aktin wurden weiche, trianguläre MLCT-Cantilever (C-Cantilever, $k_c = 5\text{-}20$ mN/m, BRUKER AFM PROBES, Camarillo USA) verwendet (vgl. Abb. 3.22).

Abbildung 3.22: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines MLCT Cantilevers.¹²³ Gezeigt sind die MLCT Cantilever B-F (von unten), welche an einem Siliciumnitrid-Chip angebracht sind (A). Die Detailaufnahme B zeigt die Spitze des verwendeten C-Cantilevers.

Die Vorbereitung der porösen Substrate, die Präparation der porenüberspannenden Lipidmembranen und die Inkubation mit filamentösem Aktin wurde wie in Kapitel 3.3 beschrieben durchgeführt.

Die Messparameter für die Indentationsexperimente wurden mit Hilfe der Software IGORPRO MFP3D größtenteils wie folgt definiert:

Scangröße:	8x8 μm^2
Trigger Point:	400-1000 pN (in Ausnahmefällen bis zu 1500 pN)
Scangeschwindigkeit:	2 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
Force Points:	32
Force Lines:	32
I-Gain:	3 bis 14

Die Messungen resultierten in sogenannten *Force Volume Maps* in denen jeder Pixel eine Kraft-Abstandskurve repräsentiert.

Verständnis und Interpretation von *Force Volume Maps* und Kraft-Abstandskurven

Nach durchgeführten Indentationsexperimenten an einer PSLB wurde eine, wie in Abbildung 3.23A dargestellte, *Force Volume Map* erstellt. Hier lassen sich die Poren deutlich vom Porensteg abgrenzen. Die Höheninformation der *Force Volume Map*, welche über die Grauskalierung kodiert ist, korreliert mit der Indentationstiefe des Cantilevers bis eine konstante Kraft erreicht ist. Daher unterscheiden sich einige Poren durch einen tiefer liegenden (schwarz) beziehungsweise einen höher liegenden Umkehrpunkt (dunkelgrau). Hierbei handelt es sich, unter Berücksichtigung der zurückgelegten Strecke des Cantilevers, einerseits um membrantragende (dunkelgrau) und andererseits um offene (schwarz) Poren.

Abbildung 3.23: *Force Volume Map* und Kraft-Abstandskurven einer porenüberspannenden Lipidmembran. **A:** *Force Volume Map*, welche die poröse Struktur des Substrats widerspiegelt und Lipidmembran überspannte (dunkelgrau) und nicht-überspannte (schwarz) Poren zeigt. Jeder Pixel repräsentiert eine Kraft-Abstandskurve. **B:** Auftragung dreier Kraft-Abstandskurven, membrantragende Pore (rot), freistehende Pore (blau) und Porensteg (grün). Die Indentation einer membrantragenden Pore (rot) zeigt einen linearen Kraftanstieg. Eine lineare Anpassung resultiert in der sogenannten apparenten Federkonstante k_{app} der Lipidmembran.¹²⁰

Verdeutlicht ist dies in den dargestellten Kraft-Abstandskurven (vgl. Abb. 3.23B), welche analog zur Markierung in der *Force Volume Map*, eine membrantragende Pore (rot), eine freistehende Pore (blau) und den Porensteg (grün) repräsentieren. Hierbei zeigen die blaue und grüne Kurve einen ähnlichen Verlauf. Im Bereich der Kraftantwort weisen sie einen senkrechten Verlauf auf, was für eine harte, nicht-deformierbare Oberfläche spricht. Die unterschiedlichen Kontaktpunkte mit $-0.82 \mu\text{m}$ (blau) und $0.00 \mu\text{m}$ (grün), zusammen mit der Kraftantwort, lassen auf eine offene, nicht-membrantragende Pore (blau) und den Porensteg (grün) schließen. Betrachtet man die rote Kurve, so weist diese im Bereich der Kraftantwort einen linearen Zusammenhang auf. Durch eine lineare Regression wird die sogenannte apparente Federkonstante k_{app} bestimmt, welche charakteristisch für eine membranüberspannte Pore ist und die mechanische Antwort der Lipidmembran während der Indentation wiedergibt.¹²⁰ Vergleicht man die Kontaktpunkte der unbedeckten und der überspannten Pore, so kann die Cantilever-Spitze ungefähr 800 nm tief in die unbedeckte Pore eindringen. Wohingegen der Kontaktpunkt der membrantragenden Pore nur ungefähr 20 nm tiefer liegt im Vergleich zum Porensteg (Nullpunkt).

Auswertung von *Force Volume Maps*

Die Auswertung der *Force Volume Maps* erfolgte zunächst vorbereitend mit der Messsoftware IGORPRO MFP3D, in dem relevante Kraft-Abstandskurven gesammelt wurden. Hierzu wurden nur zentral detektierte Kraft-Abstandskurven einer überspannten Pore ausgewählt. Indentationen der PSLB am Porenrand werden beeinflusst vom Porensteg und daraus resultiert eine verfälschte Lipidmembranmechanik.

Die ausgewählten Kraft-Abstandskurven wurden mit der Software MATLAB R2011A über eine von DR. I. MEY entwickelte Routine ausgewertet. Über eine lineare Regression der Indentationskurve wurde anhand der Steigung die apparente Federkonstante k_{app} bestimmt.¹²⁰ Hieraus lässt sich durch eine lineare, asymptotische Anpassung die laterale Membranspannung σ ableiten (vgl. Abs. 6.4.1).

3.8.5 Topographische Abbildungen

Die Durchführung der topographischen Abbildungen proteingebundener, festkörperunterstützter Lipidmembranen erfolgte größtenteils am MFP-3D der Firma ASYLUM RESEARCH. Ergänzende Daten wurden an dem NanoWizard 3 der Firma JPK INSTRUMENTS gesammelt. Es konnte gezeigt werden, dass sich hierdurch konsistente Datensätze ergaben und daher wird im Folgenden und unter Abschnitt 3.8.3 auf die Vorgehensweise an einem MFP-3D eingegangen.

Die Vorbereitung der Siliciumwafer, die Präparation der festkörperunterstützten Lipidmembranen und deren Inkubation mit Ezrin Wildtyp, Ezrin T567D und N-ERMAD wurden analog wie in Kapitel 3.3 beschrieben durchgeführt.

Zur Abbildung der topographischen Probenoberfläche wurden trianguläre MSCT- und MSNL-10-Cantilever (F-Cantilever, $k_c = 30\text{-}140\text{ mN/m}$, BRUKER AFM PROBES, Camarillo USA) mit scharfer Messspitze verwendet.

Für die Messung im *Tapping Mode* wurde zunächst die Resonanzfrequenz ($f_0 \approx 7\text{ kHz}$) des Cantilevers eingestellt und die Schwingungsamplitude auf 1 V reguliert. Der Sollwert (engl. *set point*) wurde auf 0.5 V gesetzt. Sobald ein Kontakt zwischen der Messspitze und der Probenoberfläche hergestellt war, wurden die Messparameter über die Software IGORPRO MFP3D wie folgt definiert:

Scangröße:	10 μm
Scanrate:	0.5 Hz
Scangeschwindigkeit:	12.5 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
Scanpunkte:	512
Scanlinien:	512

Sowohl der Sollwert als auch der *I*-Gain konnten während der Messung variiert werden, um die Bildqualität zu optimieren.

Die Bearbeitung und Auswertung der AFM-Daten erfolgte zunächst mit der Software GWYDDION 2.37 und darauffolgend mit MATLAB R2014A. Zur Höhenanalyse wurde eine von DR. I. MEY entwickelte MATLAB-Routine verwendet, welche unter Abschnitt 4.4.2 detailliert beschrieben wird.

Auswertung der Proteinhöhen

Bevor die AFM-Abbildungen genauer ausgewertet wurden, erfolgte zunächst eine grobe Vorauswahl mit der Messsoftware IGORPRO MFP3D. Hierbei wurden scharfe Abbildungen ausgewählt, welche wenige Abbildungsartefakte und einen geringen Anteil an unspezifisch gebundenem Lipidmaterial aufwiesen.

Abbildung 3.24: Auswertung der Proteinhöhe einer rasterkraftmikroskopischen Aufnahme einer DPPC-Lipidmembran nach Inkubation mit N-ERMAD. **A:** Ausschnitt einer AFM-Aufnahme, welche Lipidmembrandefekte (schwarz/braun), die Lipidmembran (braun) und gebundenes Protein (goldgelb) zeigt. **B:** Graustufen-Format von A. **C:** Höhenprofil entlang des blau markierten Bereichs in A.

Die ausgewerteten Abbildungen zeigen, wie in Abbildung 3.24A dargestellt, prinzipiell drei Farbabstufungen relativ zu den vorliegenden Höhen. Lipidmembrandefekte entsprechen den kreisförmigen, schwarz-braunen Bereichen. Das Lipidmembranniveau ist durch

einen helleren Branton gekennzeichnet und die goldenen Strukturen entsprechen dem gebundenen Protein. Anschließend wurden die Abbildungen in die Software GWYDDION eingelesen. Das Programm kann die Abbildungen nivellieren, Höhenprofile erstellen (vgl. Abbildung 3.24C) und die Höhenverteilung durch eine 1D-Statistikfunktion grob analysieren. Das Glätten der Abbildungen war aufgrund von auftretenden thermischen Drifts notwendig. Obwohl während einer Messung die Parameter stetig nachjustiert wurden, konnte es dennoch zu einer Verschiebung der Basislinie innerhalb eines AFM-Bildes kommen. Um hieraus resultierende Ungenauigkeiten zu verringern, wurde mittels GWYDDION jede AFM-Abbildung in mehrere quadratische Ausschnitte unterteilt und einzeln ausgewertet.

Zu jedem Ausschnitt wurden die Extrema der vorliegenden Farbskala bestimmt und der Ausschnitt im 16-bit Graustufen-Format (vgl. Abb. 3.24B) exportiert. Diese Datei wurde im nächsten Schritt mit Hilfe einer MATLAB-Routine, entwickelt von DR. I. MEY, ausgewertet. Vor der Auswertung musste zu jedem Fragment anhand von GWYDDION ein Nullwert bestimmt werden, der dem Lipidmembranniveau entsprach. Dieser Analyseschritt resultierte in einem Grundlinien-korrigierten Bild, wie es in Abbildung 3.25A dargestellt ist.

Abbildung 3.25: Auswertung der Proteinhöhe einer rasterkraftmikroskopischen Aufnahme einer DPPC-Lipidmembran nach Inkubation mit N-ERMAD. **A:** Grundlinien-korrigiertes Bild des AFM-Ausschnitts aus 3.24A. **B:** Histogramm der Proteinhöhenverteilung. **C:** Überlagerte Darstellung des AFM-Ausschnitts A mit den detektierten Proteinbereichen (grün).

Anhand einer Funktion zur Identifizierung von relativen Maxima kann ein Histogramm der Proteinhöhenverteilung erstellt werden (vgl. Abb. 3.25B). Der Grenzwert ist bei dieser Analyse von besonderer Bedeutung er sollte so gewählt sein, dass Abbildungsartefakte (im Bereich von 1 nm) nicht berücksichtigt werden, die erwartete Proteinhöhe aber nicht fälschlicherweise zu groß bestimmt wird. Aus diesem Grund variierte der Grenzwert bei

der Auswertung der AFM-Aufnahmen im Bereich von 0.7 nm bis 1.5 nm.

In Abbildung 3.25C ist die überlagerte Darstellung des AFM-Ausschnitts mit den detektierten Proteinbereichen (grün) dargestellt. Dies erlaubt eine Kontrolle der detektierten Bereiche mit dem Originalbild.

Nach Auswertung aller Abbildungen eines Proteins, wurde ein Histogramm mit Hilfe der Software ORIGIN PRO 8.5G angefertigt. Die mittlere Proteinhöhe wurde anhand des Maximums der Höhenverteilungen berechnet und wurde über die Anpassung einer GAUSS-beziehungsweise einer logarithmischen Normalverteilung bestimmt. Hieraus resultierten die Verteilungsmaxima x_c und die damit korrelierenden Fehler ($w = 2\sigma$). Die GAUSS-Verteilung ist durch Gleichung 3.30 definiert:

$$y = y_0 + \frac{A}{w \cdot \sqrt{\frac{\pi}{2}}} \cdot \exp \left[-2 \cdot \left(\frac{x - x_c}{w} \right)^2 \right]. \quad (3.30)$$

Wenn keine GAUSS-Verteilung der Proteinhöhen vorlag wurden die Daten an eine nicht symmetrische, logarithmische Normalverteilungsfunktion angepasst. Die Funktion ist durch Gleichung 3.31 definiert:

$$y = y_0 + \frac{A}{w \cdot x \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot \exp \left[\frac{-\left(\ln \frac{x}{x_c} \right)^2}{2 \cdot w^2} \right]. \quad (3.31)$$

4 Charakterisierung der Bindung von Ezrin an festkörperunterstützten Lipidmembranen

4.1 Einleitung

Ezrin ist Bestandteil der ERM (Ezrin, Radixin, Moesin)-Proteinfamilie und spielt eine Schlüsselrolle bei der Verknüpfung der Plasmamembran mit dem kortikalen Zytoskelett der Zelle. Hierzu bindet das Linkerprotein Ezrin N-terminal an das Phospholipid L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) der Plasmamembran und C-terminal an filamentöses Aktin (F-Aktin). Die Interaktion mit der Plasmamembran und dem Zytoskelett ist konformationsreguliert. Untersuchungen zeigten, dass die Proteine im Zytoplasma in einer inaktiven, geschlossenen Konformation und in einer aktiven, geöffneten Konformation bei der Interaktion mit der Plasmamembran und dem F-Aktin des Zytoskeletts vorliegen.^{21–23} In der inaktiven Form liegen N- und C-Terminus von Ezrin intramolekular assoziiert vor und die F-Aktinbindungsstelle ist maskiert.²¹ Der molekulare Regulierungsprozess, welcher zur Dissoziation von N- und C-Terminus führt, wird über die Phosphorylierung des Threoninrests 567 und die PIP₂-Bindung gesteuert.^{19,26} Auf Grundlage dieser Befunde wird ein zweistufiges Aktivierungsmodell diskutiert, bei dem die Proteine an PIP₂ binden und die nachfolgende Phosphorylierung des Threoninrests erleichtert wird.^{19,124} Die einzelnen Beiträge der beiden Aktivierungsfaktoren zum Konformationswechsel von Ezrin sind Gegenstand aktueller Forschung.

Im Rahmen dieses Abschnitts der Arbeit soll molekular analysiert werden, wie die Aktivierung von Ezrin reguliert wird. Im ersten Schritt soll ein neues Spreitprotokoll für PIP₂-haltige festkörperunterstützte Lipidmembranen etabliert werden, um hierauf aufbauend grundlegende Bindungseigenschaften von Ezrin charakterisieren zu können. Im zweiten Schritt folgt dann sowohl die Untersuchung der Proteinhöhen, als auch der Sekundärstruktur und eines FÖRSTER-Resonanzenergietransfers (FRETs) zwischen N- und C-Terminus des Proteins an festkörperunterstützten Lipidmembranen, um im Vergleich Aufschluss über die Beiträge von Phosphorylierung und PIP₂-Bindung zur Aktivierung Ezrins zu erhalten. Darüber hinaus soll durch eine möglicherweise veränderte Proteinhöhe, Proteinse-

kundärstruktur beziehungsweise einer FRET-Signaländerung ein Konformationswechsel nachgewiesen werden.

4.2 Ausbildung von festkörperunterstützten Lipidmembranen

- Teile dieses Kapitels wurden publiziert: Julia A. Braunger und Corinna Kramer, Daniela Morick, Claudia Steinem, Solid supported membranes doped with PIP₂: Influence of ionic strength and pH on bilayer formation and membrane organization, *Langmuir* **2013**, 29, 14204–14213.
- Reflektometrische interferenzspektroskopische Studien wurden von Jannik Heise im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt.
- Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Daniela Morick und Julia A. Braunger durchgeführt.

Für die Ausbildung festkörperunterstützter Lipidmembranen (engl. *supported lipid bilayers*, SLBs) gibt es unterschiedliche Methoden. Am weitesten verbreitet ist das Spreiten nanometergroßer Vesikel, welche zunächst auf dem Festkörper adsorbieren, reißen und anschließend miteinander fusionieren.^{66,125,126} Dieser Prozess resultiert in einer zusammenhängenden Lipidmembran, welche sich durch ihre Planarität und Langzeitstabilität auszeichnet.^{127,128}

In umfassenden Studien konnte gezeigt werden, dass die elektrostatischen Interaktionen während des SLB-Bildungsprozesses auf hydrophilen Oberflächen von besonderer Wichtigkeit sind.¹²⁹ Hierbei müssen sowohl intermolekulare Kräfte beachtet werden, welche zwischen benachbarten Lipiden entstehen, als auch attraktive und repulsive Kräfte die zwischen Vesikel und Substrat wirken.^{130,131} Faktoren, die demnach den Spreitvorgang von Vesikeln beeinflussen sind: Oberflächenchemie und -ladung des Substrats, Ladung der Lipidkopfgruppe, Temperatur, osmotischer Druck, sowie Art und Konzentration von Ionen in Lösung.^{63,132,133}

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass der Spreitvorgang von kleinen unilamellaren Vesikeln (engl. *small unilamellar vesicles*, SUVs), ab einem Anteil von über 4 mol% des Lipids L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), auf Siliciumdioxid-Siliciumwafern mediiert werden musste. Obwohl sich in natürlichen Zellmembranen nur ein geringer Anteil an PIP₂-Lipiden befindet, ist die Konstruktion von

artifiziellen Lipidmembranen mit einem erhöhten molaren Anteil an PIP₂ von Interesse, um in Proteinbindungsstudien ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis zu gewährleisten. Aus diesem Grund wurde in diesem Abschnitt der Arbeit die Ausbildung von POPC/PIP₂ Lipidmembranen mit einem molaren Anteil von 8 mol% an PIP₂ angestrebt und im Anschluss die Bindung des Linkerproteins Ezrin untersucht.

Des Weiteren sollte das Fusionsprotein Ezrin neben der Immobilisierung an das physiologische Rezeptorlipid PIP₂ auch über seinen His₆-Tag an DOGS-Ni-NTA-haltige SLBs gebunden werden. Dies soll eine separierte Betrachtungsweise der zwei Proteinaktivierenden Faktoren (Pseudo-)Phosphorylierung und PIP₂-Bindung ermöglichen.

Silicaoberflächen sind bei einem pH-Wert von 3.0 ungeladen (engl. *point of zero charge*) und tragen folglich im physiologischen Bereich eine negative Gesamtladung.¹³⁴ PIP₂ trägt durch die Phosphatreste der Kopfgruppe bei pH 7.4 ungefähr vier negative Ladungen.^{31,32} Somit mussten Strategien verfolgt werden, welche die elektrostatische Repulsion zwischen den Lipidkopfgruppen und der Substratoberfläche überwinden.

Die Verwendung von Calcium-haltigem Puffer ermöglichte dies und führte zur erfolgreichen Ausbildung sowohl DOGS-Ni-NTA- als auch PIP₂-haltiger Lipidmembranen. Begründet ist dies in der verbrückenden Funktion der Calciumionen zwischen der Carbonylgruppe und/oder Phosphatgruppe der Lipide und dem Substrat.^{125,135} In anschließenden Bindungsstudien zeigte sich, dass in Gegenwart von Calciumionen gespreitete DOGS-Ni-NTA-haltige Lipidmembranen eine hohe Ezrinbindekapazität aufwiesen und sich Calciumionen in diesem Fall als Spreitadditiv eignen. Im Gegensatz hierzu wiesen in Gegenwart von Calciumionen gespreitete PIP₂-haltige SLBs ein drastisch vermindertes bis kein vorhandenes Ezrinbindevermögen auf. Somit stellte sich eine Verwendung von Calciumionen als Spreitadditiv für PIP₂-haltige Lipidmembranen als ungeeignet heraus, um eine anschließende Ezrinbindung untersuchen zu können.

4.2.1 Einfluss von Ionenstärke und pH-Wert auf die Ausbildung PIP₂-haltiger festkörperunterstützter Lipidmembranen

Die zuvor beschriebene Problematik bei der Ausbildung PIP₂-haltiger festkörperunterstützter Lipidmembranen führte zu einer systematischen Studie, welche die Spreitbedingungen PIP₂-haltiger SLBs optimieren und gleichzeitig die anschließende Bindung von Ezrin ermöglichen sollte.

Hierzu wurden zwei grundsätzliche Ansätze verfolgt: die Variation von Art und Konzentration der Ionen und das Herabsetzen des pH-Wertes. Dies sollte einerseits zur

Abschirmung und andererseits zur Abschwächung der vorherrschenden negativen Ladungen führen.

Die generelle Abschirmung von Ladungen wird durch eine Erhöhung der Ionenstärke erreicht. Hierzu eignen sich theoretisch divalente Kationen, wie Calcium- (Ca^{2+}) oder Magnesiumionen (Mg^{2+}), welche Ladungen nicht nur abschirmen, sondern auch in der Lage sind direkt mit den Lipiden und dem Substrat zu wechselwirken.⁶³ Über Calciumionen ist bekannt, dass diese die Adsorption von Vesikeln am Festkörper, das Reißen und die Fusion der Vesikel bei der SLB-Ausbildung begünstigen.^{136,137}

Des Weiteren können monovalente Kationen, wie Natrium- (Na^+) oder Kaliumionen (K^+) die SLB-Bildung mediiieren, indem sie an negativ geladene Phospholipide adsorbieren.¹³⁸ Neben einer Reduzierung der DEBYE-Länge der Ladung stören einwertige Kationen auch das Wasserstoffbrückennetzwerk der Lipide.¹³⁹

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit vorliegende negative Ladungen durch eine pH-Wert Erniedrigung abzuschwächen.¹⁴⁰ Eine Reduktion des pH-Wertes auf 4.8 resultiert in einer verminderten negativen Oberflächenladung der Silica-Substrate, sowie einer Verringerung der Ladung des Rezeptorlipids PIP_2 auf -3 .^{32,134}

Im Folgenden soll der Einfluss dreier unterschiedlicher Spreitprotokolle auf die Ausbildung von POPC/ PIP_2 (92:8) Lipidmembranen und die Ezrinbindefähigkeit der PIP_2 -Kopfgruppe untersucht werden. Den Protokollen liegen folgende Puffer zugrunde, welche jeweils Abwandlungen der E1-Pufferzusammensetzung darstellen:

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der den unterschiedlichen Spreitprotokollen entsprechenden Pufferzusammensetzungen.

Spreitprotokoll	Pufferzusammensetzung
$\text{Ca}^{2+}/(\text{Mg}^{2+})$ -Ionen	20 mM Tris, 2 mM $\text{Ca}/(\text{Mg})\text{Cl}_2$, 50 mM KCl, 0.1 mM NaN_3 , pH 7.4 20 mM Tris, 50 mM KCl, 10 mM EDTA, 0.1 mM NaN_3 , pH 7.4
Hochsalz	20 mM Tris, 200 mM NaCl, 0.1 mM NaN_3 , pH 7.4
Niedrig-pH	20 mM Citrat, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM NaN_3 , pH 4.8
E1-Puffer	20 mM Tris, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM NaN_3 , pH 7.4

4.2.2 Ausbildung PIP₂-haltiger Lipidmembranen und anschließende Ezrinbindung in Gegenwart divalenter Kationen

Der Spreitvorgang der POPC/PIP₂ (92:8) Vesikel und die anschließende Ezrinbindung in Gegenwart divalenter Kationen wurde zeitaufgelöst mittels reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIfS, vgl. Abs. 3.4) detektiert. In Abbildung 4.1 sind zwei exemplarische RIfS-Kurven gezeigt, welche sowohl den Einfluss von Calciumionen als auch von Magnesiumionen auf den Spreit- und Ezrinbindungsprozess repräsentieren.

Abbildung 4.1: Zeitaufgelöste Änderung der optischen Schichtdicke OT eines hydrophilisierten SiO₂-Siliciumwafers nach Spreiten von POPC/PIP₂ (92:8) Vesikeln in Gegenwart divalenter Kationen mit anschließender Ezrininkubation, detektiert mittels RIfS. **A:** RIfS-Messung in Gegenwart von Calciumionen. Nach Spülen mit Ca²⁺-Puffer ($c = 2$ mM, **a**) erfolgte die Zugabe und das Spreiten der Vesikel (**b**), anschließendes Spülen mit EDTA-haltigem Puffer ($c = 10$ mM) (**c**), Spülen mit E1-Puffer (**d**), Zugabe von Ezrin wt ($c = 1.0$ μ M, **d**) und weiteres Spülen mit E1-Puffer (**e**). **B:** RIfS-Messung in Gegenwart von Magnesiumionen. Nach Spülen mit Mg²⁺-Puffer ($c = 2$ mM, **a**) erfolgte die Zugabe und das Spreiten der SUVs (**b**), anschließendes Spülen mit EDTA-haltigem Puffer (**c**), Spülen mit E1-Puffer (**d**), Zugabe von Ezrin wt ($c = 1.0$ μ M, **d**) und weiteres Spülen mit E1-Puffer (**e**).

Das Spreiten der Vesikel in Ca²⁺-haltigem Puffer (vgl. Abb. 4.1A) führte zu einer Zunahme der optischen Schichtdicke (engl. *optical thickness*, OT) um 10.2 nm, nach Spülen mit EDTA-haltigem Puffer sank dieser Wert auf 8.3 nm. Berechnet man die physikalischen Schichtdicken d der Lipidmembranen in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen, unter Berücksichtigung des Brechungsindex einer reinen POPC-Membran mit $n_{\text{POPC-SLB}} = 1.48$, so liegen diese vor beziehungsweise nach Spülen mit EDTA-haltigem Puffer bei 6.9 nm, respektive 5.6 nm.¹⁴¹ Die Werte liegen hiermit deutlich über der literaturbekannten physikalischen Schichtdicke einer reinen POPC-Lipidmembran von

$$d = 3.98 \pm 0.08 \text{ nm.}^{142}$$

Hieraus lässt sich ableiten, dass die Ausbildung einer planaren Lipiddoppelschicht nicht erfolgreich war. Es ist wahrscheinlich, dass weiteres Lipidmaterial an der Membran adsorbiert vorlag. Spülen mit EDTA-haltigem Puffer führte zu keiner vollständigen Desorption des überschüssigen Lipidmaterials.

Die anschließende Zugabe von Ezrin wt führte in der gezeigten Messung zu keinem detektierbaren Anstieg der *OT*. Auch in weiteren Messungen in Gegenwart von Calciumionen zeigt sich ein eher geringer, mittlerer Anstieg der *OT* von $1.4 \pm 1.7 \text{ nm}$ ($n=4$). Dies deutet darauf hin, dass die Verwendung von Ca^{2+} -Ionen beim Spreiten PIP_2 -haltiger Vesikel zu nicht-planaren Lipidmembranen führt, in denen die PIP_2 -Kopfgruppe größtenteils blockiert und nicht in der Lage ist Ezrin zu binden.

Die Verwendung von Magnesiumionen als Spreitadditiv, zeigte keine mittels RIfS detektierbare Ezrinbindung (vgl. Abb. 4.1B). Auch in weiteren Messungen in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen zeigte sich nur ein geringer Anstieg der *OT* von durchschnittlich $0.7 \pm 0.6 \text{ nm}$ ($n=4$). Die Ausbildung der SLB hingegen resultierte in einer durchschnittlichen Änderung der *OT* von $6.2 \pm 0.1 \text{ nm}$ ($n=4$) und lässt eine planare Lipiddoppelschicht ($d_{\text{SLB}} = 4.2 \pm 0.1 \text{ nm}$) ohne zusätzliches Lipidmaterial vermuten.

Somit scheinen Magnesiumionen das Spreiten von PIP_2 -haltigen Vesikeln hin zu planaren Lipidmembranen zu begünstigen. Allerdings bindet PIP_2 auch unter diesen Bedingungen kein oder kaum Ezrin, dies lässt sich nur durch eine starke Interaktion zwischen PIP_2 und den Mg^{2+} -Ionen erklären.

Im Fall der PIP_2 -haltigen Lipidmembranen in Gegenwart von Calciumionen ließ sich anhand der RIfS-Experimente ableiten, dass nicht-planare Lipidmembranen ausgebildet wurden. Aus diesem Grund wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt um einerseits das überschüssige Lipidmaterial nachzuweisen und andererseits die verminderte Ezrinbindung mittels markiertem Protein zu bestätigen.

Abbildung 4.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer festkörperunterstützten Lipidmembran bestehend aus POPC/PIP₂/Perylen (91:8:1), gespreitet in Gegenwart von Calciumionen, nach Inkubation mit Ezrin wt ($c = 0.5 \mu\text{M}$). **A:** Roter Kanal*, Perylen-Fluoreszenz der Lipidmembran. **B:** Grüner Kanal, AlexaFluor@488-Maleimid (AF) fluoreszenzmarkiertes Ezrin wt, Maßstabsbalken: 10 μm . *zur besseren Übersicht in Rot dargestellt

Die in Abbildung 4.2 dargestellten Fluoreszenzaufnahmen lassen eine Lipidmembran (rot) mit hell fluoreszierenden, kreisförmigen Strukturen erkennen (vgl. Abb. 4.2A). Diese kreisförmigen Strukturen konnten über die gesamte Probe beobachtet und als überschüssiges Lipidmaterial, wahrscheinlich nicht-gespreitete Vesikel, identifiziert werden. Das Material konnte auch durch Spülen mit EDTA-haltigem Puffer nur unzureichend entfernt werden und erklärt die erhöhte, mittels RfS detektierte SLB-Dicke.

Die Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Ezrin wt ($c = 0.5 \mu\text{M}$) resultierte in kleinen Proteinclustern (grün), welche mit dem überschüssigen Lipidmaterial kolokalisierten (vgl. Abb. 4.2B). Dies erklärt die geringe, durch RfS gemessene Änderung der optischen Schichtdicke nach Proteininkubation. Eine Pixelanalyse ergab eine Oberflächenbelegung mit Ezrin wt von $\Theta = 7 \pm 2\%$. Eine unspezifische Wechselwirkung zwischen fluoreszenzmarkiertem Ezrin und dem Matrixlipid POPC konnte in einem Blindexperiment ausgeschlossen werden. Die Fluoreszenzergebnisse stehen somit in Einklang mit den RfS-Ergebnissen und bestätigen die Ausbildung nicht-planarer PIP₂-haltiger Lipidmembranen in Gegenwart von Calciumionen.

Abschließend lässt sich feststellen, dass der Einsatz von zweiwertigen Kationen die Ausbildung PIP₂-haltiger Lipidmembranen vermittelt, allerdings eine verminderte oder ausbleibende Ezrinbindefähigkeit der PIP₂-Lipide zur Folge hat. Erklären lässt sich dies

nur durch eine Wechselwirkung zwischen den divalenten Ionen und PIP₂. Aufgrund der verbrückenden Wirkung von Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen erscheint ein Clustern der negativ geladenen PIP₂-Lipide plausibel. Die Folge ist eine Umverteilung der Lipide in der Membran, welche zu einer lokalen Anhäufung von PIP₂ führt. Somit ist die Gesamt-Ezrinbindefähigkeit durch die heterogene Verteilung drastisch herabgesetzt oder aufgrund der vorliegenden PIP₂-Cluster generell gehindert.

4.2.3 Ausbildung PIP₂-haltiger Lipidmembranen und anschließende Ezrinbindung in Gegenwart monovalenter Kationen

Auch in Gegenwart monovalenter Kationen wurde der Spreitvorgang der POPC/PIP₂ (92:8) Vesikel und die anschließende Ezrinbindung zeitaufgelöst mittels reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIfS) detektiert. In den durchgeführten Experimenten wurde die Konzentration an Natriumionen in Anlehnung an die Versuchsbedingungen von LEVENTAL *et al.* auf $c_{\text{Na}^+} = 200 \text{ mM}$ gesetzt.¹³⁹

In Abbildung 4.3 ist eine exemplarische RIfS-Messkurve gezeigt, welche den Einfluss von Na⁺-Ionen auf den Spreit- und Ezrinbindungsprozess repräsentiert. Das Spreiten der Vesikel in Gegenwart von Natriumionen führte zu einer Zunahme der optischen Schichtdicke um 6.2 nm, auch nach Spülen mit E1-Puffer blieb der Wert konstant. Im Mittel lag die Änderung der *OT* nach der Lipidmembranausbildung bei $6.3 \pm 0.3 \text{ nm}$ ($n = 5$), woraus sich eine physikalische Schichtdicke von $d_{\text{SLB}} = 4.3 \text{ nm}$ für die PIP₂-haltige Lipidmembran ergibt. Dieser Wert liegt etwas über dem aus der Literatur bekannten Wert der physikalischen Schichtdicke einer POPC-Lipidmembran. Hieraus lässt sich folgern, dass eine nahezu planare Lipiddoppelschicht ausgebildet wurde.

Abbildung 4.3: Zeitaufgelöste Änderung der optischen Schichtdicke OT eines hydrophilisierten SiO_2 -Siliciumwafers nach Spülen mit Na^+ -Hochsalzpuffer ($c = 200 \text{ mM}$, **a**) erfolgte die Zugabe und das Spreiten der Vesikel (**b**) bestehend aus POPC/PIP₂ (92:8), anschließendes Spülen mit E1-Puffer (**c**), Zugabe von Ezrin wt ($c = 1.0 \mu\text{M}$, **d**) und weiteres Spülen mit E1-Puffer (**e**), detektiert mittels RIfS.

Die Inkubation mit Ezrin wt führte zu einem Anstieg der OT um 0.9 nm . Durch anschließendes Spülen mit Puffer sank der Wert auf $\Delta OT = 0.6 \text{ nm}$, aufgrund der Desorption von reversibel gebundenem Protein. Insgesamt konnte ein Anstieg der OT nach Ezrinbindung von $\Delta OT = 0.9 \pm 0.5 \text{ nm}$, ($n = 4$) ermittelt werden. Der OT -Wert nach Ezrinbindung ist im Vergleich zu den gemessenen Werten unter Niedrig-pH-Bedingungen (vgl. Abs. 4.2.4) sehr niedrig. Auch in diesem Fall muss davon ausgegangen werden, dass die monovalenten Kationen mit der PIP₂-Kopfgruppe interagieren und hieraus eine drastisch verminderte Ezrinbindefähigkeit resultiert.

Aus diesem Grund wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt um die verminderte Ezrinbindefähigkeit mittels markiertem Protein zu bestätigen und zu untersuchen.

Abbildung 4.4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer festkörperunterstützten Lipidmembran bestehend aus POPC/PIP₂/Perylen (91:8:1), gespreitet in Gegenwart von Natriumionen, nach Inkubation mit Ezrin wt ($c = 0.5 \mu\text{M}$). **A:** Roter Kanal*, Perylen-Fluoreszenz der Lipidmembran. **B:** Grüner Kanal, AlexaFluor@488-Maleimid (AF) fluoreszenzmarkiertes Ezrin wt, Maßstabsbalken: 10 μm . *zur besseren Übersicht in Rot dargestellt

Die in Abbildung 4.4 dargestellte Fluoreszenzaufnahme zeigt eine Lipidmembran (rot) mit hell fluoreszierenden, kreisförmigen Strukturen (vgl. Abb. 4.4A). Diese kreisförmigen Strukturen wurden über die gesamte Probe beobachtet und überschüssigem Lipidmaterial zugeordnet. Das Material konnte auch nach großzügigem Spülen mit Puffer nur unzureichend entfernt werden und erklärt die leicht erhöhte, mittels RfS detektierte SLB-Dicke.

Die Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Ezrin wt ($c = 0.5 \mu\text{M}$) resultierte in vielen kleinen Proteinclustern (hellgrün) und wenigen, Mikrometer-großen Proteinclustern (vgl. Abb. 4.2B). Auch hier war eine Kollokalisierung des überschüssigen Lipidmaterials und der Proteincluster zu beobachten. Dies erklärt die geringe, durch RfS gemessene Änderung der optischen Schichtdicke nach Proteinzugabe. Eine Pixelanalyse ergab eine Oberflächenbelegung mit Ezrin wt von $\Theta = 17 \pm 2\%$. Die Fluoreszenzresultate stehen somit in Einklang mit den RfS-Ergebnissen und bestätigen die Ausbildung einer nahezu planaren PIP₂-haltigen Lipidmembran in Gegenwart von Natriumionen. Die Ezrinbindung konnte fluoreszenzmikroskopisch auch nur lokal und nicht homogen über die Lipidmembran verteilt, detektiert werden.

Der Versuch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen PIP₂-Kopfgruppe und Kation durch die Verwendung der größeren Kaliumionen (bezogen auf den Ionenradius) zu vermindern, um so eine erhöhte Ezrinbindefähigkeit zu gewährleisten, schlug fehl. Auch

in diesem Fall konnte nur eine verminderte Ezrinbindefähigkeit beobachtet werden. Darüber hinaus wurde mit Hilfe von RIfS-Titrationsexperimenten gezeigt, dass die eingesetzte Konzentration an Ezrin deutlich über der aus Quarzmikrowaage (engl. *quartz crystal microbalance*, QCM)-Experimenten ermittelten Sättigungskonzentration von $c = 125 \text{ nM}$ noch zu Änderungen der *OT* führte ($c = 6 \text{ }\mu\text{M}$).³⁰ Somit würden für dieses System erst viel höhere Ezrinkonzentrationen zu einer maximalen Oberflächenbelegung mit Protein führen und lassen daher monovalente Kationen als Spreitadditiv für PIP₂-haltige Vesikel wenig geeignet erscheinen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass monovalente Kationen die Ausbildung nahezu planarer, PIP₂-haltiger Lipidmembranen mit wenig überschüssigem Lipidmaterial medieren. Allerdings wurde ähnlich zu dem Effekt zweiwertiger Kationen nur eine verminderte Ezrinbindefähigkeit festgestellt.

4.2.4 Ausbildung PIP₂-haltiger Lipidmembranen bei pH 4.8 und anschließende Ezrinbindung

Nachdem der Einfluss von Kationen auf den Spreit- und Ezrinbindungsprozess PIP₂-haltiger Lipidmembranen untersucht wurde, sollte im Folgenden der Effekt einer pH-Wert-Reduktion, zur Abschwächung der vorherrschenden negativen Ladungen, mittels RIfS untersucht werden. Hierzu musste zunächst ein geeigneter pH-Wert, welcher das Spreiten von POPC/PIP₂ (92:8) Vesikeln mediert, ermittelt werden. Durch sukzessive Reduktion des pH-Wertes während des Spreitvorgangs wurde ein kritischer pH-Wert von 4.8 bestimmt, ab welchem die Vesikel spreiteten. Unter diesen Bedingungen ist PIP₂ dreifach negativ geladen.³² Ein neuer Spreitpuffer wurde eingeführt, welcher als geeignete Puffersubstanz Citrat enthielt (50 mM KCl, 20 mM Na-Citrat, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM NaN₃, pH 4.8 (NaOH)).

In Abbildung 4.5 ist eine exemplarische RIfS-Messkurve gezeigt, welche den Einfluss des erniedrigten pH-Wertes auf den Spreitprozess und die anschließende Ezrinbindung zeigen soll. Das Spreiten der PIP₂-haltigen Vesikel bei pH 4.8 führte zu einer Zunahme der optischen Schichtdicke, welche nach Spülen mit E1-Puffer konstant bei 6.6 nm blieb. Dieser Schritt gewährleistete das Einstellen eines physiologischen pH-Wertes von 7.4 für die folgende Proteinbindung. Im Mittel lag die Änderung der *OT* nach der Lipidmembranausbildung bei $6.2 \pm 0.3 \text{ nm}$ ($n = 22$), woraus sich eine physikalische Schichtdicke von $d_{\text{SLB}} = 4.2 \pm 0.2 \text{ nm}$ für die PIP₂-haltige Lipidmembran ergibt. Dieser Wert ist

ähnlich zu dem aus der Literatur bekannten Wert der physikalischen Schichtdicke einer POPC-Lipidmembran ($d_{\text{SLB}} = 3.98 \pm 0.08 \text{ nm}$).¹⁴² Hieraus lässt sich folgern, dass eine nahezu planare Lipiddoppelschicht ausgebildet wurde.

Abbildung 4.5: Zeitaufgelöste Änderung der optischen Schichtdicke OT eines hydrophilisierten SiO_2 -Siliciumwafers nach Spülen mit Niedrig-pH-Puffer ($\text{pH} = 4.8$, **a**) erfolgte die Zugabe und das Spreiten der Vesikel (**b**) bestehend aus POPC/ PIP_2 (92:8), anschließendes Spülen mit E1-Puffer ($\text{pH} = 7.4$, **c**), Zugabe von Ezrin wt ($c = 1.0 \mu\text{M}$, **d**) und weiteres Spülen mit E1-Puffer (**e**), detektiert mittels RfS.

Die Inkubation mit Ezrin wt führte zu einem Anstieg der OT um 6.5 nm . Durch anschließendes Spülen mit Puffer sank der Wert, aufgrund der Desorption von reversibel gebundenem Protein, auf $\Delta OT = 4.7 \text{ nm}$. Insgesamt konnte ein Anstieg der OT nach Ezrinbindung von $\Delta OT = 6.4 \pm 0.6 \text{ nm}$, ($n = 6$) ermittelt werden. Der OT -Wert nach Ezrinbindung ist im Vergleich zu den zuvor gemessenen Werten in Gegenwart von Kationen deutlich höher. Es kann davon ausgegangen werden, dass der pH -Wert von 4.8 den Spreitvorgang begünstigt und planare Lipidmembranen ausgebildet werden, welche sich durch eine gute Zugänglichkeit der PIP_2 -Kopfgruppe für die Ezrinbindung auszeichnen.

Hieran anknüpfende fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen sollten die Planarität und Kontinuität der PIP_2 -haltigen Lipidmembranen und die Ezrinbindefähigkeit des Systems bestätigen.

Abbildung 4.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer festkörperunterstützten Lipidmembran bestehend aus POPC/PIP₂/Perylen (91:8:1), gespreitet unter Niedrig-pH-Bedingungen, nach Inkubation mit Ezrin wt ($c = 0.5 \mu\text{M}$). **A:** Roter Kanal*, Perylen-Fluoreszenz der Lipidmembran. **B:** Grüner Kanal, AlexaFluor@488-Maleimid (AF) fluoreszenzmarkiertes Ezrin wt, Maßstabsbalken: 10 μm . *zur besseren Übersicht in Rot dargestellt

Die in Abbildung 4.6 dargestellte Fluoreszenzaufnahme zeigt eine Lipidmembran (rot) mit wenigen hell fluoreszierenden, kreisförmigen Strukturen (vgl. Abb. 4.6A), welche den erzielten Ergebnissen unter Hochsalzbedingungen ähnelt. Die kreisförmigen Strukturen können, wie bereits erwähnt, durch überschüssiges Lipidmaterial erklärt werden. Die Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Ezrin wt ($c = 0.5 \mu\text{M}$) resultierte in einer homogenen, grünen Fluoreszenz (vgl. Abb. 4.2B) auf der gesamten Lipidmembranoberfläche. QCM-Studien haben gezeigt, dass ab einem PIP₂-Rezeptorlipidgehalt von 6.5 mol% eine maximale Oberflächenbelegung mit Protein erreicht werden kann.³⁰ Dies ist hier (8 mol% PIP₂) offensichtlich gegeben.

Die Fluoreszenzergebnisse stehen somit in Einklang mit den RIfS-Ergebnissen und bestätigen die Ausbildung einer planaren PIP₂-haltigen Lipidmembran bei pH 4.8. Der etwas erhöhte mittels RIfS detektierte Wert für die physikalische Schichtdicke der ausgebildeten Lipidmembran, könnte mit dem Rezeptorlipid PIP₂ zusammenhängen. Es ist bekannt, dass PIP₂ aufgrund der sterisch anspruchsvollen Kopfgruppe 4-6 Å über die eigentliche Lipidmembranoberfläche hinausragt, was bei einem Anteil von 8 mol% zu einer minimal erhöhten Schichtdicke der Lipidmembran führen würde.¹⁴³ Somit lässt sich die leicht erhöhte Schichtdicke einerseits durch das PIP₂-Lipid selbst und andererseits durch wenig, überschüssiges Lipidmaterial erklären.

Die Bindung AlexaFluor@488-Maleimid-markierten Ezrins zeigte fluoreszenzmikroskopisch eine hohe Oberflächenbelegung.

Die Reduktion des pH-Wertes während der Ausbildung von PIP₂-haltigen Lipidmembranen resultiert somit in der Ausbildung planarer Lipidmembranen, welche bei physiologischem pH-Wert weiterhin stabil sind und die Zugänglichkeit der PIP₂-Kopfgruppe für die Bindung Ezrins in vollem Umfang gewährleisten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ezrinbindefähigkeit des PIP₂-Lipids von der Pufferzusammensetzung, in welcher die Lipidmembran ausgebildet wurde, abhängig ist. Denn trotz der Bindung Ezrins unter den gleichen Pufferbedingungen, ist diese stark von den Spreitbedingungen beeinflusst. Dies legt den Schluss nahe, dass die unterschiedlichen Bindungskapazitäten der SLBs für Ezrin in einer heterogenen Verteilung der PIP₂-Lipide begründet liegen. Dies führt dazu, dass PIP₂ bei einer lokalen Anhäufung (Clustering) aus sterischen Gründen nur wenige Ezrinmoleküle binden kann. Darüber hinaus blockiert das überschüssige Lipidmaterial im Fall der Calcium-Spreitbedingungen weitere PIP₂-Bindungsstellen.

4.2.5 Verteilung der PIP₂-Lipide innerhalb einer festkörperunterstützten Lipidmembran

Zur näheren Untersuchung der unterschiedlichen Ezrinbindungskapazitäten, resultierend aus verschiedenen Spreitbedingungen bei der Ausbildung PIP₂-haltiger Lipidmembranen, wurde die PIP₂-Verteilung innerhalb der SLB anhand eines Fettsäurefluoreszenzmarkierten PIP₂-Derivats (BODIPY®TMR-PIP₂ C₁₆) analysiert.

Die in Abbildung 4.7 gezeigten Fluoreszenzaufnahmen verdeutlichen den Einfluss der Spreitbedingungen, folglich den von Ionenstärke und pH-Wert, auf die PIP₂-Verteilung in der Lipidmembran.

Abbildung 4.7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen festkörperunterstützter Lipidmembranen bestehend aus POPC/PIP₂/BODIPY®TMR-PIP₂/Perylen (91:7.5:0.5:1). Darstellung der PIP₂-Verteilung bei drei unterschiedlichen, zugrunde liegenden Spreitbedingungen. **1:** In Gegenwart von Calciumionen ($c = 2$ mM) gespreitet. **2:** In Gegenwart von Natriumionen ($c = 200$ mM) gespreitet. **3:** Bei niedrigem pH-Wert von 4.8 gespreitet. **A:** Blauer Kanal, Perylen-Fluoreszenz der Lipidmembran. **B:** Roter Kanal, BODIPY®TMR-PIP₂-Fluoreszenz, Maßstabsbalken: 10 μ m.

Die in Gegenwart von Calciumionen präparierte PIP₂-SLB (vgl. Abb. 4.7.1) weist neben dem überschüssigen Lipidmaterial (hell fluoreszierende Bereiche in beiden Kanälen), welches eine Beurteilung der PIP₂-Verteilung in der darunter liegenden Lipidmembran erschwert, eine eher inhomogene PIP₂-Verteilung auf.

Deutlicher wird dies im Fall der einwertigen Natriumionen (vgl. Abb. 4.7B2). Hier ist die Fluoreszenz des PIP₂-Derivats sehr inhomogen innerhalb der SLB verteilt im Gegensatz zum Lipidmembranfluorophor Perylen, welcher eine homogene, blaue Fluoreszenz aufweist.

Die Lipidmembran, welche bei niedrigem pH-Wert präpariert wurde, weist eine signifikant homogenere PIP₂-Verteilung auf (vgl. Abb. 4.7B3). Neben kleinen Defekten in der Lipidmembran (schwarze Punkte), welche mit dunklen Bereichen in der Perylenfluoreszenz koloalisieren, weisen beide Kanäle eine homogen erscheinende Fluoreszenz auf. Dies spricht für die Abwesenheit gebildeter PIP₂-Domänen oder -Cluster unter Berücksichtigung der Auflösungsgrenze des Fluoreszenzmikroskops von ungefähr

200-250 nm.¹⁴⁴

Aus den erzielten Ergebnissen zur Verteilung PIP₂ unter den gegebenen Spreitbedingungen lässt sich die eingangs aufgestellte These untermauern. Nur die Niedrig-pH-Spreitbedingungen führen zu einer homogenen Verteilung des PIP₂-Fluorophors in der Lipidmembran. Hieraus lässt sich schließen, dass die durch Kationen-induzierte heterogenere PIP₂-Verteilung beziehungsweise PIP₂-Cluster, sowie gebundenes, überschüssiges Lipidmaterial, ursächlich für die verminderte Ezrinbindefähigkeit sind.

4.2.6 Laterale Mobilität der PIP₂-Lipide innerhalb von festkörperunterstützten Lipidmembranen

Da sich die Art der Spreitbedingungen für PIP₂-haltige Vesikel drastisch auf die Verteilung der Lipide innerhalb der ausgebildeten festkörperunterstützten Lipidmembran auswirkte, sollte die laterale Mobilität der PIP₂-Lipide genauer beleuchtet werden. Denn trotz gleich gewählter Pufferbedingungen nach der Lipidmembranausbildung, blieben während des Spreitprozesses ausgebildete PIP₂-Verteilungsinhomogenitäten beziehungsweise PIP₂-Cluster auch unter den veränderten Bedingungen stabil. Dies deutet darauf hin, dass sich der immobile Anteil und die laterale Mobilität der PIP₂-Moleküle, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Spreitsysteme, unterscheidet.

Aus diesem Grund sollte die PIP₂-Diffusion in SLBs bestehend aus POPC/PIP₂/BODIPY®TMR-PIP₂/Perylen (91:7.5:0.5:1) unter den drei verschiedenen Spreitbedingungen mit Hilfe von FRAP-Experimenten (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*, vgl. Abs. 3.7.6) untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass das Fluoreszenzsignal der in Gegenwart von Calciumionen ausgebildeten SLBs, aufgrund des überschüssigen Lipidmaterials, zu heterogen war, um weiter untersucht werden zu können.

Die Mobilität von PIP₂ in Lipidmembranen, welche sowohl bei pH 4.8, als auch unter Hochsalzbedingungen ($c_{\text{Na}^+} = 200 \text{ mM}$) ausgebildet wurden, konnte mittels FRAP analysiert werden. Eine typische Zeitserie eines FRAP-Experiments ist in Abbildung 4.8 dargestellt. Zu sehen ist die zunächst homogene BODIPY®TMR-PIP₂-Fluoreszenz, welche zum Zeitpunkt $t=0 \text{ s}$ in einem definierten Bereich (engl. *region of interest*, ROI) irreversibel durch einen kurzen Laserpuls zerstört/gebleicht wird. Über die Zeit diffundieren umliegende fluoreszenzmarkierte PIP₂-Moleküle in den Bleichspot hinein und die Fluoreszenz kehrt zum Teil wieder (vgl. Abb. 4.8C-D).

Abbildung 4.8: Zeitserie eines FRAP-Experiments an einer festkörperunterstützten Lipidmembran bestehend aus POPC/PIP₂/BODIPY®TMR-PIP₂/Perylen (91:7.5:0.5:1) unter Niedrig-pH-Bedingungen gespreitet. **A:** BODIPY®TMR-PIP₂-Fluoreszenz vor dem Bleichen. **B:** BODIPY®TMR-PIP₂-Fluoreszenz zum Zeitpunkt des Bleichens, Bleichspot (schwarzer Kreis) ist scharf abgrenzt. **C-D:** BODIPY®TMR-PIP₂-Fluoreszenz nach dem Bleichen, Bleichspot verblasst aufgrund der Diffusion umliegender PIP₂-Moleküle in diesen Bereich. Maßstabsbalken: 20 μm .

Hieraus konnte nach AXELROD *et al.* (vgl. Abs. 3.7.6) sowohl die Diffusionskonstante D als auch der mobile Anteil F_m der Fluoreszenzmoleküle für die zwei unterschiedlichen Spreitbedingungen ermittelt werden (vgl. Abb. 4.9).^{104, 145}

Abbildung 4.9: Säulendiagramm, welches die laterale PIP₂-Mobilität in POPC/PIP₂/BODIPY®TMR-PIP₂/Perylen (91:7.5:0.5:1) Lipidmembranen, welche bei niedrigem pH-Wert (grau schraffiert) oder Hochsalzbedingungen (rot schraffiert) präpariert wurden, darstellt. Links: Diffusionskonstante von BODIPY®TMR-PIP₂. Rechts: Mobiler Anteil der BODIPY®TMR-PIP₂-Moleküle.

Für PIP₂-haltige Lipidmembranen, welche bei niedrigem pH-Wert gespreitet wurden, ergab sich eine Diffusionskonstante von $D = 2.8 \pm 0.3 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ und ein mobiler Anteil von $F_m = 64 \pm 3\%$. PIP₂-haltige Lipidmembranen, welche in Gegenwart von Natriumionen gespreitet wurden, wiesen eine Diffusionskonstante von $D = 2.0 \pm 0.7 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ und einen

mobilen Anteil von $F_m = 25 \pm 11\%$ auf.

Hieraus lässt sich ableiten, dass die Mobilität der PIP₂-Lipide durch die hohe Konzentration an Natriumionen während des Spreitprozesses signifikant reduziert ist. Bezüglich des hohen immobilen Anteils in beiden Fällen sei anzumerken, dass mit Hilfe von FRAP-Experimenten an festkörperunterstützten Hybridmembranen indirekt gezeigt werden konnte, dass die dem Festkörper zugewandten PIP₂-Lipide größtenteils immobil sind.⁶⁷ Die Fluoreszenzrückkehr nach FRAP-Experimenten an SLBs resultiert demnach hauptsächlich aus der Diffusion der Lipide in der oberen Monoschicht und erklärt die Persistenz des Bleichspots auch nach längerer Zeit.

Es konnte festgestellt werden, dass durch Natriumionen vermitteltes Spreiten von PIP₂-haltigen (8 mol%) Vesikeln zu einer reduzierten lateralen Mobilität der PIP₂-Lipide führt im Vergleich zu unter Niedrig-pH-Bedingungen ausgebildete SLBs. Sowohl die Diffusionskonstante als auch der mobile Anteil der fluoreszenzmarkierten PIP₂-Moleküle war durch die Verwendung von Natriumionen verringert. Zusammen mit den Erkenntnissen zur PIP₂-Verteilung und der Ezrinbindekapazität lässt sich postulieren, dass die heterogene Verteilung der PIP₂-Lipide in SLBs, durch Natriumionen (und Calciumionen) stabilisiert wird und eine Reduktion der lateralen Mobilität sowie eine verminderte oder ausbleibende Ezrinbindefähigkeit zur Folge hat.

4.3 Ezrinbindungsstudien an festkörperunterstützten Lipidmembranen

- Reflektometrische interferenzspektroskopische Studien wurden von Lars Kahmann im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt.

Die Bindung der Proteine Ezrin wt, Ezrin T567D und Ezrin T567A wurden mit Hilfe der reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) an festkörperunterstützten Lipidmembranen (SLBs) untersucht. Die verwendeten Lipidmembranen bestanden aus DOPC/DOGS-Ni-NTA (92:8) oder POPC/PIP₂(92:8). In vorangegangenen Studien an SLBs konnte gezeigt werden, dass bei einem Anteil von 8 mol% Rezeptorlipid eine maximale Oberflächenbelegung mit Ezrin möglich ist.³⁰ Darüber hinaus konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand der Etablierung eines neuartigen Spreitprotokolls von PIP₂-haltigen Vesikeln auf Silica-Substraten gezeigt werden, dass die PIP₂-Moleküle unter Berücksichtigung der Auflösungsgrenze des Fluoreszenzmikroskops homogen in den

ausgebildeten Lipidmembranen verteilt sind und keine Domänenbildung zu beobachten war (vgl. Abs. 4.2.5).¹⁰⁰ Somit ist von besonderem Interesse, inwiefern sich die Bindungseigenschaften von Ezrin an unter Niedrig-pH-Bedingungen ausgebildeten Lipidmembranen mit literaturbekannten Ergebnissen decken.

Hierzu sollte die Adsorption der erfolgreich isolierten Ezrinproteine an DOGS-Ni-NTA- sowie PIP₂-haltigen festkörperunterstützten Membranen mittels RIfS untersucht werden. Es sollten die Bindungsaffinitäten und die maximalen optischen Schichtdickenänderungen der Proteine quantifiziert werden.

4.3.1 Proteinisolierung und -aufreinigung von Ezrin

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Proteinisolierung der rekombinanten Proteine Ezrin Wildtyp, den Ezrinmutanten T567A und T567D, sowie der N-terminalen Domäne Ezrins (N-ERMAD) aus *Escherichia coli* Bakterien durchgeführt. Der Einfluss der *in vivo*-Phosphorylierung von Ezrin wird häufig durch Punktmutationen der Aminosäuresequenz untersucht. So wird einerseits durch den Austausch von Threonin (T) gegen Aspartat (D) die Ezrinmutante T567D generiert, resultierend in einer zusätzlichen negativen Ladung, welche eine Phosphorylierung imitiert.¹⁴⁶ Andererseits stellt die Ezrinmutante T567A durch Austausch von Threonin (T) gegen Alanin (A) eine konstitutiv inaktive Form dar, denn eine Phosphorylierung von Alanin ist *in vivo* nicht möglich.¹⁸

Die Expression sowie die anschließende Aufreinigung der Proteine erfolgten wie unter Abschnitt 3.2 beschrieben. Alle Proteine wiesen einen N-terminalen His₆-Tag auf, der die affinitätschromatographische Aufreinigung ermöglichte. Während der Proteinisolierung wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben genommen, die anschließend mit Hilfe einer SDS-PAGE (vgl. Abs. 3.2.4) analysiert wurden. Untersucht wurden das Lysat (L), die proteinhaltigen Lösungen nach Durchlaufen der Säule (D), Waschschrift 1 und 2 (W1/W2) sowie einige Elutionsfraktionen (E1-E12). Um die Massen der Banden einordnen zu können, wurde als Referenz ein Marker (M), welcher Proteine mit bekannten Molmassen enthielt, verwendet. In Abbildung 4.10 sind die SDS-Gele von Ezrin T567D und N-ERMAD dargestellt. Für die Proteine Ezrin wt und Ezrin T567A wurden zu Ezrin T567D analoge SDS-Gele erhalten, welche nicht dargestellt werden.

Abbildung 4.10: Das SDS-Gel der affinitätschromatographischen Aufreinigung von Ezrin T567D und N-ERMAD. Von links nach rechts sind die Spuren wie folgt zuzuordnen: **L:** Lysat, **D:** Durchlauf, **W1/W2:** Waschschritt 1/2, **E1-E12:** Elutionsfraktionen, **M:** Marker mit bekannten Banden (Molekulargewicht in kDa). Der blaue Rahmen markiert die Hauptbande in den Elutionsfraktionen bei 81 kDa beziehungsweise 40 kDa.

Die Spuren des Lysats und des Durchlaufs weisen jeweils eine Vielzahl an Proteinbanden auf. Auffällig ist, dass die im Lysat deutliche Hauptproteinbande bei 81 kDa für Ezrin T567D beziehungsweise 40 kDa für N-ERMAD im Durchlauf nur noch schwach ausgeprägt ist. Dies weist auf eine effiziente Bindung der Zielproteine an das Säulenmaterial hin. Durch die Waschschrte 1 und 2 konnten unspezifisch gebundene Proteine sowie überschüssiges Zielprotein vom Säulenmaterial gespült werden. Die restlichen fünf Elutionsfraktionen der Ezrin T567D Aufreinigung weisen im Bereich zwischen 97 und 66 kDa eine besonders intensive Bande auf (blauer Rahmen). Diese klar dominierende Bande ist bei einem Molekulargewicht von ungefähr 81 kDa zu finden. Die theoretische Masse von Ezrin T567D sowie Ezrin wt und Ezrin T567A beträgt 69 kDa.⁵⁸ Die Lokalisierung der Proteinbande bei einer um 11 kDa erhöhten Masse ist zum einen durch den 3.8 kDa schweren N-terminalen His₆-Tag zu erklären, welcher über 30 zusätzliche Aminosäuren mit dem Protein verknüpft ist.³⁰ Hauptsächlich wird die scheinbar hohe Molmasse der Ezrinkonstrukte aber deshalb beobachtet, weil die Wanderungsgeschwindigkeit dieser Proteine im Polyacrylamidgel überproportional niedrig ist. Dieses Artefakt wurde bereits mehrfach beschrieben und wird durch die hohe Eigenladung der Proteine mit 35%, sowie durch das Vorhandensein einer C-terminalen Heptaprolinsequenz im α -helikalen Teil erklärt.^{58,147} Prolin ist für den negativen Einfluss auf die elektrophoretische Mobilität bekannt.¹⁴⁸ Die Abnahme der Intensität der Hauptbanden von Fraktion E1 zu E12 lässt sich durch die immer niedriger werdende Konzentration des Proteins im Verlauf der Elution erklären.

Neben den Hauptbanden treten noch einige niedermolekulare Banden auf, welche

His₆-Tag-tragenden Proteinverunreinigungen zuzuordnen sind. Diese Verunreinigungen sind literaturbekannt und deren Entfernung ist bisher nicht gelungen. So konnte mittels Ionenaustauschchromatographie keine vollständige Abtrennung der Verunreinigungen erreicht werden.¹⁴⁹

Im Vergleich hierzu findet sich im SDS-Gel der Aufreinigung von N-ERMAD die Hauptbande des Zielprotein bei 40 kDa. Diese liegt nur etwas über dem erwarteten Molekulargewicht von 35 kDa.⁵⁸ Hieraus lässt sich schließen, dass hauptsächlich der N-terminale His₆-Tag zu einer Erhöhung des Molekulargewichts führt. Darüber hinaus weist auch N-ERMAD eine hohe Eigenladung auf (27%), welche die elektrophoretische Mobilität herabsetzt.

Des Weiteren finden sich im Gegensatz zu dem Ezrin T567D SDS-Gel kaum niedermolekulare Verunreinigungen in den Elutionsfraktionen N-ERMADs.

Abschließend lässt sich festhalten, dass sich die detektierten Hauptproteinbanden in allen SDS-Gelen durch eine hohe Intensität auszeichnen. Im Fall von Ezrin kann von einer ungefähr 90%igen Reinheit ausgegangen werden, welche für N-ERMAD noch höher liegt. Insgesamt konnten für die Proteine Ezrin wt/T567D/T567A Ausbeuten von ungefähr 8 mg pro 250 mL Hauptkultur erzielt werden und für das Protein N-ERMAD lag die Ausbeute im Bereich von 4 mg pro 250 mL Hauptkultur. Somit war die Reinheit und Ausbeute der isolierten Proteine ausreichend für die nachfolgenden Messungen.

4.3.2 Charakterisierung der Ezrinbindung an festkörperunterstützte Lipidmembranen

Die Adsorption von Ezrin an DOGS-Ni-NTA- sowie PIP₂-haltige (8 mol%) festkörperunterstützten Membranen wurde mittels RIfS untersucht. Aus den Ergebnissen wurde die maximale optische Schichtdicke bei vollständiger Sättigung des Systems quantifiziert. In Abbildung 4.11 sind repräsentativ zwei RIfS-Messungen der Bindung einerseits von Ezrin wt an eine DOGS-Ni-NTA-haltige SLB (4.11A) und andererseits von Ezrin T567D an eine PIP₂-haltige SLB (4.11B), unter sukzessiver Erhöhung der Proteinkonzentration, gezeigt.

Abbildung 4.11: Zeitaufgelöste Änderung der optischen Schichtdicke OT einer festkörperunterstützten Lipidmembran bei schrittweiser Erhöhung der Ezrinkonzentration, detektiert mittels RfS. **A:** Bindung von Ezrin wt an eine DOPC/DOGS-Ni-NTA (92:8) Lipidmembran. Nach Spülen mit Ca^{2+} -Puffer erfolgte die Zugabe und das Spreiten der Vesikel (a) bestehend aus DOPC/DOGS-Ni-NTA (92:8), anschließendes Spülen mit E1-Puffer (ohne EDTA, b), Zugaben von Ezrin wt ($c = 10 \text{ nM}$, c; $c = 70 \text{ nM}$, d; $c = 160 \text{ nM}$, e; $c = 280 \text{ nM}$, f) und abschließendes Spülen mit Imidazol-haltigem E1-Puffer (ohne EDTA, 250 mM Imidazol, g). **B:** Bindung von Ezrin T567D an eine POPC/PIP₂ (92:8) Lipidmembran. Nach Spülen mit Niedrig-pH-Puffer (pH = 4.8) erfolgte die Zugabe und das Spreiten der Vesikel (a) bestehend aus POPC/PIP₂ (92:8), anschließendes Spülen mit E1-Puffer (pH = 7.4, b), Zugaben von Ezrin T567D ($c = 50 \text{ nM}$, c; $c = 100 \text{ nM}$, d; $c = 700 \text{ nM}$, e) und abschließendes Spülen mit E1-Puffer (f).

Bei der Bindung von Ezrin an eine DOPC/DOGS-Ni-NTA (92:8)-Lipidmembran (vgl. Abb. 4.11A) wird das Protein durch Wechselwirkungen des N-terminalen His₆-Tags mit DOGS-Ni-NTA an der Lipidmembran immobilisiert. Aus diesem Grund fehlt der Einfluss auf die Aktivierung von Ezrin durch eine Bindung an PIP₂ hier vollständig. Der Spreitprozess (a) fand in einem Puffer statt, dem Calciumionen hinzugefügt waren, um die Lipidmembranausbildung zu erleichtern (Ca^{2+} -Puffer: 2 mM CaCl_2 , 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0.1 mM NaN_3 , pH 7.4). Calciumionen vermitteln den Kontakt zwischen Vesikeln und SiO₂-Siliciumwafer durch elektrostatische Wechselwirkungen, beeinträchtigen die Bindung der Proteine über ihren His₆-Tag an die Lipidmembran jedoch nicht (vgl. Abs. 4.2).^{125,135} Dies führte zu einem Anstieg der ΔOT um 6.2 nm.

Der anschließende Spülvorgang (b) wurde mit E1-Puffer ohne EDTA (E1-_{EDTA}-Puffer: 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0.1 mM NaN_3 , pH 7.4) durchgeführt, um den Ni-NTA-Komplex nicht durch den Entzug von Ni^{2+} zu zerstören und somit eine Bindung des Proteins zu verhindern. Hierdurch konnte ein leichter Abfall der ΔOT auf 6.0 nm detektiert werden.

Die sukzessive Erhöhung der Proteinkonzentration im System (c-f) führte zu einem

schrittweisen Anstieg der optischen Schichtdickenänderung ΔOT auf bis zu 5.5 nm. Abschließend wurde mit Imidazol-haltigem E1-Puffer gespült, welcher den His₆-Tag Ezrins aus dem Ni-NTA-Komplex des Rezeptorlipids verdrängt und das Protein desorbiert fast vollständig von der SLB. Insgesamt wurden aus je vier Ezrin T567A und Ezrin T567D beziehungsweise sechs Ezrin wt Messungen für jedes Protein 14-22 Messpunkte erhalten, die als Grundlage der folgenden Isothermen dienten.

In analoger Weise wurden die Messungen an POPC/PIP₂ (92:8)-Lipidmembranen durchgeführt, der Spreitvorgang der Vesikel wurde allerdings unter Niedrig-pH-Bedingungen (Citrat-Puffer: 20 mM Citrat, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM NaN₃, pH 4.8) durchgeführt und anschließend mit E1-Puffer (20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM NaN₃, pH 7.4) gespült. Es erfolgten drei bis vier Zugaben von Ezrin in E1-Puffer pro Messung und abschließend wurde wiederum mit E1-Puffer gespült. Insgesamt wurden vier Ezrin T567A, sechs Ezrin T567D und acht Ezrin wt Messungen pro Isotherme durchgeführt, welche pro Protein 14-21 Datenpunkte ergaben.

Die maximale Oberflächenbelegung der Lipidmembran mit Protein ist erreicht, wenn weitere Konzentrationserhöhungen keine Auswirkungen mehr auf die optische Schichtdicke haben. Dieser Zusammenhang zwischen Konzentration und optischer Schichtdickenänderung wurde nach Durchführung von 4-8 Messungen in einer Adsorptionsisotherme zusammengefasst (vgl. Abb. 4.12). Hieraus ist durch Anpassung einer LANGMUIR-Funktion die Bestimmung von Bindungsparametern möglich. Die gemessenen Änderungen der optischen Schichtdicke werden durch reversibel und irreversibel gebundenes Protein hervorgerufen. Wäre die Bindung zwischen Ezrin und den zwei Rezeptorlipiden vollständig reversibel, so würde das Spülen mit Puffer einen Abfall des ΔOT -Signals auf Lipidmembranniveau induzieren. Dies konnte nicht detektiert werden und die größtenteils irreversible Proteinbindung ist in Abbildung 4.11Bf dargestellt. Abbildung 4.11Ag hingegen zeigt eine fast vollständig reversible Bindung durch Spülen mit einem Imidazol-haltigen Puffer. Imidazol verdrängt den His-6-Tag und somit Ezrin kompetitiv, aufgrund der hohen Konzentration, aus dem Ni-NTA-Komplex des Rezeptorlipids. Insgesamt beträgt die Irreversibilität der Bindung zwischen DOGS-Ni-NTA und Ezrin ungefähr 95% (es wurde nur hauptsächlich mit imidazolfreiem, EDTA-freiem E1 Puffer gespült) und die zwischen PIP₂ und Ezrin ungefähr 83%.

Zur Auswertung der Bindungsstudien wurde das Adsorptionsmodell nach LANGMUIR angewendet. Die zugrunde liegende Theorie beschreibt Grenzflächenreaktionen, bei de-

nen ein eingestelltes, dynamisches Gleichgewicht aus Adsorption und Desorption eines Stoffes von Temperatur und Konzentration abhängig ist.¹⁵⁰

Um anhand von RIfS-Messungen eine LANGMUIR-Isotherme zu erstellen, wird die Proteinkonzentration an einer festkörperunterstützten Lipidmembran schrittweise erhöht, welches Änderungen der optischen Schichtdicke zur Folge hat. Unter der Annahme, dass sich Änderungen der optischen Schichtdicke und Oberflächenbelegung proportional verhalten, lässt sich nach Gleichung 4.1 eine Auftragung von ΔOT gegen die Konzentration c erstellen.

$$\Delta OT(c) = \frac{\Delta OT_{\max} \cdot K_A \cdot c_L}{1 + K_A \cdot c} \quad (4.1)$$

Mit Hilfe einer nicht-linearen Anpassung von Gleichung 4.1 an die Datenpunkte (vgl. Abb. 4.12) können die Parameter Assoziationskonstante K_A und maximale optische Schichtdickenänderung $\Delta OT_{\max}$ ermittelt werden (vgl. Tab. 4.2).

Abbildung 4.12: Adsorptionsisothermen der Bindung von Ezrin wt (graue Quadrate), Ezrin T567D (rote Rauten) und Ezrin T567A (blaue Kreise) an eine festkörperunterstützte DOGS-Ni-NTA- (92:8, **A**)- beziehungsweise POPC/PIP₂ (92:8, **B**)-Lipidmembran. Die Kurven sind die Ergebnisse der nicht-linearen Anpassungen einer LANGMUIR(LM)-Adsorptionsisotherme an die Datenpunkte.

Die Anpassung der LANGMUIR-Funktion an die detektierten, konzentrationsabhängigen ΔOT -Werte ergab folgende Werte für $\Delta OT_{\max}$ sowie Dissoziationskonstante K_D und sind

4 Charakterisierung der Bindung von Ezrin an festkörperunterstützten Lipidmembranen

in Tabelle 4.2 aufgelistet. Die Dissoziationskonstante K_D lässt sich aus der Assoziationskonstante nach $K_D = 1/K_A$ berechnen.

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der Ergebnisse der Adsorptionsisothermen nach Anpassung der LANGMUIR-Funktion. Aufgelistet sind die maximalen optischen Schichtdickenänderungen $\Delta OT_{\max}$ und die Dissoziationskonstante K_D mit den aus der Anpassung resultierenden Fehlern für Ezrin wt, Ezrin T567D und Ezrin T567A an POPC/PIP₂- und DOPC/DOGS-Ni-NTA-haltigen Lipidmembranen.

Rezeptorlipid	Protein	$\Delta OT_{\max}$ [nm]	K_D [nM]	Messungen
DOGS-Ni-NTA	Ezrin wt	8.5 ± 0.6	168 ± 36	6
DOGS-Ni-NTA	Ezrin T567D	7.9 ± 0.5	70 ± 17	4
DOGS-Ni-NTA	Ezrin T567A	7.7 ± 0.6	42 ± 13	4
PIP ₂	Ezrin wt	6.5 ± 0.3	71 ± 11	8
PIP ₂	Ezrin T567D	8.5 ± 0.3	37 ± 6	6
PIP ₂	Ezrin T567A	7.1 ± 0.5	62 ± 18	4

Zu besseren Vergleichbarkeit sind diese Werte zusätzlich in einem Säulendiagramm dargestellt (vgl. Abb. 4.13).

Abbildung 4.13: Vergleich der ermittelten maximalen optischen Schichtdickenänderungen nach Bindung von Ezrin wt (grau), Ezrin T567D (rot) oder Ezrin T567A (blau) an festkörperunterstützte Lipidmembranen bestehend aus DOPC/DOGS-Ni-NTA (quergestreift) oder POPC/PIP₂ (längsgestreift) (92:8) nach Anpassung einer LANGMUIR-Funktion.

Die Isothermen der Bindung von Ezrin an DOPC/DOGS-Ni-NTA (92:8) Membranen sind in Abbildung 4.12A gezeigt. Die verschiedenen Ezrinproteine zeigen kaum Unterschiede in der maximalen Schichtdickenänderung und liegen im Bereich von 8 nm.

Die Steigungen im Bereich der niedrigen Konzentrationen zeigen eine Abweichung im Fall der Isotherme des Proteinwildtyps mit einer flacheren Steigung im Vergleich zu Ezrin T567D und Ezrin T567A. Aus der LANGMUIR-Anpassung wurden Werte für die Dissoziationskonstante von $K_D = 168 \text{ nM}$ für Ezrin wt, $K_D = 70 \text{ nM}$ für Ezrin T567D und $K_D = 42 \text{ nM}$ für die T567A-Ezrinmutante bestimmt. Diese Werte weisen deutliche Unterschiede auf, obwohl die Bindung der Proteine jeweils über den His₆-Tag stattfand, weichen gerade die Dissoziationskonstanten für Ezrin wt und Ezrin T567A deutlich voneinander ab.

Bei der Bindung von Ezrin an PIP₂-haltige Lipidmembranen sind die Werte für Ezrin wt und Ezrin T567A mit $71 \pm 11 \text{ nM}$ beziehungsweise $62 \pm 18 \text{ nM}$ für die Dissoziationskonstante und $6.5 \pm 0.3 \text{ nm}$ beziehungsweise $7.1 \pm 0.5 \text{ nm}$ für die ΔOT_{max} ähnlich. Bei diesen Varianten des Ezrins handelt es sich um den nicht-phosphorylierten Wildtyp und die unphosphorylierbare Mutante T567A. Aus diesem Grund werden auch ähnliche Bindungseigenschaften an PIP₂ erwartet. Die Isotherme der pseudophosphorylierten Ezrinmutante T567D hingegen zeigt eine größere Steigung im Anfangsbereich und eine höhere Schichtdicke bei maximaler Belegung (ungefähr 8 nm). Auch der K_D -Wert ist mit 37 nM halb so groß im Vergleich zu denen von Ezrin wt und Ezrin T567A. Eine kleinere Dissoziationskonstante bedeutet eine höhere Bindungsaffinität und somit eine stabilere Bindung des Proteins an das Rezeptorlipid PIP₂ der Membran. Dies könnte einen möglichen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Affinität der PIP₂-Ezrinbindung als Folge der gleichzeitig vorliegenden aktivierenden Einflüsse: (Pseudo-)Phosphorylierung und PIP₂-Bindung aufzeigen.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die ermittelten Dissoziationskonstanten für die Bindung von Ezrin an DOGS-Ni-NTA- beziehungsweise PIP₂-haltige SLBs in ähnlicher Größenordnung liegen. Die Bindungen zeichnen sich durch eine hohe Affinität aus. Einzig der vergleichsweise niedrige K_D -Wert für die Bindung von Ezrin T567D an PIP₂ könnte einen Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Bindungsaffinität des Proteins bei vollständiger Aktivierung durch (Pseudo-)Phosphorylierung und PIP₂-Bindung darstellen.

4.4 Charakterisierung der Organisation von Ezrin an festkörperunterstützten Lipidmembranen

- Teile dieses Kapitels wurden publiziert: Victoria Shabardina und Corinna Kramer, Benjamin Gerdes, Julia A. Braunger, Andrea M. Cordes, Jonas Schäfer, Ingo P. Mey, David Grill, Volker Gerke, Claudia Steinem, Mode of ezrin-membrane interaction as a function of PIP₂ binding and pseudophosphorylation, *Biophysical Journal* **2016**, akzeptiert.
- Teile der reflektometrischen interferenzspektroskopischen Studien wurden von Jonas Schäfer im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt.
- ATR-IR- und CD-spektroskopische Studien wurden größtenteils von Oliver Gräß im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt.
- Rasterkraftmikroskopische Studien wurden von Benjamin Gerdes, Andrea M. Cordes und Jonas Schäfer durchgeführt.

Aufbauend auf den vorangegangenen Studien dieser Arbeit konnte nach Charakterisierung der Ausbildung PIP₂-haltiger festkörperunterstützter Lipidmembranen und bei Kenntnis der Bindungseigenschaften von Ezrin an SLBs in diesem Abschnitt die Fragestellung adressiert werden, inwiefern mögliche unterschiedliche Konformationen des Proteins Ezrin unter Berücksichtigung der zwei aktivierenden Faktoren (Pseudo-)Phosphorylierung und PIP₂-Bindung an festkörperunterstützten Lipidmembranen untersucht und detektiert werden können.

In diesen Bindungsstudien wurden größtenteils die Proteine Ezrin wt und Ezrin T567D untersucht, da diese bei Kopplung an DOGS-Ni-NTA beziehungsweise PIP₂ alle Aktivierungsstufen von inaktiviert (Ezrin wt/DOGS-Ni-NTA) über teilaktiviert (Ezrin wt/PIP₂ bzw. Ezrin T567D/DOGS-Ni-NTA) zu vollaktiviert (Ezrin T567D/PIP₂) repräsentieren. Einerseits sollten mögliche Unterschiede der Proteinschichtdicke/-höhe bei Bindung an SLBs mittels reflektometrischer Interferenzspektroskopie und Rasterkraftmikroskopie untersucht werden. Hierzu liegt die Erwartung unterschiedlicher Proteinausdehnungen bei verschiedenen vorliegenden Konformationen des Proteins zugrunde. Andererseits sollte eine Sekundärstrukturanalyse mittel ATR-FTIR- und CD-Spektroskopie durchgeführt werden, um mögliche aktivierungsbedingte Änderungen in der Konformation anhand einer Sekundärstrukturänderung detektieren zu können.

Des Weiteren sollte im Rahmen einer Kooperation die FRET (FÖRSTER Resonanzenergietransfer)-Effizienz von Cy@3/eGFP (engl. *enhanced green fluorescent protein*)-Ezrinkonstrukten in Abhängigkeit der aktivierenden Faktoren ausgewertet werden und Aufschluss über mögliche Konformationsunterschiede geben.

4.4.1 Detektion der Proteinschichtdicke von Ezrin in Abhängigkeit aktivierender Faktoren

Unter Berücksichtigung der ähnlichen Ergebnisse der mittels RIfS detektierten maximalen optischen Schichtdickenänderung bei Ezrinbindung an DOGS-Ni-NTA- beziehungsweise PIP₂-haltige SLBs mit einem Rezeptorlipidgehalt von 8 mol% (vgl. Abs. 4.3.2), wurde in diesem Abschnitt der Arbeit ein erniedrigter Rezeptorlipidgehalt von 2 mol% und 4 mol% gewählt. Dieser sollte gewährleisten, dass keine maximale Oberflächenbelegung mit Protein vorliegt und somit mögliche Unterschiede in der optischen Schichtdickenänderung auf Grundlage veränderter Oberflächenbelegung und/oder Proteinschichtdicke detektiert werden können. Des Weiteren ist eine Lipidmembranausbildung bei niedrigem PIP₂-Gehalt (≤ 4 mol%) im E1-Puffer möglich (vgl. Abs. 4.2). Die Ausbildung DOGS-Ni-NTA-haltiger SLBs hingegen erfolgte in Gegenwart von 2 mM Ca²⁺ und in Abwesenheit von EDTA. Exemplarisch sind in Abbildung 4.14 zwei mittels RIfS detektierte Lipidmembranausbildungen dargestellt.

Abbildung 4.14: Zeitaufgelöste Änderung der optischen Schichtdicke OT eines hydrophilisierten SiO₂-Siliciumwafers nach Spreiten von Vesikeln, detektiert mittels RIfS. **A:** Lipidmembranausbildung von DOPC/DOGS-Ni-NTA (96:4) Vesikeln in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen. Nach Spülen mit Ca²⁺-Puffer ($c = 2$ mM) erfolgte die Zugabe und das Spreiten der Vesikel (**a**), anschließend wurde mit EDTA-freiem E1-Puffer gespült (**b**). **B:** Lipidmembranausbildung von POPC/PIP₂ (96:4) Vesikeln. Nach Spülen mit E1-Puffer erfolgte die Zugabe und das Spreiten der Vesikel (**a**), anschließend wurde mit E1-Puffer gespült (**b**).

Die Kinetiken der Lipidmembranausbildungen unterscheiden sich deutlich voneinander. Während DOGS-Ni-NTA-haltige Vesikel innerhalb einer Minute eine Lipidmembran in Gegenwart von Calciumionen ausbilden (vgl. Abb. 4.14A), beträgt die Dauer dieses Vorgangs im Fall der PIP₂-haltigen Vesikel ungefähr 60 Minuten (vgl. Abb. 4.14B). Dieser Unterschied in der Kinetik ist auf die Abwesenheit eines "Spreitmediators" zurückzuführen. Somit benötigt die Ausbildung der PIP₂-haltigen Lipidmembran aufgrund repulsiver Wechselwirkungen zwischen Vesikeln und Substrat deutlich länger (vgl. Abs. 4.2).

Das Spreiten von DOPC/DOGS-Ni-NTA (96:4) SUVs resultiert im Mittel in einer Änderung der optischen Schichtdicke (ΔOT) von 6.2 ± 0.6 nm ($n = 9$). Dementsprechend führt das Spreiten DOPC/DOGS-Ni-NTA (98:2) Vesikel zu einer (ΔOT) von 6.3 ± 0.2 nm ($n = 17$). Ähnlich hierzu resultiert das Spreiten von POPC/PIP₂ SUVs in einer optischen Schichtdickenänderung von 6.3 ± 0.6 nm (4 mol% PIP₂, $n = 11$) und 6.4 ± 0.5 nm (2 mol% PIP₂, $n = 22$).

Hieraus ergeben sich unter Berücksichtigung des Brechungsindex einer DOPC- beziehungsweise POPC-Lipidmembran mit $n_{\text{DOPC}(\text{Ca}^{2+})-\text{SLB}} = 1.47$ oder $n_{\text{POPC}-\text{SLB}} = 1.48$ gleiche physikalische Schichtdicken d von 4.3 nm für DOPC/DOGS-Ni-NTA SLBs und 4.3 nm für POPC/PIP₂ SLBs.¹⁴¹ Die Werte liegen in ähnlicher Größenordnung zu den literaturbekannten physikalischen Schichtdicken einer reinen DOPC- ($d = 4.1$ nm) beziehungsweise POPC-Lipidmembran ($d = 3.98 \pm 0.08$ nm) und sprechen für planare, kontinuierliche Lipidmembranen.^{142, 151}

Zu diesen Lipidmembranen wurde anschließend das Protein Ezrin wt oder Ezrin T567D ($c = 0.8$ μM) gegeben und wiederum die Änderung der optischen Schichtdicke detektiert. Hierzu sind repräsentativ vier Proteinbindungskurven an DOPC/DOGS-Ni-NTA beziehungsweise POPC/PIP₂ Lipidmembranen mit einem Rezeptorlipidgehalt von 4 mol% in Abbildung 4.15 gegenübergestellt.

Abbildung 4.15: Zeitaufgelöste Änderung der optischen Schichtdicke OT durch Adsorption des Proteins Ezrin an eine SLB, detektiert mittels RIfS. **A:** Bindung von Ezrin wt (1) beziehungsweise Ezrin T567D (2) an eine DOPC/DOGS-Ni-NTA (96:4) Lipidmembran. Nach Spülen mit EDTA-freiem E1-Puffer erfolgte die Zugabe des Proteins ($c = 0.8 \mu\text{M}$, **a**) anschließend wurde mit EDTA-freiem E1-Puffer gespült (**b**). **B:** Bindung von Ezrin wt (1) bzw. Ezrin T567D (2) an eine DOPC/DOGS-Ni-NTA (96:4) Lipidmembran. Nach Spülen mit EDTA-freiem E1-Puffer erfolgte die Zugabe des Proteins ($c = 0.8 \mu\text{M}$, **a**) anschließend wurde wiederum mit EDTA-freiem E1-Puffer gespült (**b**).

Die Bindung der zwei Proteine an beide Rezeptorlipide führte zu einem signifikanten Anstieg der optischen Schichtdickenänderung. Das anschließende Spülen mit Puffer resultierte in einem leichten Abfall der ΔOT und spricht für eine geringfügige Desorption des Proteins. Die Bindung von Ezrin an DOGS-Ni-NTA und PIP_2 ist größtenteils irreversibel. Dieses Eigenschaft von Ezrin ist durch Wechselwirkungen nicht nur zum Rezeptorlipid selbst, sondern durch laterale Protein/Protein-Interaktionen zu erklären. Hierauf wird in der Diskussion (vgl. Abs. 4.5.2) detaillierter eingegangen.

In Abwesenheit eines Rezeptorlipids wurde keine Ezrinbindung beobachtet. Dies ist beispielhaft in Abbildung 4.16 dargestellt.

Abbildung 4.16: Zeitaufgelöste Änderung der optischen Schichtdicke ΔOT eines hydrophilisierten Siliciumwafers funktionalisiert mit einer reinen POPC-Lipidmembran. Blindexperiment mit Ezrin T567D **a:** Vesikelzugabe (POPC 100 mol%), **b:** Spülen mit E1-Puffer, **c:** Ezrin T567D-Zugabe ($c = 570$ nm), **d:** Spülen mit E1-Puffer. Die Zugabe von Ezrin T567D führte zu keinem Anstieg der optischen Schichtdicke, demnach bindet Ezrin nicht unspezifisch an POPC.

In dem Blindexperiment zeigte sich, dass nach Ausbildung der POPC-Lipidmembran kein weiterer Anstieg der ΔOT durch Zugabe von Ezrin T567D zu beobachten war. Somit lässt sich eine unspezifische Wechselwirkung zwischen Matrixlipid und Ezrin ausschließen. Die Ergebnisse der mittels RIfS detektierten Änderungen der optischen Schichtdicke nach Bindung von Ezrin wt beziehungsweise Ezrin T567D an DOPC/DOGS-Ni-NTA und POPC/PIP₂ Lipidmembranen mit 2 mol% oder 4 mol% Rezeptorlipidgehalt sind in Abbildung 4.17 zusammengestellt.

Abbildung 4.17: Vergleich der mittels RIfS detektierten optischen Schichtdickenänderungen (ΔOT) nach Bindung von Ezrin wt (grau) und Ezrin T567D (rot) an festkörperunterstützte Lipidmembranen bestehend aus DOPC/DOGS-Ni-NTA (quergestreift) oder POPC/PIP₂ (längsgestreift) mit einem Rezeptorlipidgehalt von 2 mol% beziehungsweise 4 mol%. Ein statistischer *Student's t*-Test ergab für die Bindung der Proteine an DOGS-Ni-NTA nicht-signifikante Unterschiede (ns) und an PIP₂ signifikante Unterschiede in der ΔOT mit $*p=0.04$ und $**p=0.01$.

Die mittels reflektometrischer Interferenzspektroskopie detektierte optische Schichtdickenänderung durch Proteinbindung beinhaltet zwei Faktoren, welche diese beeinflussen: die tatsächliche Proteinhöhe und die Oberflächenbelegung an Protein.

An DOGS-Ni-NTA führt die Bindung von Ezrin wt sowie Ezrin T567D zu nahezu identischen Änderungen der optischen Schichtdicke. Hierin unterscheidet sich die Bindung der Proteine an PIP₂. Diese führt sowohl an 2 mol% als auch an 4 mol% Rezeptorlipid zu einer signifikant geringeren ΔOT für die Bindung von Ezrin T567D ($\Delta OT = 0.5 \pm 0.2$ nm bzw. 1.2 ± 0.4 nm) im Vergleich zu Ezrin wt ($\Delta OT = 1.2 \pm 0.6$ nm bzw. 2.7 ± 0.9 nm). Anhand eines *Student's t*-Tests wurde die Signifikanz analysiert und belegt.

Sowohl die signifikanten ΔOT -Unterschiede bei der Bindung der Proteine an PIP₂ als auch die Unterschiede im Gesamtsignal bezüglich der DOGS-Ni-NTA- im Vergleich zu den PIP₂-Ergebnissen, können in Unterschieden der Oberflächenbelegungsichte an Protein (aufgrund der unterschiedlichen Immobilisierungsstrategien) und/oder der absoluten Proteinhöhe (aufgrund einer veränderten Konformation) begründet sein. Diese zwei Faktoren lassen sich mittels RIfS nicht direkt voneinander trennen und machen weiterführende Untersuchungen notwendig.

Somit wurde im nächsten Schritt eine rasterkraftmikroskopische Charakterisierung der Bindung von Ezrin wt und Ezrin T567D an SLBs angeschlossen. Hierdurch wird eine direkte Bestimmung der Proteinhöhe an festkörperunterstützten Lipidmembranen ohne die Beeinflussung der Oberflächenbelegung möglich.

4.4.2 Rasterkraftmikroskopische Höhenanalyse von Ezrin in Abhängigkeit aktivierender Faktoren

Zur rasterkraftmikroskopischen Charakterisierung der Ezrinbindung wurden festkörperunterstützte Lipidmembranen präpariert, welche zum größten Teil aus dem Gelphasenlipid DPPC bestanden. Im Gegensatz zu POPC ($T_m = -2^\circ\text{C}$) liegt DPPC bei Raumtemperatur, mit einer Hauptphasenumwandlungstemperatur T_m von 41°C , in der Gelphase vor. Die Ausbildung rigiderer Gelphasen-Lipidmembranen sollte eine AFM-Abbildung der gebundenen Proteine gegenüber fluiden Lipidmembransystemen erleichtern (vgl. Abs. 3.3.1). Des Weiteren enthielten die Lipidmembranen 3 mol% Rezeptorlipid. Der geringe Rezeptorlipidgehalt sollte eine reduzierte Oberflächenbelegung gewährleisten, bei welcher eine klare Unterscheidung zwischen Protein-belegten und nicht belegten Bereichen der SLB möglich ist.

Nach Ausbildung der festkörperunterstützten Lipidmembranen wurden diese zunächst fluoreszenzmikroskopisch auf Planarität und Kontinuität untersucht.

Abbildung 4.18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen festkörperunterstützter DPPC-Lipidmembranen. Beide Lipidmembranen weisen neben einer homogenen, roten Lipidmembranfluoreszenz viele Defekte (schwarz), typisch für Gelphasen-SLBs, auf. **A:** DPPC/DOGS-Ni-NTA/BODIPY®-C₁₂-HPC (96.5:3:0.5)*, gespreitet in Ca²⁺-Puffer. **B:** DPPC/PIP₂/TxR (96.8:3:0.2), gespreitet unter Niedrig-pH-Bedingungen. *zur besseren Übersicht in rot dargestellt

In Abbildung 4.18 sind exemplarisch zwei Aufnahmen einer DPPC-SLB mit einem Rezeptorlipidgehalt von 3 mol% DOGS-Ni-NTA und PIP₂ auf hydrophilisierten SiO₂-Siliciumwafern dargestellt. Aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wird anhand der homogenen, roten Lipidmembranfluoreszenz ersichtlich, dass auf den Substraten planare Lipidmembranen ausgebildet wurden. Typischerweise zeichnen sich die DPPC-Gelphasen-Lipidmembranen durch eine hohe Zahl an Defekten (schwarze Bereiche) aus. Im Gegensatz zu fluiden Lipidmembransystemen, welche sich auf hydrophilen Oberflächen durch "Selbstheilungseigenschaften" auszeichnen, bleiben gebildete Defekte innerhalb der Gelphasen-SLB bestehen.¹⁵² Dies lässt sich auf die stark verminderte Diffusionskonstante der Lipide innerhalb der SLB ($D = 2 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $T = 22^\circ\text{C}$)¹⁵³ zurückführen und ermöglicht es in AFM-Aufnahmen die Lipidmembrandicke anhand der Defekttiefe zu bestimmen.

Um eine mögliche Phasenseparation zu visualisieren, wurde für PIP₂ die Verteilung innerhalb einer DPPC-Gelphasen-SLB untersucht. Hierzu wurde das Derivat BODIPY®TMR-PIP₂ als Fluoreszenzmarker eingesetzt, welches eine homogene Fluoreszenz innerhalb der DPPC-SLB aufwies.¹⁵⁴ Im Rahmen der Auflösungsgrenze des Fluoreszenzmikroskops kann davon ausgegangen werden, dass sowohl PIP₂ als auch DOGS-Ni-NTA in DPPC-SLBs homogen verteilt vorliegen.

Rasterkraftmikroskopische topographische Aufnahmen der DPPC-Lipidmembranen zeigen vor der Inkubation mit Protein planare Lipidmembranen (vgl. Abb. 4.19). Neben vielen submikrometergroßen Defekten (braun/schwarz) konnte eine planare DPPC-SLB (goldgelb) unabhängig vom Rezeptorlipid abgebildet werden. Die Planarität spiegelt sich auch in der bestimmten, niedrigen Rauigkeit R_q der DPPC-Lipidmembranen von 150-200 pm wider und liegt hiermit in ähnlicher Größenordnung wie die von JURAK *et al.* bestimmte Rauigkeit mit $R_q = 103$ pm von DPPC-SLBs auf Silicasubstraten.^{154, 155}

Abbildung 4.19: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen (*Tapping Mode*) einer DPPC-Lipidmembran (goldgelb) mit einem Rezeptorlipidgehalt von 3 mol% auf hydrophilisierten SiO₂-Siliciumwafern (1) und dem markierten (blauer Balken), dazugehörigen Höhenprofil eines Defekts (braun/schwarz) in der SLB (2). Die Defekte weisen eine Tiefe von 4.8 nm und 5.6 nm auf. Dies entspricht der Schichtdicke der Lipidmembran. **A:** Lipidmembran bestehend aus DPPC/DOGS-Ni-NTA/BODIPY®-C₁₂-HPC (96.5:3:0.5). **B:** Lipidmembran bestehend aus DPPC/PIP₂/TxR (96.8:3:0.2). Maßstabsbalken: 2 µm.

Die Defekttiefen liegen insgesamt sowohl für DOGS-Ni-NTA- als auch für PIP₂-haltige Gelphasen-SLBs im Bereich von 5-6 nm. Dies korreliert direkt mit der DPPC-Lipidmembrandicke und stimmt mit literaturbekannten Werten für DPPC-SLBs überein, welche von 5.2 nm bis 5.9 nm reichen.^{156–158}

Die Durchmesser der Lipidmembrandefekte, welche einige hundert Nanometer betragen, korrelieren in der Größe mit den schwarzen Bereichen der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der DPPC-SLBs. Hierdurch wird bestätigt, dass es sich bei den nicht-

fluoreszierenden Bereichen um Lipidmembrandefekte handelt.

Nach erfolgreicher Präparation und Charakterisierung der festkörperunterstützten DPPC/DOGS-Ni-NTA/BODIPY®-C₁₂-HPC- beziehungsweise DPPC/PIP₂/TxR-Lipidmembranen sollten die Proteinhöhen von Ezrin wt und Ezrin T567D mit Hilfe von rasterkraftmikroskopischen Abbildungen untersucht werden. Um einen Zusammenhang zwischen Proteinhöhe und Aktivierungszustand herstellen zu können, sollte analog zu den RfS-Experimenten die Bindung von Ezrin wt und der pseudo-phosphorylierten Ezrinmutante T567D zum einen auf DOGS-Ni-NTA-haltigen SLBs und zum anderen auf PIP₂-haltigen SLBs untersucht werden. Somit reichte der Aktivierungsgrad des Proteins von vollaktiviert (Ezrin T567D/PIP₂) über teilaktiviert (Ezrin wt/PIP₂; Ezrin T567D/DOGS-Ni-NTA) bis hin zu inaktiviert (Ezrin wt/DOGS-Ni-NTA).

In Abbildung 4.20 ist repräsentativ jeweils eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme nach Bindung von Ezrin wt beziehungsweise Ezrin T567D an eine PIP₂-haltige DPPC-Lipidmembran dargestellt. Die netzartige Struktur, welche Ezrin auf der Lipidmembranoberfläche ausbildet, ist charakteristisch für die Bindung Ezrins an DPPC-Lipidmembranen. Anhand des Höhenprofils wird ersichtlich, dass sich die ausgebildeten Proteincluster deutlich in der Höhe unterscheiden. Ezrin wt weist mit 3.2 nm eine etwa doppelt so große Höhe im Vergleich zu Ezrin T567D (1.5 nm) gebunden an PIP₂ auf.

Bei der Höhenanalyse von AFM-Aufnahmen werden typischerweise alle detektierten Höhenwerte in einem Histogramm aufgetragen. Diese Art der Auswertung eignet sich allerdings nicht bei niedriger Oberflächenbelegung und kleinen Proteinclustern. Aus diesem Grund zeigte sich die relevante Proteinhöhe nur als Schulter im Histogramm der Höhenverteilungen. Die Auswertung der Daten erfolgte durch eine angepasste Höhenanalyse entwickelt von DR. I. MEY basierend auf MATLAB.

Abbildung 4.20: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen (*Tapping Mode*) von DPPC/PIP₂/TxR (96.8:3:0.2)-Lipidmembranen (braun) mit wenigen Defekten (schwarz) auf hydrophilisierten SiO₂-Siliciumwafern (**1**) nach Inkubation mit Ezrin (goldgelb). Die Höhenprofile der Proteincluster (**2**) entsprechen dem markierten Bereich (blauer Balken) in **1**. **A:** Lipidmembran nach Inkubation mit Ezrin wt ($c = 500$ nM). **B:** Lipidmembran nach Inkubation mit Ezrin T567D ($c = 500$ nM). Ezrin T567D weist mit einem Wert von 1.5 nm eine reduzierte Proteinhöhe im Vergleich zu Ezrin wt (3.3 nm) bei der Bindung an PIP₂ auf. Maßstabsbalken: 1 μ m.

In Abbildung 4.21 sind die zwei Methoden der Proteinhöhenanalysen schematisch gegenüber gestellt. Grundlage der angepassten Analyse der Proteinhöhen (vgl. Abb. 4.21B) ist die Festlegung der Lipidmembranoberfläche als Basislinie (1, Nulllinie). Ein gewählter minimaler Grenzwert (2) erlaubt den Ausschluss von Höhenwerten, welche durch Lipidmembrandefekte, der Lipidmembranoberfläche oder Artefakten der Datenglättung hervorgerufen werden.

Abbildung 4.21: Schematische Gegenüberstellung der Höhenanalyse von AFM-Aufnahmen. **A:** Konventionelle Höhenanalyse, welche alle detektierten Höhenwerte in einem Histogramm darstellt. Höhenunterschiede zwischen Defekten, Lipidmembran und Protein sind nicht eindeutig voneinander abgrenzbar. **B:** Angepasste Höhenanalyse, welche auf der Festlegung einer Basislinie für die Lipidmembranoberfläche und der Wahl eines minimalen Grenzwertes beruht. Hieraus resultiert eine Histogramm, welches die relevanten Proteinhöhen darstellt.¹⁵⁹

Die abschließende Erstellung einer überlagerten Darstellung (grün) der ausgewerteten Bereiche und der Original-AFM-Aufnahme (Graustufen), erlaubt eine Kontrolle der gewählten Parameter (vgl. Abb. 4.22.1). Jede AFM-Aufnahme wurde einer solchen Proteinhöhenanalyse unterzogen und resultierte in einem Histogramm der Höhenverteilungen pro Aufnahme (vgl. Abb. 4.22.2).

Abbildung 4.22: Ergebnisse aus der angepassten Höhenanalyse der unter Abbildung 4.20 dargestellten AFM-Aufnahmen. **A:** DPPC/PIP₂/TxR (96.8:3:0.2)-Lipidmembran nach Inkubation mit Ezrin wt. **B:** DPPC/PIP₂/TxR (96.8:3:0.2)-Lipidmembran nach Inkubation mit Ezrin T567D. **1:** Überlagerte Darstellung der Original-AFM-Aufnahme (Graustufen) und den erkannten, analysierten Protein-belegten Bereichen (grün). **2:** Histogramm, welches die Höhenverteilung des Proteins der analysierten AFM-Aufnahme darstellt.

Nach Auswertung aller Daten wurden die ermittelten Proteinhöhen in einem Gesamthistogramm aufgetragen und die mittlere Proteinhöhe und die Standardabweichung durch Anpassung einer logarithmischen Normalverteilung oder GAUSS-Verteilung bestimmt (vgl. Abb. 4.23).

Abbildung 4.23: Histogramme, welche die gesamten, aus der Höhenanalyse aller AFM-Aufnahmen, resultierenden Proteinhöhenwerte für Ezrin wt und Ezrin T567D an PIP₂ darstellen. **A:** Höhenverteilung aus AFM-Aufnahmen von DPPC/PIP₂/TxR (96.8:3:0.2)-Lipidmembranen nach Inkubation mit Ezrin wt. **B:** Höhenverteilung aus AFM-Aufnahmen von DPPC/PIP₂/TxR (96.8:3:0.2)-Lipidmembranen nach Inkubation mit Ezrin T567D. Aus der Anpassung einer logarithmischen Normalverteilung an die Daten resultiert der mittlere Wert für die Proteinhöhe mit Standardabweichung.

Neben der Immobilisierung der Proteine an PIP₂ wurden diese auch über DOGS-Ni-NTA an Lipidmembranen gebunden und die Proteinhöhen rasterkraftmikroskopisch charakterisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.24 dargestellt.

Abbildung 4.24: Histogramme, welche die gesamten, aus der Höhenanalyse aller AFM-Aufnahmen, resultierenden Proteinhöhenwerte für Ezrin wt und Ezrin T567D an DOGS-Ni-NTA darstellen. **A:** Höhenverteilung aus AFM-Aufnahmen von DPPC/DOGS-Ni-NTA/BODIPY®-C₁₂-HPC (96.5:3:0.5)-Lipidmembranen nach Inkubation mit Ezrin wt. **B:** Höhenverteilung aus AFM-Aufnahmen von DPPC/DOGS-Ni-NTA/BODIPY®-C₁₂-HPC (96.5:3:0.5)-Lipidmembranen nach Inkubation mit Ezrin T567D. Aus der Anpassung einer GAUSS-Verteilung an die Daten resultiert der mittlere Wert für die Proteinhöhe mit Standardabweichung.

Da die Kristallstruktur des vollständigen Ezrinproteins nicht bekannt ist, wurde zu Vergleichszwecken die N-terminale Domäne Ezrins (N-ERMAD) rasterkraftmikroskopisch analysiert. Die Bestimmung der Proteinhöhe N-ERMADs diene als Standard, welcher sicherstellen sollte, dass die Art der Messung nicht zu einer Unterbestimmung der Proteinhöhenwerte durch mechanische Manipulation führte (vgl. Abb. 4.25).

Abbildung 4.25: Histogramme, welche die gesamten, aus der Höhenanalyse aller AFM-Aufnahmen, resultierenden Proteinhöhenwerte für N-ERMAD an DOGS-Ni-NTA und PIP₂ darstellen. **A:** Höhenverteilung aus AFM-Aufnahmen von DPPC/DOGS-Ni-NTA/BODIPY®-C₁₂-HPC (96,5:3:0,5)-Lipidmembranen nach Inkubation mit N-ERMAD. **B:** Höhenverteilung aus AFM-Aufnahmen von DPPC/PIP₂/TxR (96,8:3:0,2)-Lipidmembranen nach Inkubation mit N-ERMAD. Aus der Anpassung einer GAUSS-Verteilung an die Daten resultiert der mittlere Wert für die Proteinhöhe mit Standardabweichung.

Abschließend sind die mittels Rasterkraftmikroskopie detektierten Proteinhöhen Ezrins auf festkörperunterstützten Lipidmembranen graphisch in einem Säulendiagramm gegenübergestellt (vgl. Abb. 4.26). Die ausgewerteten Proteinhöhen liegen mit einer Ausnahme in einem ähnlichen Bereich von 3,0-3,5 nm. Einzig die pseudophosphorylierte Ezrinmutante T567D zeigt mit 1,6 nm eine signifikant kleinere Proteinhöhe gebunden an PIP₂-haltige SLBs. Alle Ergebnisse der Proteinhöhen, gebunden an das gleiche Rezeptorlipid, zeigen untereinander nicht-signifikante Unterschiede mit Ausnahme von Ezrin T567D gebunden an PIP₂, hier zeigen beide Protein-Kombinationen sowie der Vergleich zu DOGS-Ni-NTA, signifikante Unterschiede. Hieraus kann geschlossen werden, dass sich die Bindungsweise von Ezrin T567D an PIP₂-haltigen Lipidmembranen und somit die Ausdehnung des Proteins auf der Oberfläche von den anderen untersuchten Kombinationen unterscheidet. Die Ergebnisse können neben den RfS-Ergebnissen (vgl. Abs. 4.4.1) als weiteres Indiz dafür gesehen werden, dass die vollständige Aktivierung des Proteins durch Pseudophosphorylierung und PIP₂-Bindung eine geöffnete Konformation und/oder eine Verschiebung des Monomer-Oligomer-Gleichgewichts verursachen

könnte. Nur die vollständige Aktivierung resultiert in einer sowohl mittels RIfS als auch AFM detektierbaren signifikant verringerten Proteinschichtdicke beziehungsweise -höhe.

Abbildung 4.26: Säulendiagramm, welches die mittels AFM detektierten Proteinhöhen nach Bindung von Ezrin wt (schwarz/grau), Ezrin T567D (rot) und N-ERMAD (grün) an SLBs bestehend aus DPPC/DOGS-Ni-NTA/BODIPY®-C₁₂-HPC (96.5:3:0.5, längsgestreift) beziehungsweise DPPC/PIP₂/TxR (96.8:3:0.2, quergestreift) gegenüberstellt. Ein durchgeführter statistischer *Student's t-Test* ergab für die Bindung der Proteine an DOGS-Ni-NTA nicht-signifikante Unterschiede (ns) und an PIP₂ signifikante Unterschiede beim Vergleich der Proteinhöhen von Ezrin wt und N-ERMAD mit Ezrin T567D, *** $p < 0.001$.

Eine weitere interessante Beobachtung ist die Tatsache, dass die N-terminale Domäne Ezrins (N-ERMAD) die gleiche Proteinhöhe aufweist, wie das gesamte Protein. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Proteinhöhe von Ezrin wt auf SLBs durch die N-ERMAD des Proteins bestimmt wird. Der C-ERMAD, sowie die zentrale, α -helikale Linkerregion tragen demnach nur geringfügig zur Gesamthöhe des Proteins bei.

Um einen möglichen Konformationswechsel im Fall von Ezrin T567D gebunden an PIP₂-haltige Lipidmembranen genauer untersuchen zu können, sollte im nächsten Schritt die Analyse der Sekundärstruktur des Proteins erfolgen. Hier lag die Annahme zugrunde, dass sich eine Änderungen der Konformation des Proteins in einer Veränderung der Sekundärstrukturverteilung niederschlagen könnte.

4.4.3 Sekundärstrukturanalyse von Ezrin in Abhängigkeit aktivierender Faktoren

Im Rahmen dieses Abschnitts der Arbeit sollte untersucht werden inwieweit der mit der Aktivierung des Proteins einhergehende Konformationswechsel eine Änderung der Sekundärstruktur von Ezrin bedingt. Hierzu wurde die Sekundärstruktur zunächst mittels der abgeschwächten Totalreflexions-FTIR-Spektroskopie (engl. *attenuated total reflection*, ATR) nach Proteinbindung an eine festkörperunterstützte Lipidmembran untersucht. Die Dekonvolution und Auswertung der IR-Spektren erfolgte mit der Software PEAKFIT und sollte anhand des kristallographisch bekannten N-ERMAD Proteins etabliert werden. Die Experimente wurden sowohl für N-ERMAD als auch für Ezrin wt und Ezrin T567D an DOGS-Ni-NTA- und PIP₂-haltigen Lipidmembranen durchgeführt. Hierdurch sollte im Fall von N-ERMAD ein Standard für beide Rezeptorlipide etabliert werden und hierauf basierend die Sekundärstrukturverteilung des Ezrinwildtyps und der pseudophosphorylierten Ezrinmutante T567D untersucht werden. Der Einsatz der zwei Rezeptorlipide gewährleistete im Zusammenspiel mit den Proteinen alle möglichen Aktivierungsstufen. Ein Rezeptorlipidgehalt von 8 mol% ermöglichte ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis.

Nachdem die ATR-FTIR-spektroskopischen Untersuchungen durchgeführt und ausgewertet wurden, sollten durch die etablierte Sekundärstrukturanalyse-Methode, der CD-Spektroskopie, die erhaltenen Ergebnisse validiert werden.

Die Kristallstruktur von N-ERMAD ist literaturbekannt und in der RCSB PROTEIN DATA BANK erfasst (PDB ID: 1NI2).^{160,161} Sie umfasst die N-terminalen 296 Aminosäuren des Ezrin wt und unterscheidet sich leicht von dem in der Arbeit verwendeten rekombinanten N-ERMAD. Der fusionierte His₆-Tag des Proteins verlängert das Protein um 37 Aminosäuren, über dessen Sekundärstruktur keine Information vorliegt.

Aus den bekannten Daten, bei denen Sekundärstrukturelemente der entsprechenden Anzahl an Aminosäuren zugeordnet wurden, lässt sich eine Sekundärstrukturverteilung ableiten, welche sich auf ungeordnete Strukturelemente, α -Helices, β -Schleifen und β -Faltblätter beschränkt. Andere Sekundärstrukturelemente wie 3_{10} -Helices wurden als α -Helices und β -Brücken als β -Faltblätter gezählt. Nicht zugeordnete Strukturelemente und Biegungen wurden als ungeordnete Strukturen zusammengefasst. In Tabelle 4.3 ist die entsprechende Sekundärstrukturverteilung für N-ERMAD aufgelistet.

Tabelle 4.3: Sekundärstrukturverteilung von N-ERMAD basierend auf der Kristallstruktur des Proteins.^{160, 161}

Sekundärstrukturelement	Aminosäuren	Anteil [%]
Ungeordnet	91	30.7
α -Helix	106	35.8
β -Schleife	27	9.1
β -Faltblatt	72	24.3

Für die ATR-FTIR-spektroskopische Sekundärstrukturbestimmung von N-ERMAD wurden sowohl Messungen an Lipidmembranen bestehend aus DOPC/DOGS-Ni-NTA (92:8, $n=3$) als auch aus POPC/PIP₂ (92:8, $n=4$) durchgeführt. Da das Fehlen der C-terminalen Domäne einen aktivierungsbedingten Konformationswechsel, resultierend in der Dissoziation von N- und C-Terminus des Proteins unmöglich macht, konnte ein potenzieller, zusätzlicher Einfluss des Rezeptorlipids auf die Sekundärstruktur von N-ERMAD untersucht werden.

Die nach Dekonvolution aus den IR-Spektren resultierenden Peakpositionen und -flächenanteile der Anpassungen sind in Tabelle 4.4 gegenübergestellt und wurden entsprechend der Literatur den verschiedenen Sekundärstrukturelementen der Amid I-Bande zugeordnet (vgl. Abs. 3.5.1).⁸⁷

Tabelle 4.4: ATR-FTIR-spektroskopische Sekundärstrukturverteilung von N-ERMAD basierend auf den aus der Anpassung der Amid I-Bande resultierenden Peakpositionen und -flächenanteilen mit entsprechender Standardabweichung σ .

Rezeptorlipid	Sekundärstrukturelement	Wellenzahl [cm ⁻¹]	Flächenanteil [%]
DOGS-Ni-NTA	Ungeordnet	1636.4 $\pm$ 0.3	27.4 $\pm$ 1.1
	α -Helix	1653.3 $\pm$ 0.3	33.7 $\pm$ 1.0
	β -Schleife	1668.6 $\pm$ 0.9	16.6 $\pm$ 0.1
	β -Faltblatt	1619.6 $\pm$ 0.2	12.1 $\pm$ 0.4
		1683.1 $\pm$ 1.1	10.1 $\pm$ 0.5
PIP ₂	Ungeordnet	1636.2 $\pm$ 0.4	27.9 $\pm$ 0.8
	α -Helix	1653.3 $\pm$ 0.6	33.5 $\pm$ 0.7
	β -Schleife	1669.2 $\pm$ 1.4	16.7 $\pm$ 1.4
	β -Faltblatt	1619.5 $\pm$ 0.6	12.5 $\pm$ 1.2
		1683.7 $\pm$ 0.8	9.5 $\pm$ 1.2

Die ATR-FTIR-spektroskopischen Ergebnisse wurden im Anschluss durch den Vergleich mit einer weiteren Methode zur Sekundärstrukturanalyse validiert. Hierzu wurde die CD-Spektroskopie genutzt, bei welcher Proteine in Lösung vermessen werden. Die Aus-

wertung der CD-spektroskopischen Daten von N-ERMAD erfolgte mittels des Online-Analyseportals DICHROWEB nach dem Algorithmus CDSSTR und dem Referenzdatensatz 4.^{96–98} Die resultierenden Werte sind in Tabelle 4.5 aufgelistet.

Tabelle 4.5: CD-spektroskopische Sekundärstrukturverteilung von N-ERMAD in Lösung. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von DICHROWEB nach dem Algorithmus CDSSTR und dem Referenzdatensatz 4.

Sekundärstrukturelement	Anteil [%]
Ungeordnet	28
α -Helix	31
β -Schleife	20
β -Faltblatt	21

Sowohl die ATR-FTIR- als auch die CD-spektroskopischen Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse von N-ERMAD sind in Abbildung 4.27 in einem Säulendiagramm zusammengefasst und der Sekundärstrukturverteilung der Kristallstruktur gegenübergestellt.

Abbildung 4.27: Gegenüberstellung der ATR-FTIR- (gebunden an DOGS-Ni-NTA oder PIP₂) und CD-spektroskopischen (in Lösung) Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse von N-ERMAD mit der Sekundärstrukturverteilung der Kristallstruktur.

Die Ergebnisse der ATR-FTIR-spektroskopischen Sekundärstrukturanalyse von N-ERMAD weisen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der unterschiedlichen Lipidmembranzusammensetzungen auf. Dies wurde durch einen ungepaarten

Student's t-Test bestätigt. Ein Einfluss der Bindung an das Rezeptorlipid auf die Sekundärstruktur des Proteins N-ERMAD kann somit ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis lässt sich auch anhand von kristallographischen Untersuchungen an N-ERMAD in An- und Abwesenheit von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), der Kopfgruppe von PIP₂, stützen.¹⁶⁰ Auch hier konnte kein Einfluss von IP₃ auf die Sekundärstruktur der N-terminalen Domäne Ezrins festgestellt werden.

Vergleicht man die ATR-FTIR-spektroskopischen Ergebnisse mit denen der Kristallstruktur, so lässt sich eine gute Übereinstimmung ermitteln. Während der Anteil der β -Schleifen aus den IR-Daten, mit Abweichungen von ungefähr 7.5%, etwas höher bestimmt wurde, fielen die Anteile an ungeordneten Strukturelementen, α -Helices und β -Faltblättern, mit Abweichungen von 2-3%, nur geringfügig kleiner aus.

Hieraus lässt sich schließen, dass die Sekundärstrukturanalyse mit der Software PEAKFIT mit den gewählten Parametern, zufriedenstellende Ergebnisse liefert. Die Zuordnung der Signale einzelner Strukturelemente ist richtig gewählt und auch eine mögliche Problematik durch überlagernde Signale an den Rändern der Amid I-Bande scheint nicht relevant zu sein. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Art der Anpassungen an die IR-Daten auch für die Auswertung des gesamten Ezrinproteins genutzt werden kann.

Der Vergleich der CD-spektroskopisch ermittelten Sekundärstrukturverteilung von N-ERMAD mit der Kristallstruktur weist hingegen größere Abweichungen als die ATR-FTIR-spektroskopischen Ergebnisse auf. Sowohl der Anteil ungeordneter Strukturelemente, als auch der an α -Helices und β -Faltblättern wurden mit Abweichungen von 2.7-4.8% erkennbar niedriger bestimmt. Hingegen weicht der Anteil an β -Schleifen mit einer Differenz von 10.9% von den kristallographischen Ergebnissen ab. Dies ist verwunderlich, da bekannt ist, dass eher der Anteil an α -Helices über die CD-Spektroskopie überbestimmt wird.¹⁶² Insgesamt zeigen aber auch die CD-spektroskopischen Untersuchungen eine gute Übereinstimmung mit den kristallographischen Daten.

Vergleicht man abschließend die ATR-FTIR-spektroskopischen mit den CD-spektroskopischen Ergebnissen, welche jeweils in wässrigen Medien durchgeführt wurden, so lässt sich eine große Übereinstimmung feststellen. Die Anteile ungeordneter Strukturelemente, α -Helices und β -Faltblätter weichen mit 0.4-2.6% nur geringfügig ab. Eine mit ungefähr 5% leicht erhöhte Abweichung lässt sich für die Anteile der β -Schleifen verzeichnen. Insgesamt liegen hier die geringsten Abweichungen vor. Dies könnte einerseits durch das Vermessen im wässrigen Medium in beiden Fällen und/oder andererseits in der Tatsache begründet sein, dass das rekombinante N-ERMAD

Protein 37 weitere Aminosäuren trägt. Hierdurch würde man für die ATR-FTIR- und CD-spektroskopischen Ergebnisse aufgrund ähnlicher Messbedingungen eine größere Übereinstimmung im Vergleich zur kristallographischen Analyse des N-ERMAD-Wildtyps innerhalb einer festen Kristallstruktur erwarten, was anhand der Ergebnisse bestätigt wurde.

Sekundärstrukturanalyse von Ezrin wt und Ezrin T567D

Im Folgenden werden die Ergebnisse ATR-FTIR- und CD-spektroskopischen Sekundärstrukturanalyse von Ezrin wt und Ezrin T567D gegenübergestellt. Die in Abbildung 4.28 dargestellten ATR-FTIR-Absorptionsspektren zeigen die Amid I-Bande im Bereich von 1710 cm^{-1} bis 1600 cm^{-1} von Ezrin wt und Ezrin T567D nach Bindung an DOGS-Ni-NTA- (vgl. Abb. 4.28A) beziehungsweise PIP₂-haltige (4.28B) festkörperunterstützte Lipidmembranen. Die Daten wurden grundlinienkorrigiert, normiert und der Übersicht halber gegeneinander auf der y-Achse verschoben.

Abbildung 4.28: Gegenüberstellung beispielhafter ATR-FTIR-Absorptionsspektren im Bereich von 1710 cm^{-1} bis 1600 cm^{-1} der Amid I-Bande von Ezrin wt (schwarz) und Ezrin T567D (rot). **A:** Amid I-Bande der Proteine nach Bindung an eine DOPC/DOGS-Ni-NTA (92:8) Lipidmembran. **B:** Amid I-Bande der Proteine nach Bindung an eine POPC/PIP₂ (92:8) Lipidmembran. Die Spektren sind grundlinienkorrigiert, normiert und gegeneinander auf der y-Achse verschoben.

Die vier Banden weisen ein Intensitätsmaximum bei ungefähr 1650 cm^{-1} auf. Des Weiteren weisen zwei Schultern im Bereich von 1675 cm^{-1} und 1635 cm^{-1} auf eine Überlagerung einzelner Signale zur Gesamtbande hin. Die Deconvolution und quantitative Auswertung der Daten beruht auf zwei unabhängigen mathematischen Vorgehensweisen. Zur Auswertung über die Software PEAKFIT wurde einerseits die zweite Ableitung als

Ausgangspunkt gewählt (*Second Derivative*-Ansatz) und andererseits eine Bandenverschmälerungsmethode über FOURIER-Transformationen (*FOURIER Self-Deconvolution*-Ansatz).^{163,164} Dies führte zur Anpassung von fünf GAUSS-LORENTZ-Kurven an die Daten, welche anschließend durch eine *Least-Square*-Anpassung verfeinert wurden. Die Flächen der Kurven entsprechen den Sekundärstrukturanteilen. Die Ergebnisse der Anpassungen wurden nur dann weiter berücksichtigt, wenn diese durch beide Auswertungsansätze bestätigt werden konnten. Die Abweichungen untereinander lagen meistens unter 1%, so dass die Ergebnisse in einem Mittelwert zusammengefasst wurden.

In Abbildung 4.29 sind exemplarisch die Anpassungen von fünf GAUSS-LORENTZ-Kurven an die Amid I-Bande von Ezrin wt gebunden an DOGS-Ni-NTA (vgl. Abb. 4.29A) und Ezrin T567D gebunden an PIP₂ (vgl. Abb. 4.29B) aufgeführt. Unter Berücksichtigung der aktivierenden Einflüsse wird erwartet, dass Ezrin wt gebunden an DOGS-Ni-NTA vollständig inaktiv, in geschlossener Konformation vorliegt. Ezrin T567D gebunden an PIP₂ vereint beide aktivierenden Faktoren durch Pseudophosphorylierung und PIP₂-Bindung und könnte daher vollständig aktiviert, in geöffneter Konformation vorliegen.

Abbildung 4.29: Beispiele für die Anpassung (durchgezogene Linie) der mittels ATR-FTIR-Spektroskopie detektierten Amid I-Bande (Quadrate) von Ezrin wt gebunden an DOGS-Ni-NTA (A) und Ezrin T567D gebunden an PIP₂ (B) durch fünf GAUSS-LORENTZ-Kurven zur Bestimmung der Sekundärstrukturverteilung des Proteins. Die Flächen der einzelnen GAUSS-LORENTZ-Kurven entsprechen den Sekundärstrukturanteilen von β -Faltblättern (blau), ungeordneten Strukturen (pink), α -Helices (orange) und β -Schleifen (grün)

Bei der qualitativen Beurteilung der zwei Amid I-Banden lässt sich eine leichte Verschmälerung im Bereich des Maximums des Signals bei vollständiger Aktivierung Ezrins beobachten (vgl. Abb. 4.29B).

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Sekundärstrukturverteilungen aller ATR-FTIR-Messungen an Ezrin sind in Tabelle 4.6 gegenübergestellt:

Tabelle 4.6: ATR-FTIR-spektroskopisch ermittelte Sekundärstrukturverteilung von Ezrin wt und Ezrin T567D basierend auf den aus der Anpassung der Amid I-Bande resultierenden Flächenanteilen der GAUSS-LORENTZ-Kurven mit entsprechender Standardabweichung σ .

Rezeptorlipid	Protein	Sekundärstrukturelement	Flächenanteil [%]
DOGS-Ni-NTA	Ezrin wt $n = 5$	Ungeordnet	24.9 ± 1.6
		α -Helix	38.7 ± 2.1
		β -Schleife	17.3 ± 1.1
		β -Faltblatt	19.2 ± 1.5
DOGS-Ni-NTA	Ezrin T567D $n = 4$	Ungeordnet	25.4 ± 1.0
		α -Helix	38.1 ± 1.6
		β -Schleife	16.7 ± 0.8
		β -Faltblatt	19.7 ± 1.3
PIP ₂	Ezrin wt $n = 8$	Ungeordnet	25.7 ± 0.9
		α -Helix	38.9 ± 1.6
		β -Schleife	16.8 ± 1.3
		β -Faltblatt	18.6 ± 1.2
PIP ₂	Ezrin T567D $n = 9$	Ungeordnet	26.2 ± 1.8
		α -Helix	37.8 ± 1.7
		β -Schleife	16.8 ± 0.8
		β -Faltblatt	19.2 ± 1.8

Bei der Anzahl der Messungen ist zu beachten, dass es sich hierbei um die Zahl der durchgeführten Messexperimente und nicht um die Zahl der gemessenen Spektren handelt. Jede Messung beinhaltet in der Regel zwischen 25 und 30 Spektren, wobei jedes Spektrum wiederum aus 60 Spektren gemittelt wurde.

Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels eines ungepaarten *Student's t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95% überprüft. Dieser ergab für alle möglichen Protein/Rezeptorlipid-Kombinationen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Sekundärstrukturverteilungen.

Hierauf aufbauend erfolgte die CD-spektroskopische Analyse der Proteine in Lösung in An- und Abwesenheit submizellarer Konzentrationen an PIP₂. Ähnlich zu den ATR-FTIR-spektroskopischen Messungen konnten so die Bedingungen für die möglichen Aktivierungsstufen des Proteins Ezrin auch in Lösung geschaffen werden.

In Abbildung 4.30 sind exemplarische CD-Spektren der Proteine Ezrin wt und Ezrin T567D in Ab- und Anwesenheit von submizellarem PIP₂ dargestellt.

Abbildung 4.30: Beispielhafte CD-Spektren der mittleren residualen Elliptizität Θ in Abhängigkeit der Wellenlänge (im Bereich von 190 nm bis 260 nm) von Ezrin wt (schwarz) und Ezrin T567D (rot) (jeweils $c \approx 1 \mu\text{M}$) in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von submizellarem PIP₂ ($c \approx 2 \mu\text{M}$).

Die CD-Spektren weisen ein Maximum im Bereich von 192 nm auf. Obwohl sich dieses an der unteren Grenze des aufgezeichneten Bereiches befindet, konnte es in weiteren Messungen (beginnend bei 180 nm) als globales Maximum identifiziert werden. Des Weiteren zeichnen sich die Spektren durch ein globales Minimum bei 208 nm und einem lokalen Minimum bei 222 nm aus. Bei einer Wellenlänge von ungefähr 201 nm findet jeweils ein Vorzeichenwechsel der mittleren residualen Elliptizität Θ von positiven zu negativen Werten bei steigender Wellenlänge statt. An dieser Stelle kehrt sich die Dominanz der Absorptionen einer der beiden zirkularen Polarisationsrichtungen um. Ab einer Wellenlänge von ungefähr 250 nm ist die mittlere residuale Elliptizität Θ in allen Fällen etwa Null.

Der qualitative Vergleich der CD-Spektren zeigt neben einer hohen Übereinstimmung lediglich Unterschiede bezüglich der Signalintensitäten. Die Signalintensitäten in Anwesenheit von PIP₂ (vgl. Abb. 4.30B) sind um etwa $2000 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ niedriger im Vergleich zu den Signalen in Abwesenheit von PIP₂. Es erscheint naheliegend, dass dies auf den Zusatz von PIP₂ und weniger durch eine veränderte Sekundärstrukturverteilung zu erklären ist. Da die Messungen auf die Proteinkonzentration normiert werden, könnte der Zusatz der PIP₂-Lösung geringe Konzentrationsunterschiede induzieren und somit die Signalschwankungen erklären. Aufschluss liefert allerdings erst die quantitative Auswertung mittels DICHROWEB. Die hieraus resultierenden Ergebnisse der Sekundärstrukturverteilungen von Ezrin wt und Ezrin T567D in Gegenwart von submizellaren PIP₂-Konzentrationen beziehungsweise in Abwesenheit des Rezeptorlipids sind in Tabelle 4.7 aufgelistet:

Tabelle 4.7: CD-spektroskopisch ermittelte Sekundärstrukturverteilung von Ezrin wt und Ezrin T567D in An- und Abwesenheit von PIP₂ basierend auf der Auswertung mittels DICHROWEB nach dem CDSSTR Algorithmus und dem Referenzdatensatz 4 mit entsprechender Standardabweichung σ .

PIP ₂	Protein	Sekundärstrukturelement	Flächenanteil [%]
ohne	Ezrin wt $n = 3$	Ungeordnet	26.4±1.8
		α -Helix	44.1±14.0
		β -Schleife	16.1±6.4
		β -Faltblatt	13.4±6.0
ohne	Ezrin T567D ^{*,†} $n = 3$	Ungeordnet	26.1±0.4
		α -Helix	45.8±3.4
		β -Schleife	14.7±1.2
		β -Faltblatt	13.4±2.6
mit	Ezrin wt [*] $n = 3$	Ungeordnet	26.5±1.6
		α -Helix	39.6±4.8
		β -Schleife	18.5±2.6
		β -Faltblatt	15.4±1.5
mit	Ezrin T567D [†] $n = 3$	Ungeordnet	26.8±1.2
		α -Helix	38.9±3.2
		β -Schleife	18.5±1.5
		β -Faltblatt	15.8±1.6

Signifikante Unterschiede bestimmt über einen ungepaarten *Student's t*-test für:

* Ezrin T567D, ohne PIP₂/Ezrin wt, mit PIP₂; † Ezrin T567D, ohne PIP₂/Ezrin T567D mit PIP₂.

Vergleicht man zunächst die Verteilungen in An- und Abwesenheit von submizellarem PIP₂ miteinander, so lässt sich feststellen, dass in Gegenwart von PIP₂ die Sekundärstrukturverteilungen der einzelnen Proteine einen von ungefähr 45% um 5% erniedrigten Anteil an α -Helices aufweisen. Die Anteile an β -Schleifen und β -Faltblättern in Anwesenheit von PIP₂ unterscheiden sich mit ungefähr 19% und 15% um etwa 2-3% von den Werten ohne PIP₂. Die ungeordneten Sekundärstrukturelemente weisen in beiden Fällen einen mit ungefähr 26% gleichen Wert auf. Die Werte für die Sekundärstrukturverteilungen innerhalb eines Lipidsystems sind sehr ähnlich.

Ein für alle möglichen Protein/Lipid-Kombinationen durchgeführter statistischer, ungepaarter *Student's t*-Test weist sowohl für die Kombination Ezrin T567D, ohne PIP₂ mit Ezrin wt mit PIP₂, als auch für die Kombination Ezrin T567D ohne PIP₂ mit Ezrin T567D mit PIP₂ signifikante Unterschiede nach. Die signifikanten Unterschiede können einerseits als ein Hinweis auf eine mit der Konformationsänderung des Proteins einhergehenden Sekundärstrukturänderung gesehen werden. Demnach würde sowohl Ezrin T567D

mit PIP₂ als auch Ezrin wt mit PIP₂ eine veränderte Sekundärstrukturverteilung aufweisen im Vergleich zu Ezrin T567D ohne PIP₂. Andererseits erscheint diese Aussage inkonsistent, denn wäre dies der Fall müssten sich auch für die Kombination Ezrin wt ohne PIP₂ mit den Proteinen in Gegenwart von PIP₂ signifikante Unterschiede ergeben, was nicht der Fall. Darüber hinaus widerspricht dies auch den zuvor dargestellten Ergebnissen (vgl. Abs. 4.4.3, 4.4.2, 4.4.1). Die ATR-FTIR-spektroskopischen Werte zeigen keine signifikanten Unterschiede bezüglich aller möglicher Protein/Lipid-Kombinationen. Die Höhenanalysen der Proteine mittels RfS und AFM zeigen nur im Fall von Ezrin T567D gebunden an PIP₂ einen signifikanten Unterschied der Ergebnisse. Zusammengefasst werden daher Unterschiede in den Sekundärstrukturverteilungen der Proteine in Abhängigkeit von (Pseudo-)Phosphorylierung und PIP₂-Bindung ausgeschlossen.

Vergleicht man die mittels ATR-FTIR-Spektroskopie erzielten Ergebnisse zur Sekundärstrukturverteilung Ezrins unter verschiedenen aktivierenden Bedingungen mit den entsprechenden CD-spektroskopischen Ergebnissen (vgl. Abb. 4.31), so lässt sich eine gute Übereinstimmung der absoluten Werte feststellen.

Abbildung 4.31: Gegenüberstellung der ATR-FTIR- (A) und CD-spektroskopisch (B) ermittelten Sekundärstrukturverteilungen von Ezrin wt (schwarz) und Ezrin T567D (rot). In Ab- (quergestreift) und Anwesenheit (längsgestreift) von PIP₂.

Im Vergleich zu den ATR-FTIR-spektroskopischen Daten sind die Anteile der β -Faltblätter, im Fall der CD-spektroskopischen Untersuchung Ezrins, zugunsten der α -helikalen Anteile niedriger bestimmt. Dieser erhöhte Anteil an α -Helices kann einerseits durch die bekannte Problematik der Überbestimmung an α -Helices mittels CD-Spektroskopie erklärt werden.¹⁶² Andererseits ist auch denkbar, dass die Anteile der β -Faltblätter im Fall der ATR-FTIR-spektroskopischen Sekundärstrukturanalyse zu hoch bestimmt wurden. Wie in Abbildung 4.29 dargestellt wird die Sekundärstrukturverteilung über eine Anpassung von GAUSS-LORENTZ-Kurven an die gemessene Amid I-Bande

bestimmt. Die Anteile der β -Faltblätter spalten sich hierbei in zwei Banden auf, welche sich jeweils an den Rändern des Gesamtsignals befinden. Diese bestimmten Intensitäten der Banden sind somit wesentlich anfälliger für Überlagerungen durch Anteile von benachbarten Signalen. Insbesondere die bei niedrigeren Wellenzahlen an die Amid I-Bande angrenzende Amid II-Bande könnte hierauf einen Einfluss haben.

Insgesamt bewegen sich die Abweichungen der Ergebnisse der zwei Sekundärstrukturanalysemethoden mit 1-8% in einem zufriedenstellend niedrigem Bereich. Die Sekundärstrukturanalyse von Ezrin unter verschiedenen aktivierenden Bedingungen mittels ATR-FTIR- und CD-spektroskopischer Methode zeigt keine Änderungen in der Sekundärstrukturverteilung des Proteins. Somit konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen einer aktivierungsregulierten (PIP₂-Bindung und Phosphorylierung) Konformationsänderung von Ezrin einhergehend mit einer Sekundärstrukturänderung nicht nachgewiesen werden.

4.4.4 Untersuchung eines FÖRSTER-Resonanzenergietransfers von Ezrinkonstrukten in Abhängigkeit aktivierender Faktoren

Um einen PIP₂- und/oder Phosphorylierungs-abhängigen Konformationswechsel Ezrins detektieren zu können, wurden im Rahmen einer DFG-Kooperation mit der Arbeitsgruppe V. GERKE¹ FÖRSTER-Resonanzenergietransfer (FRET) Experimente durchgeführt. Beim FRET handelt es sich um eine Methodik, Proteininteraktionen mit geringem Abstand (≤ 10 nm) zueinander mittels Fluoreszenz zu untersuchen.¹⁰⁵ Hierdurch wurde die Interaktion zwischen der N- und C-terminalen Domäne des Proteins, welche Informationen über eine intramolekulare (geschlossene und geöffnete Konformation) und intermolekulare (Monomere und Oligomere) Wechselwirkung von Ezrin beinhaltet untersucht. Für die FRET-Experimente wurden zweifach fluoreszenzmarkierte Ezrinkonstrukte verwendet. Sowohl Ezrin wt als auch Ezrin T567D waren N-terminal mit dem organischen Farbstoff Cy@3 (Akzeptor) und C-terminal mit einem grün fluoreszierenden Protein (engl. *enhanced green fluorescent protein*, eGFP, Donor) markiert. Es ist literaturbekannt, dass Cy3 und eGFP ein effizientes Donor-Akzeptor Paar für FRET-Experimente bilden.^{165, 166} Bisher ist nur Moesin als Gesamtprotein kristallographisch erfasst, PHANG *et al.* gelang es aber kürzlich Ezrin (PDB ID: 4RM9) zu kristallisieren und den assoziierten N- und C-ERMAD strukturell aufzulösen.¹⁶⁷ Hieraus kann mit Hilfe von JMO

¹Prof. Dr. Volker Gerke, Victoria Shabardina, Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE), Westfälische Wilhelms-Universität Münster. (DFG-Projekte: STE 884/12-1, GE 514/8-1 und 9-1.)

der Abstand zwischen N- und C-ERMAD auf 6.1 nm bestimmt werden. Als Vergleichskonstrukte wurden auch einfach markierte Proteine präpariert. Insgesamt ergaben sich somit sechs verschiedene Ezrinkonstrukte: Cy3-Ezrin wt-eGFP (Cy3-wt-eGFP), Cy3-Ezrin wt (Cy3-wt), Ezrin wt-eGFP (wt-eGFP), Cy3-Ezrin T567D-eGFP (Cy3-D-eGFP), Cy3-Ezrin T567D (Cy3-D), Ezrin T567D-eGFP (D-eGFP), welche in Abbildung 4.32 schematisch gegenübergestellt sind.

Abbildung 4.32: Schematische Darstellung der verwendeten Ezrin wt- und Ezrin T567D-Konstrukte. **A:** Doppelt markiertes Cy3-Ezrin-eGFP-Konstrukt. **B:** N-terminal markiertes Cy3-Ezrinkonstrukt. **C:** C-terminal markiertes Ezrin-eGFP-Konstrukt.

Fluoreszenzspektren der Ezrinkonstrukte

Ein FRET-Signal sollte fluoreszenzspektroskopisch anhand der Charakterisierung von vier Ezrinkonstrukten in Lösung nachgewiesen werden. Hierzu wurden die doppelt fluoreszenzmarkierten Ezrin wt und Ezrin T567D Konstrukte jeweils bei 488 nm (Donoranregung) und 550 nm (Akzeptoranregung) angeregt. Als Referenz diente das einfach fluoreszenzmarkierte Ezrin-eGFP-Konstrukt, welches bei 488 nm angeregt wurde. Die in Abbildung 4.33 dargestellten Fluoreszenzspektren zeigen im Fall des einfach markierten Ezrin-eGFP-Konstrukts (grüne Linie) ein für eGFP typisches Emissionsmaximum bei ungefähr 510 nm.¹⁶⁸

Die Donor- (blaue Kurve) beziehungsweise Akzeptoranregung (rote Kurve) des doppelt fluoreszenzmarkierten Ezrinkonstrukts führte in beiden Fällen zu einer Cy3-Emission mit einem typischen Maximum bei 570 nm.¹⁶⁹

Abbildung 4.33: Fluoreszenzspektren der Ezrin wt- (A) und Ezrin T567D-Konstrukte (B). Fluoreszenzspektrum von Ezrin-eGFP angeregt bei 488 nm (grüne Kurve), Cy3-Ezrin-eGFP angeregt bei 488 nm (blaue Kurve) und bei 550 nm (rote Kurve, Fluoreszenzintensität durch fünf geteilt). Die schwarze Kurve stellt das Differenzspektrum der grünen und blauen Kurve dar.

Die gemessene Akzeptorfluoreszenz bei Anregung des Donors eGFP (blaue Kurve) kann einerseits auf einen FÖRSTER-Resonanzenergietransfer oder einen *Cross-talk*, bei dem eGFP im Bereich von Cy3 emittiert, zurückgeführt werden. Um einen *Cross-talk* auszuschließen wurde das Referenzspektrum des Ezrin-eGFP-Konstrukts aufgenommen. Hieraus ergibt sich zusammen mit dem Donoranregungsspektrum (blaue Kurve) ein Differenzspektrum (schwarze Kurve) welches im Bereich von 570 nm das korrigierte FRET-Signal darstellt.

Sowohl Ezrin wt als auch Ezrin T567D zeigen fluoreszenzspektroskopisch ein FRET-Signal in Lösung. Ezrin wt liegt vollständig inaktiviert vor und daher in der geschlossenen, N- und C-Terminus assoziierten Form. Aufgrund der Nähe von N- und C-Terminus in der geschlossenen Konformation erklärt dies das FRET-Signal bezogen auf Ezrin wt. Aufgrund der ähnlichen Spektren von Ezrin wt und Ezrin T567D lässt sich ableiten, dass auch Ezrin T567D in der geschlossenen Konformation vorliegt und N- und C-Terminus intramolekular interagieren können und so einen FRET ermöglichen. Um auszuschließen, dass die Proteine nicht intermolekular assoziiert als inaktiviertes Dimer vorliegen, wurden die Proteine mit der Protease Calpain I behandelt.¹⁷⁰ Calpain I ist dafür bekannt Ezrin zu spalten, aber das eGFP nicht zu beeinflussen.^{171, 172} Durch Zugabe von Calpain I zur Proteinlösung konnte eine Abnahme des FRET-Signals, hervorgerufen durch einen zum Teil

größeren Abstand von Donor und Akzeptor, beobachtet werden.¹⁷³ Dies ist ein weiterer Nachweis für ein ursächlich intramolekular begründetes FRET-Signal.

Akzeptor-Photobleichen von Lipidmembran-gebundenen Ezrinkonstrukten

Zur Untersuchung eines konformationsabhängigen FRET-Signals von Ezrin wurden die Proteinkonstrukte an festkörperunterstützte Lipidmembranen (SLBs) bestehend aus POPC/PIP₂ beziehungsweise DOPC/DOGS-Ni-NTA (96:4) gebunden und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hierzu wurden einerseits die doppelt fluoreszenzmarkierten Ezrinkonstrukte Cy3-wt-eGFP oder Cy3-D-eGFP (je $c = 1.5 \mu\text{M}$) sowie andererseits die einfach fluoreszenzmarkierten Ezrinkonstrukte Cy3-wt/wt-eGFP oder Cy3-D/D-eGFP in einem 1:1 Verhältnis (je $c = 0.75 \mu\text{M}$) an die SLBs gebunden. Die Experimente basieren auf der Annahme, dass die Proteine mit ähnlicher Affinität und Kinetik an die Rezeptorlipide binden. Somit sollten ähnliche Donor-zu-Akzeptor Verhältnisse ($R_{D:A} = 1$) an der Lipidmembranoberfläche vorliegen.

Zur Bestimmung der FÖRSTER-Resonanzenergietransfereffizienz wurden Akzeptor-Photobleichexperimente durchgeführt. Das Prinzip basiert auf dem Photobleichen und somit der Zerstörung der Akzeptormoleküle (Cy3), welches einen Anstieg der Fluoreszenzintensität der Donormoleküle (eGFP), aufgrund der Störung des FRETs, hervorruft. In Abbildung 4.34 sind exemplarisch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und der Verlauf der Fluoreszenzintensitäten während eines Akzeptor-Photobleichexperiments dargestellt. In allen Fällen konnte eine homogene Fluoreszenz der Proteine beobachtet werden. Dies spricht für eine homogene Verteilung der Ezrinkonstrukte an den SLBs. Entsprechend der Abbildung 4.34 führte ein Bleichen des Akzeptors (vgl. Abb. 4.34B1) zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität (vgl. Abb. 4.34C1B), aufgrund der Zerstörung des Fluorophors im Bereich des ROIs (engl. *region of interest*). Gleichzeitig stieg die Fluoreszenzintensität des Donors im Bereich des ROIs an (vgl. Abb. 4.34A1/C1A), denn durch Störung des FRETs wird die gelöschte eGFP-Fluoreszenz nun wieder emittiert.

Abbildung 4.34: Akzeptor-Photobleichen von Cy3-Ezrin wt-eGFP gebunden an eine festkörperunterstützte Lipidmembran bestehend aus DOPC/DOGS-Ni-NTA (96:4). **A:** eGFP-Fluoreszenz (grün). **B:** Cy3-Fluoreszenz (rot) Der gelbe Kreis 1 markiert den ROI (engl. *region of interest*) nach Bleichen von Cy3. Der gelbe Kreis 2 markiert den Referenz-ROI. Maßstabsbalken: 5 μm . **C:** Zeit aufgelöste Darstellung des Bleichvorgangs, welche die Zunahme der eGFP-Fluoreszenzintensität (grüne Kurve, 1A) der Abnahme der Cy3-Fluoreszenzintensität (rote Kurve, 1B) gegenüberstellt. Die Zahlen 1 und 2 beziehen sich auf die unter **A** und **B** markierten ROIs.

Messungen der FRET-Effizienz an gemischten Proben der einfach fluoreszenzmarkierten Proteinkonstrukte aus Cy3-Ezrin und Ezrin-eGFP wurden durchgeführt, um den Anteil an intermolekularem FRET in den doppelt fluoreszenzmarkierten Proben näherungsweise bestimmen zu können. Die FRET-Effizienz wurde mittels der IMAGEJ Erweiterung FRETcalc aus den Akzeptor-Bleichexperimenten berechnet (vgl. Abs. 3.7.7).¹⁰⁸ Die gesammelten Ergebnisse sind in Abbildung 4.35 zusammengestellt. Hierbei zeigen die einfach markierten Ezrinkonstrukte (rechts dargestellt) eine signifikant verminderte FRET-Effizienz gegenüber den doppelt markierten Proteinkonstrukten (links dargestellt).

Abbildung 4.35: Boxplots, welche die Ergebnisse der FRET-Effizienzanalyse von Lipidmembran-gebundenen Ezrin wt und Ezrin T567D darstellen. Sowohl die doppelt markierten Ezrinkonstrukte (**links:** Ezrin wt (grau/schwarz)=Cy3-wt-eGFP; Ezrin T567D (rot)=Cy3-D-eGFP, je $c = 1.5 \mu\text{M}$) als auch die 1:1 Mischungen der einfach markierten Ezrinkonstrukte (**rechts:** Ezrin wt (grau/schwarz)=Cy3-wt und wt-eGFP; Ezrin T567D (rot)=Cy3-D und D-eGFP, je $c = 0.75 \mu\text{M}$) wurden an festkörperunterstützte Lipidmembranen bestehend aus DOPC/DOGS-Ni-NTA (96:4, quergestreift) oder POPC/PIP₂ (96:4, längsgestreift) gebunden. Der FÖRSTER-Resonanzenergietransfer wurde durch Akzeptor-Photobleichen bestimmt. Die FRET-Effizienz wurde über die IMAGEJ Erweiterung FRETCALC berechnet. Die Box repräsentiert die mittleren 50% der Daten, den sogenannten Interquartilsbereich (engl. *interquartile range*, IQR), die waagerechte Linie den Median, der Punkt innerhalb der Box den Mittelwert und die Antennen sind mit $1.5 \times \text{IQR}$ definiert. Zusätzlich wurde jeder Datenpunkt neben der entsprechenden Box dargestellt (schwarze/rote Punkte). Ein durchgeführter ungepaarter, nicht-parametrischer MANN-WHITNEY-*U*-Test weist signifikante Unterschiede für Ezrin T567D mit $***p < 0.001$ nach und nicht-signifikante für Ezrin wt.

Unter der Annahme, dass eine maximale Oberflächenbelegung an Protein sowohl für die einfach- als auch zweifach markierten Ezrinkonstrukte aufgrund der hohen gewählten Proteinkonzentration vorliegt, ergäben sich ähnliche FRET-Effizienzen wenn der FRET ausschließlich auf intermolekularen Wechselwirkungen beruhen würde. Nach Gleichung 3.27 würde dies auch für den Fall gelten, wenn die Akzeptor-/Donordichte für die zweifach markierten Proteinkonstrukte im Vergleich zu den einfach markierten Konstrukten verdoppelt wird. Die ungefähr doppelt so großen FRET-Effizienzen der zweifach markierten Ezrinkonstrukte sprechen dafür, dass Donor und Akzeptor einen teilweise geringeren Abstand zueinander aufweisen, was auf einen intramolekularen FRET schließen lässt.

Die ermittelten FRET-Effizienzen für Ezrin wt zeigen für die doppelt und einfach mar-

kierten Proteinkonstrukte ähnliche Werte beim Vergleich der Rezeptorlipide (bezogen auf den Median: 23.2% zu 22.6% und 11.0% zu 10.5%). Hingegen weist der Vergleich der FRET-Effizienzen von Ezrin T567D für den doppelt und einfach markierten Fall deutliche Unterschiede bei Betrachtung der Rezeptorlipide auf (bezogen auf den Median: 28.5% zu 23.0% und 12.8% zu 9.4%). Bei Bindung der Ezrin T567D-Konstrukte an PIP₂-haltige Lipidmembranen werden kleinere FRET-Effizienzen im Vergleich zu DOGS-Ni-NTA-haltigen Lipidmembran detektiert. Die Analyse der statistischen Signifikanz der Ergebnisse mittels eines ungepaarten, nicht-parametrischen MANN-WHITNEY-*U*-Test bestätigt signifikante Unterschiede nur im Fall von Ezrin T567D, nicht aber von Ezrin wt.

Hieraus lässt sich schließen, dass die räumliche Nähe von N- und C-Terminus der Ezrin T567D-Konstrukte durch die Bindung an PIP₂ beeinflusst wird. Dies legt eine veränderte Konformation im Vergleich zur Bindung an DOGS-Ni-NTA-haltige SLBs nahe. Da dies für Ezrin wt nicht beobachtet werden konnte zeigt sich wiederum die Bedeutung der (Pseudo-)Phosphorylierung Ezrins als wichtiger Aktivierungsfaktor, welche im Zusammenspiel mit der Bindung des Proteins an PIP₂ zu einer Veränderung des FRET-Signals führt und eine Konformationsänderung von Ezrin nahe legt.

4.5 Diskussion

4.5.1 Einfluss von Ionenstärke und pH-Wert auf die Verteilung von PIP₂-Molekülen in Lipidmembranen

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) ist mit einem Anteil von ungefähr 1% aller Phospholipide der Plasmamembran der Zelle das am häufigsten vertretene Polyphosphoinositid (PPI).³¹ *In vitro* bindet PIP₂ an bis zu 280 intrazelluläre Proteine, *in vivo* hingegen bindet PIP₂ räumlich und zeitlich reguliert hoch selektiv an spezifische Proteine.^{174,175} Eine Hypothese, die diese hohe Selektivität der PIP₂-Bindung in der Zelle erklären soll, basiert auf der Annahme, dass lokale PIP₂-Anreicherungen oder -Cluster in der Membran bestehen.^{176,177} Diese Verteilung beinhaltet Mechanismen wie Wasserstoffbrücken-Netzwerke zwischen Lipidkopfgruppen,¹⁷⁸ Stabilisierung durch cholesterinreiche Domänen,¹⁷⁹ lokale Produktion anderer PPIs,¹⁸⁰ elektrostatische Komplexbildung und Protein-Zaun-Modelle.^{181,182} Unter der elektrostatischen Komplexbildung sind Protein-PIP₂-Interaktionen zu verstehen, welche durch polybasische Domänen im

Protein vermittelt werden.¹⁸³ Beispielhaft soll die polybasische Effektdomäne des Proteins MARCKS (engl. Myristoylated, alanine-rich C-kinase substrate) erwähnt werden, welche in der Lage ist PIP₂ zu clustern.^{31,184} Darüber hinaus sind auch Interaktionen zwischen PIP₂ und physiologisch relevanten Kationen denkbar, welche PIP₂-reiche Regionen in der Plasmamembran medieren und stabilisieren könnten.¹⁷⁵

Hieran anknüpfend sollen die im Rahmen dieses Kapitels erzielten Ergebnisse verstanden werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine heterogene PIP₂-Verteilung in artifiziellen Lipidmembranen durch den Einsatz divalenter beziehungsweise monovalenter Kationen als Spreitadditiv induziert werden kann und in einer verminderten beziehungsweise nicht vorhandenen Ezrinbindefähigkeit resultierte. Diese Heterogenitäten können als lokale PIP₂-Anreicherungen oder als -Cluster verstanden werden, welche die Proteinbindung einschränkt beziehungsweise verhindert.

Einfluss von divalenten Kationen auf die Verteilung von PIP₂-Molekülen

In Gegenwart von divalenten Kationen wurden nicht-planare Lipidmembranen, mit überschüssigem Lipidmaterial/Vesikeln, und einer heterogenen PIP₂-Verteilung ausgebildet. Die Ezrinbindefähigkeit war in diesem Fall kaum vorhanden und lässt sich auf die heterogene PIP₂-Verteilung zurückführen. Auch in der Literatur finden sich Belege für das Vermögen zweiwertiger Kationen PIP₂ zu clustern.

WANG *et al.* zeigten in fluoreszenz- und rasterkraftmikroskopischen Studien an festkörperunterstützten Lipidmonoschichten, dass die Zugabe von Ca²⁺-Ionen zu einer inhomogenen PIP₂-Verteilung aufgrund von Phasenseparation führte. Darüber hinaus konnten sie in TEM (Transmissionselektronenmikroskopie)-Studien Ca²⁺-induzierte PIP₂-Cluster mit Radiusgrößen von 40±11 nm bestimmen. Des Weiteren verglichen sie den Einfluss von Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen auf die PIP₂-Clusterausbildung und stellten einen deutlich schwächeren Einfluss der Magnesiumionen fest. Dieses begründeten WANG *et al.* in den unterschiedlichen Dehydratationsenthalpien.¹⁷⁵

LEVENTAL *et al.* beobachteten, dass die laterale Organisation von PIP₂ sensitiv auf kleinste Änderungen der Ca²⁺-Konzentration reagiert. In einer Kombination aus LANGMUIR-Filmwaage- und Epifluoreszenzexperimenten konnten sie die Entstehung Ca²⁺-induzierter PIP₂-reicher Domänen detektieren. Auch diese Studien bestätigten, dass Ca²⁺-Ionen eine deutlich stärkere Affinität zu PIP₂ im Vergleich zu Mg²⁺-Ionen aufweisen.¹⁸⁵

GRABER *et al.* beleuchteten den Einfluss von Calcium- und Magnesiumionen auf die Ionisierung von PIP₂ mit Hilfe von Festkörper-MAS (engl. *magic-angle-spinning*) ³¹P-NMR.

Beide Ionen führten zu einer Tieffeldverschiebung der Phosphomonoester-Signale und somit einer Erhöhung der negativen Ladung aus PIP₂, wobei Ca²⁺ einen deutlich ausgeprägteren Effekt besaß. Auf Grundlage ihrer Resultate zur Ionisierung von PIP₂ interpretierten sie das unterschiedliche PIP₂-Clusterverhalten der Kationen mit Hilfe unterschiedlicher Dehydratationsenergien. Aus energetischen Gründen binden Magnesiumionen mit größerem Abstand an PIP₂-Lipide und vermindern so die elektrostatische clusterformende Interaktion.¹⁸⁶

Neben Studien an planaren Lipidmembranen finden sich auch Studien an unilamellaren PIP₂-haltigen Vesikeln, welche eine Phasenseparation nach Ca²⁺/Mg²⁺-Zugabe beschrieben.^{175,187,188} CARVALHO *et al.* beobachteten ein Clustern von fluoreszenzmarkierten PIP₂-Molekülen in riesigen, unilamellaren Vesikeln (engl. *giant unilamellar vesicles*, GUVs) bei Zugabe geringer Konzentrationen an Calcium- beziehungsweise Magnesiumionen ($c = 90 \mu\text{M}$) in die umgebene Lösung. Dieses Clustern wurde anhand lokaler Fluoreszenzintensitätszunahmen detektiert und war weder mit einer Verformung der GUVs noch einer Aggregation der Lipidmembran verbunden.¹⁸⁷ Die Heterogenität der PIP₂-Fluoreszenzintensität nahm mit steigenden Kationenkonzentrationen zu, wobei der Einfluss der Calciumionen ausgeprägter war.

SARMENTO *et al.* analysierten unter Berücksichtigung physiologischer Konzentrationen (bezüglich PIP₂ und Ca²⁺) die Ca²⁺-abhängige Ausbildung von PIP₂-Clustern in großen unilamellaren Vesikeln (engl. *large unilamellar vesicles*, LUVs). Auch hier konnte ein ausgeprägteres Clustern in phasenseparierten Membranen beobachtet werden, wobei PIP₂-Oligomere bevorzugt in der flüssig-geordneten Phase (engl. *liquid-ordered phase*, l_o) lokalisiert waren.

In den meisten oben genannten Studien konnten die durch Ca²⁺- oder Mg²⁺-Ionen ausgebildeten PIP₂-Cluster durch den Einsatz von Chelatoren wie EDTA aufgelöst werden. Eine Reversibilität der Clusterbildung konnte hingegen in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Auch nach dem Einsatz von EDTA lag weiterhin eine stark verminderte Ezrinbindefähigkeit der PIP₂-haltigen Lipidmembranen vor. Hieraus lässt sich ableiten, dass im vorliegenden System gebildete PIP₂-Cluster sehr stabil sind.

Hier schließt sich die Frage an, wie effizient EDTA Calcium- beziehungsweise Magnesiumionen gegenüber PIP₂ binden kann. EDTA komplexiert sowohl Calcium- als auch Magnesiumionen mit sehr hoher Affinität, welche sich in kleinen Dissoziationskonstanten widerspiegeln: $K_{D,\text{Ca}^{2+}-\text{EDTA}} = 10 \text{ pM}$ und $K_{D,\text{Mg}^{2+}-\text{EDTA}} = 1 \text{ nM}$.¹⁸⁹ WANG *et al.* bestimmten Dissoziationskonstanten für Ca²⁺- und Mg²⁺-PIP₂-Komplexe mit

$K_{D, Ca^{2+}-PIP_2} = 4.6 \mu M$ und $K_{D, Mg^{2+}-PIP_2} = 7.7 \mu M$, welche eine deutlich geringere Affinität aufweisen. Somit ist gesichert, dass sowohl Ca^{2+} - als auch Mg^{2+} -Ionen durch Zugabe von EDTA nicht mehr mit PIP_2 wechselwirken sollten. Trotz allem bleibt offen, warum die Ezrinbindefähigkeit durch PIP_2 nach Komplexierung der divalenten Kationen mit EDTA nicht wieder hergestellt werden konnte. Hieraus ergibt sich für das vorliegende System nur eine mögliche Erklärung: die PIP_2 -Cluster bleiben auch nach Entfernung der zweiwertigen Kationen stabil. Dies wird gestützt durch die Tatsache, dass PIP_2 -Moleküle untereinander Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, welche vorliegende Strukturen stabilisieren können.^{190, 191} Hierauf wird im Verlauf detaillierter eingegangen.

Einfluss von monovalenten Kationen auf die Verteilung von PIP_2 -Molekülen

Neben dem Vermögen von Calcium- und Magnesiumionen PIP_2 -Moleküle zu clustern, konnte auch bei der Verwendung monovalenter Kationen als Spreitadditiv, eine heterogene PIP_2 -Verteilung, resultierend in einer verminderten Ezrinbindefähigkeit, in der ausgebildeten festkörperunterstützten Lipidmembran beobachtet werden. Diese, durch monovalente Kationen induzierte, heterogene Verteilung der PIP_2 -Moleküle in der Lipidmembran führte zu einer reduzierten lateralen Mobilität der Lipide. Im Gegensatz zu zweiwertigen Kationen sind einwertige Kationen nicht in der Lage PIP_2 -Lipide über die Kopfgruppen zu verbrücken und demnach zu clustern. Der beobachteten heterogenen Verteilung und somit der lokalen Anreicherung an PIP_2 sowie der reduzierten Mobilität der Lipide durch Gegenwart monovalenter Kationen, wie Na^+ , muss ein anderer Mechanismus zugrunde liegen.

Diesen Aspekt untersuchten HELM *et al.* an negativ geladenen Monoschichten mit Hilfe thermodynamischer, optischer und numerischer Methoden. Sie beobachteten einen nicht-monotonen Zusammenhang zwischen Oberflächendruck und Ionenstärke. Ab einer Konzentration von 0.1 M NaCl in der Subphase detektierten sie einen Abfall des Oberflächendrucks. Konzentrationen unterhalb von 0.1 M zeigten den umgekehrten Effekt, eine Expansion des Lipidfilms und somit einen Anstieg des gemessenen Oberflächendrucks. Somit postulierten die Autoren eine Grenzkonzentration an monovalenten Kationen für negativ geladene Monoschichten, ab welcher die Abschirmung der Ladungen dominiert und eine Kondensation der Monoschicht möglich wird.¹⁹²

Ähnliche Resultate erzielten PANDIT und BERKOWITZ in Molekulardynamik-Simulationen an Dipalmitoylphosphatidylserin Doppelschichten. Sie zeigten, dass Na^+ -Ionen die Ladung der Serin-Kopfgruppe abschirmen und Wasserstoffbrückenbin-

dungen zu einer Reduktion der Kopfgruppenfläche führen. Des Weiteren stellten sie fest, dass die Natriumionen bevorzugt an den Sauerstoff der Carboxylgruppe des Serins binden.¹⁹³

HIRAI *et al.* untersuchten den Einfluss von mono- und divalenten Kationen auf das Phasenverhalten von PIP₂ mit Hilfe von Kleinwinkel-Röntgenstreuungsexperimenten. Hierbei detektierten sie einen starken Einfluss von Calciumionen und einen geringeren Einfluss von Magnesiumionen auf die Struktur ausgebildeter PIP₂-Aggregate. Die Autoren schlossen auf einen durch divalente Kationen induzierten Phasenübergang von gestreckten PIP₂-Mizellen zu ungeordneten Lamellen und konnten hingegen keinen Einfluss von Natriumionen auf die PIP₂-Aggregate beobachten. Hieraus schlossen sie, dass die gebildeten Aggregate nicht einer Abschirmung der Ladungen geschuldet sind, sondern der Verbrückung durch die zweiwertigen Kationen.¹⁹⁴

Im Gegensatz hierzu beobachteten LEVENTAL *et al.* in Filmwaageexperimenten an reinen PIP₂-Monoschichten eine Zunahme des Oberflächendrucks bei Zugabe von monovalentem Salz ($c_{\text{NaCl}} = 250 \text{ mM}$). Dies entspricht einer Expansion des Lipidfilms und so erschien den Autoren die Annahme einer rein elektrostatischen Interaktionen zwischen Na⁺ und PIP₂ als unwahrscheinlich. Sie würden in diesem Fall erwarten, dass die Natriumionen die negativen Ladungen der PIP₂-Kopfgruppe abschirmen und so eine dichtere Packung ermöglichen.¹³⁹

Eine reine elektrostatische Interaktion zwischen Na⁺ und dem negativ geladenem Lipid wurden durch weitere Experimente an Lipidmonoschichten, welche anstelle von PIP₂ aus Phosphatidylserin aufgebaut waren, ausgeschlossen. Bei Verwendung des einfach negativ geladenen Phosphatidylserins konnte keine Expansion des Lipidfilms nach Zugabe von NaCl in die Subphase beobachtet werden.

Hierzu sei anzumerken, dass eine weitere mögliche Erklärung in den Beobachtungen von HELM *et al.* zu finden ist.¹⁹² Bei Annahme einer Grenzkonzentration für monovalente Kationen, ab welcher eine Abschirmung der negativen Ladungen von Lipidmembranen möglich wird, könnte diese unter den Versuchsbedingungen von LEVENTAL *et al.*, unter Berücksichtigung der negativen Ladung von PIP₂ bei physiologischem pH-Wert von -4 , noch nicht erreicht worden sein.^{31,32} Im Fall des einfach geladenen Phosphatidylserins hingegen schon und könnte somit die Unterschiede bezüglich der Expansion beziehungsweise Kondensation der Lipidmonoschichten durch Na⁺-Ionen erklären.

Die Autoren erklären die Expansion der PIP₂-Lipidmonoschicht allerdings durch eine

Störung des Wasserstoffbrückennetzwerkes durch monovalente Kationen.¹³⁹ Somit würde man in Gegenwart von Natriumionen eine eher homogene Verteilung der PIP₂-Moleküle erwarten. Dies steht im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen und kann auf den oben genannten Aspekt der Konzentrationsabhängigkeit oder aber die unterschiedlichen Modellsysteme zurückgeführt werden. Hier wurde nicht mit einer reinen PIP₂-Lipidmonoschicht gearbeitet, sondern mit einer Lipiddoppelschicht und einem molaren Anteil von 8 mol% PIP₂ und die Zugabe der monovalenten Kationen erfolgte während des Spreitvorgangs und nicht anschließend.

Abschließend lässt sich feststellen, dass in der Literatur bis dato keine Hinweise auf eine durch monovalente Kationen induzierte heterogene Verteilung von PIP₂-Lipiden in Membranen zu finden sind. Indirekt lässt sich dies durch die oben aufgeführten Ergebnisse des Einflusses von Natriumionen auf negativ geladene Lipidschichten ableiten. So führt der abschirmende Effekt von Natriumionen auf negativ geladene Lipide zu einer dichteren Packung und im Zusammenspiel mit Wasserstoffbrückenbindungen wird eine heterogene PIP₂-Verteilung stabilisiert, welche die laterale Mobilität der Lipide eingeschränkt und die Ezrinbindefähigkeit der Lipidmembran herabsetzt.

Einfluss des pH-Wertes auf die Verteilung von PIP₂-Molekülen

Die Reduktion des pH-Wertes während der Ausbildung von PIP₂-haltigen Lipidmembranen resultierte in der Ausbildung planarer Lipidmembranen mit einer homogenen Verteilung der PIP₂-Moleküle. Hieran schließt sich die Frage an, inwiefern der pH-Wert Einfluss auf die Verteilung von PIP₂-Molekülen nimmt.

REDFERN *et al.* untersuchten die Ausbildung von PIP₂-Domänen in POPC/PIP₂-Vesikeln mit unterschiedlichen biophysikalischen Methoden in Abhängigkeit des pH-Wertes. Sie beobachteten eine gesteigerte Domänenausbildung ab pH-Werten > pK_{a2} (pH > 6.7-7.7).¹⁹⁵ Hieraus deuteten sie, dass die deprotonierten 4- und 5-Phosphomonoestergruppen als Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren fungieren.

Bestätigt wurde dies auch durch Molekulardynamik-Simulationen von Liepiņa *et al.*, welche eine Stabilisierung gebildeter PIP₂-Cluster in Phosphatidylcholin-Lipidmembranen durch Wasserstoffbrückenbindungen zeigten.¹⁹⁰

Trotz Erwartung einer eher repulsiven Wechselwirkung durch die Deprotonierung scheinen attraktive Wechselwirkungen zwischen Hydroxyl-/Phosphomonoestergruppe, Hydroxyl-/Phosphodiestergruppe und Hydroxyl-/Hydroxylgruppe die repulsiven Wechselwirkungen zu kompensieren. Interessanterweise konnten sie einen Verlust von

Wasserstoffbrückenakzeptoren mit niedrigem pH-Wert feststellen, was zu einer homogenen PIP₂-Verteilung führte.¹⁹¹

Im Gegensatz hierzu detektierten FERNANDES *et al.* in einem pH-Wertbereich von 4.8-8.4 mittels Fluoreszenz- und FRET (FÖRSTER Resonanzenergietransfer)-Messungen keine Clusterbildung in POPC/PIP₂-Vesikeln. Diese Diskrepanz begründen die Autoren in der Verwendung eines kurzkettigen PIP₂-Derivats in der Studie von REDFERN *et al.* Sie gehen davon aus, dass die kurzen Fettsäureketten die Inkorporation in die Lipidmembran erschweren und sich somit ein signifikanter Anteil des Lipids in Lösung befindet. Die gemessenen Unterschiede würden demnach in schwankenden Lipid/Wasser-Verteilungskoeffizienten und nicht in einer PIP₂-Clusterbildung begründet liegen.³²

Insgesamt wird deutlich, dass die PIP₂-Verteilung in Lipidmembranen über Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Repulsion bestimmt wird. Hieraus lässt sich der große Einfluss sowohl von pH-Wert als auch von Kationen ableiten. Bei der Ausbildung planarer Lipidmembranen auf Silica-Substraten unter Niedrig-pH-Bedingungen resultierte eine hohe Ezrinbindekapazität, was eine homogene PIP₂-Verteilung impliziert. Gestützt wird dies durch die oben beschriebenen Studien sowohl von REDFERN als auch von FERNANDES *et al.*^{32,191} Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und PIP₂-Clustern sind bei einem pH-Wert von 7.4 in Gegenwart von Kationen wahrscheinlich, wohingegen eine homogenere PIP₂-Verteilung in Abwesenheit von Kationen bei pH 4.8 zu erwarten ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bezüglich des Einflusses von mono- und divalenten Kationen und des vorherrschenden pH-Wertes auf die PIP₂-Verteilung in artifiziellen Lipidmembranen kann richtungsweisend für das Verständnis der lateralen Verteilung von PIP₂-Lipiden in der Plasmamembran der Zelle sein. So könnten lokale pH-Wertänderungen, Ca²⁺-Ionen oder auch andere Faktoren, die die Elektrostatik von PIP₂-Molekülen beeinflussen, die PIP₂-Verteilung verändern und somit PIP₂-Protein-Interaktionen beeinflussen. Im vorliegenden Fall wurde durch eine heterogene PIP₂-Verteilung die Interaktion zwischen dem Membran-Zytoskelett-Linkerprotein Ezrin drastisch vermindert beziehungsweise verhindert.

4.5.2 Bindung von Ezrin an festkörperunterstützte Lipidmembranen

Die Untersuchung und Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Ezrin wt, Ezrin T567D und Ezrin T567A an festkörperunterstützte Lipidmembranen erfolgte mittels reflektometrischer Interferenzspektroskopie. Diese Methode ermöglicht es Adsorptionsprozesse von Proteinen an Grenzflächen sensitiv und zeitaufgelöst beobachten zu können.^{69,196} Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass keine Markierung notwendig ist und somit der zeitliche Aufwand und die Kosten gering gehalten werden können. Des Weiteren werden durch Proteinmarkierung entstehende Probleme, wie der Beeinflussung der Bioaktivität und auftretendes Photobleichen, umgangen.^{197,198} Im Gegensatz zu vielen anderen oberflächensensitiven Methoden ist RIfS eine Technik, die nahezu temperaturunabhängig arbeitet. Die Temperaturabhängigkeit des Messwerts von RIfS liegt verglichen mit refraktometrischen Methoden in einem Bereich von weniger als 5%. Dies ist dadurch zu erklären, dass einerseits eine Volumenzunahme der Interferenzschicht, hervorgerufen durch steigende Temperaturen, die physikalische Schichtdicke erhöht. Andererseits wirkt diesem Phänomen entgegen, dass der Brechungsindex, welcher von der Anzahl an polarisierbaren Molekülen abhängt, durch die vorliegende Volumen- aber nicht Stoffmengenunahme abnimmt. Somit kompensieren sich diese zwei Effekte, so dass der Einfluss der Temperatur auf die optische Schichtdicke vernachlässigbar klein ist.⁶⁸

Im Rahmen der durchgeführten Ezrinbindungsstudien an DOGS-Ni-NTA- und PIP₂-haltigen festkörperunterstützten Lipidmembranen mit einem Rezeptorlipidanteil von 8 mol% mittels RIfS konnte ein großer Anteil an irreversibel gebundenem Protein detektiert werden (95% für DOGS-Ni-NTA/Ezrin und 83% für PIP₂/Ezrin).

Eine Möglichkeit, welche die Ausbildung einer irreversiblen Bindung erklären könnte, besteht darin, dass das Protein über mehrere Rezeptorlipide an die Lipidmembran gebunden wird.

Bezogen auf die DOGS-Ni-NTA-Ezrinbindung ist die Ausbildung multipler Bindungen bekannt und auf das Vorliegen der hohen Rezeptorlipiddichte zurückzuführen. Denn die individuelle Bindung der Histidin-Seitenkette ist reversibel mit einer Dissoziationskonstante im mikromolaren Bereich.^{199,200} LATA *et al.* konnten beweisen, dass ein His-Tag über mehr als eine Seitenkette bei hoher Rezeptorlipiddichte komplexiert wird. Dies führt demnach zu multiplen Bindungen des His-Tags an die Chelatormoleküle. Während eine einzelne Bindung reversibel ist, führt ein schnelles Neu-Binden zu einer effektiven irreversiblen Bindung und damit zu dem beobachteten Effekt.²⁰¹

Im Fall der PIP₂/Ezrinbindung stellt sich die Frage, ob Ezrin theoretisch in der Lage ist mehrere PIP₂-Moleküle zu binden. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Ezrin an PIP₂ über eine Wechselwirkung spezifischer Lysinreste mediiert wird, welche in den Subdomänen I und III im N-Terminus des Proteins lokalisiert sind.²⁰² NIGGLI postulierte anhand von atomaren Modellen, dass aufgrund mehrerer spezifischer PIP₂-Bindungsstellen diese bei der PIP₂-Bindung kooperieren und Ezrin demnach an mehrere PIP₂-Moleküle binden kann.²⁰³ KUMAR *et al.* führten eine Sequenzanalyse durch, welche fünf mögliche PIP₂-Bindungsstellen für Ezrin ergab. Diese Bindungsstellen konnten durch gezielte Mutationen für das strukturverwandte Protein Villin auf ihre PIP₂-Spezifität untersucht werden. Es stellte sich heraus, dass drei der fünf Domänen tatsächlich spezifisch PIP₂ binden können.²⁰⁴

Somit könnte hier ähnlich zu DOGS-Ni-NTA die einzelne PIP₂/Ezrinbindung reversibel sein, aber aufgrund der Möglichkeit einer multiplen Bindungsausbildung Ezrins, bei hoher Rezeptorlipiddichte, ein eher irreversibler Bindungscharakter resultieren.

Darüber hinaus kann die hohe Irreversibilität der Bindung zwischen PIP₂ und Ezrin in lateralen Protein-Protein-Interaktionen begründet sein. HERRIG *et al.* machten ähnliche Beobachtungen an PIP₂-haltigen festkörperunterstützten Lipidmembranen in QCM-Experimenten und konnten daraufhin in rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen nachweisen, dass die Bindung von Ezrin wt an POPC/PIP₂-SLBs durch Spülen mit Puffer nur zu einer geringfügigen Desorption des Proteins führte.²⁰⁵ Darüber hinaus beobachteten sie ein "Keimwachstum" der Proteinbindung an SLBs. Sie leiteten von diesen Beobachtungen ein positiv kooperatives Verhalten der Ezrinbindung ab. Die laterale Interaktion der Ezrinmoleküle führt somit zu einem quasi-irreversiblen Bindungsverhalten des Proteins.

Übereinstimmend mit *in vivo* Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass Ezrin an der Plasmamembran gebunden in oligomerisierter Form vorliegen kann, beobachteten CARVALHO *et al.* *in vitro* PIP₂-Ezrin-Cluster an der Lipidmembranoberfläche von riesigen unilamellaren Vesikeln (GUVs),^{206,207} die sie als Ergebnis lateraler Protein-Protein-Wechselwirkungen interpretierten.¹⁸⁷

Abschließend sei anzumerken, dass die Beschreibung der Adsorptionsisothermen über die LANGMUIR-Gleichung eine vollständige Reversibilität des Bindungsprozesses voraussetzt, welche in den vorliegenden Messungen nicht beobachtet werden konnte. Aus dem selben Grund verknüpften BOSK *et al.* die *scaled particle* Theorie (SPT),

welche die laterale Ausdehnung der adsorbierten Moleküle berücksichtigt, mit der LANGMUIR-Funktion.^{208,209} Um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu berücksichtigen wurde eine weitere Näherung nach BRAGG und WILLAMS einbezogen.^{30,210} Da im Rahmen dieser Arbeit das positive kooperative Verhalten von Ezrin nicht im Fokus stand, wurde eine LANGMUIR-Anpassung an die Datenpunkte vorgenommen. Hieraus wurden näherungsweise Bindungsaffinitäten abgeleitet und die maximale optische Schichtdickenänderung bestimmt.

Die maximale optische Schichtdickenänderung $\Delta OT_{\max}$ der Ezrinbindung an festkörperunterstützte Lipidmembranen ergibt sich durch Anpassung der LANGMUIR-Funktion, in Form einer Extrapolation der optischen Schichtdicke bei der die Proteinkonzentration gegen unendlich strebt. Die Ergebnisse für die maximale ΔOT bei der Bindung von Ezrin wt, Ezrin T567D und Ezrin T567A an DOGS-Ni-NTA- beziehungsweise PIP₂-haltige SLBs sind in Abbildung 4.13 dargestellt. Aus der optischen Schichtdickenänderung ($OT = n \cdot d$) lässt sich unter Berücksichtigung des Brechungsindex für eine Proteinschicht mit $n = 1.46$ die physikalische Schichtdicke d berechnen (vgl. Abb. 4.36).⁷⁸

Abbildung 4.36: Zusammengefasste Ergebnisse nach Anpassung einer LANGMUIR-Funktion an die Datenpunkte. Dargestellt sind die ermittelten maximalen physikalischen Schichtdicken durch Anbindung von Ezrin wt (grau), Ezrin T567D (rot) und Ezrin T567A (blau) an festkörperunterstützte DOGS-Ni-NTA- (quergestreift) beziehungsweise PIP₂-haltige (längsgestreift) Lipidmembranen.

Die $d_{\max}$ -Werte der Ezrinproteine liegen mit 5.4-5.8 nm an DOGS-Ni-NTA-haltigen beziehungsweise 4.5-5.8 nm an PIP₂-haltigen SLBs in ähnlicher Größenordnung und wei-

sen keine signifikanten Unterschiede auf. Auf Grundlage der ermittelten physikalischen Schichtdicken sollen die Ergebnisse nun weitergehend diskutiert werden. Da die vollständige Kristallstruktur des ERM-Proteins Ezrin bisher nicht gelöst wurde, werden die Ergebnisse mit der Kristallstruktur des ERM-Proteins Moesin verglichen. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie wird eine hohe Strukturanalogie vermutet. Je nach Orientierung weist Moesin Ausmaße im Bereich von 2.6-6.6 nm auf.²¹¹

Trotz der fehlenden Kristallstruktur Ezrins finden sich Informationen zu der Größe Ezrins in der Literatur. CARVALHO *et al.* fanden einen hydrodynamischen Durchmesser (STOKES-Durchmesser) von $D_H = 8.0 \pm 0.2$ nm für Ezrin wt in Lösung.²¹² JAYASUNDAR *et al.* ermittelten mittels Elektronen- und Neutronenbeugung sowie statistischer Lichtstreuung einen Trägheits-/Gyrationsradius $r_g = 4.1$ nm für Ezrin wt und Ezrin T567D in Lösung. Gebunden an PIP₂ veränderten sich die Radii auf $r_g = 6.7$ nm (Ezrin wt) beziehungsweise $r_g = 6.8$ nm (Ezrin T567D).²¹³ Weiterhin wurden von CHAMBERS *et al.* Gel-filtrationsstudien mit Ezrin wt durchgeführt, die zwei Spezies mit STOKES-Radien von 4.1 nm und 7.4 nm zeigten. Der größere Radius wurde einem Ezrindimer zugeordnet.¹⁴⁶ Fasst man die Ergebnisse der unterschiedlichen Studien zusammen, so lässt sich ableiten, dass Ezrin in Lösung einen Durchmesser von ungefähr 8 nm besitzt. Der Gyrationsradius Ezrins liegt im Bereich von 4 nm, jedoch muss beachtet werden, dass dieser Wert die Rotation um den Schwerpunkt eines Moleküls beschreibt und dies nicht mit dem Mittelpunkt der Sphäre übereinstimmen muss.

Allerdings gilt es bei dem Vergleich der mittels RfS detektierten Schichtdicken zu beachten, dass hier eine Mittelung der Werte vorliegt. Das heißt, die physikalische Schichtdicke setzt sich zusammen aus Protein-belegten und Protein-freien Bereichen der Lipidmembran. Eine maximale Oberflächenbelegung ist nicht mit einer hundertprozentigen Proteinbelegung gleichzusetzen. HERRIG *et al.* bestimmten mittels Rasterkraftmikroskopie die maximale Oberflächenbelegung mit Ezrin wt an POPC/PIP₂-Lipidmembranen (90:10) auf ungefähr 70%.²⁰⁵ Demnach müssten die $\Delta OT_{\max}$ -Werte um circa 30% zu niedrig bestimmt worden sein.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte bezüglich der physikalischen Schichtdicke einer Ezrin-Proteinschicht an SLBs von 4.5-5.8 nm in ähnlicher Größenordnung zueinander und den Abmessungen von Moesin beziehungsweise Ezrin in Lösung liegen. Darüber hinaus lässt sich ableiten, dass die mittels RfS detektierte maximale OT einer Proteinmonoschicht entspricht.

Des Weiteren wurde anhand der durchgeführten Bindungsstudien die Bindungsaffinität zwischen Ezrin und dem Rezeptorlipid ermittelt. Hierbei ergaben sich Dissoziationskonstanten im Bereich von 37-168 nM (vgl. Tab. 4.2) die eine hohe Affinität der Proteine zu beiden Rezeptorlipiden widerspiegeln.

Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von S. BOSK aus Quarzmikrowaagestudien der Bindung von Ezrin an festkörperunterstützte Lipidmembranen mit jeweils 10 mol% Rezeptorlipid (DOGS-Ni-NTA bzw. PIP₂).³⁰ Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 4.8 gezeigt:

Tabelle 4.8: Ergebnisse der Dissoziationskonstanten K_D der Bindung der Proteine Ezrin wt, Ezrin T567D und Ezrin T567A an POPC/PIP₂- und DOPC/DOGS-Ni-NTA-haltige Lipidmembranen aus RfS- (diese Arbeit) und QCM-Messungen (BOSK) nach LANGMUIR-Anpassung. Der molare Anteil der Rezeptorlipide betrug bei den RfS-Messungen 8 mol% und bei den QCM-Messungen 10 mol%.

Rezeptorlipid	Protein	$K_{D,RfS}$ [nM]	$K_{D,QCM}$ [nM] ³⁰
DOGS-Ni-NTA	Ezrin wt	168±36	12±2
DOGS-Ni-NTA	Ezrin T567D	70±17	17±4
DOGS-Ni-NTA	Ezrin T567A	42±13	31±4
PIP ₂	Ezrin wt	71±11	32±6
PIP ₂	Ezrin T567D	37±6	17±2
PIP ₂	Ezrin T567A	62±18	31±3

Die Messungen zeigen, wie in der vorliegenden Arbeit, eine niedrige Dissoziationskonstante für die Bindung von Ezrin T567D an POPC/PIP₂-haltige Lipidmembranen (17 nM) im Vergleich zu Ezrin wt (32 nM) und Ezrin T567A (31 nM).³⁰ Der direkte Vergleich der aus der LANGMUIR-Anpassung ermittelten Dissoziationskonstanten zeigt eine ähnliche Größenordnung. Allerdings liegen die Werte aus den RfS-Experimenten generell etwas über denen aus den QCM-Experimenten.

Aufgrund der ähnlichen Lipidmembransysteme, welche sich aber um 2 mol% in ihrem Rezeptorlipidgehalt unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass die Dissoziationskonstante auch von diesem abhängt. Dies erscheint wahrscheinlich, denn durch einen erhöhten Rezeptorlipidgehalt steigt auch die Wahrscheinlichkeit der Neu-Bindung des Proteins (engl. *re-binding*) nach Desorption und dies kann sich in einer kleineren Dissoziationskonstante widerspiegeln. Dieses Phänomen ist literaturbekannt und konnte zum Beispiel anhand der PIP₂-bindenden N-terminale Epsin-Domäne (engl. *epsin N-terminal homology* (ENTH) domain) gezeigt werden.²¹⁴ In SPR-Studien an Lipidmonoschichten fanden sich Dissoziationskonstanten von ENTH/PIP₂, welche in Abhängigkeit des

Rezeptorlipidgehalts (3.0 mol% und 0.5 mol%) um einen Faktor zehn variierten (23 nM bzw. 250 nM).²¹⁵

Darüber hinaus finden sich weitere K_D -Werte für die Bindung von Ezrin an PIP₂ in der Literatur, welche sich zum Teil stark von denen im Rahmen dieser Arbeit ermittelten unterscheiden.

BLIN *et al.* untersuchten die Bindung von Ezrin wt an großen, unilamellaren Vesikel (LUVs) mit einem molaren Anteil von 5 mol% PIP₂ in Kosedimentations- und fluoreszenzkorrelationsspektroskopischen Experimenten. Sie ermittelten Dissoziationskonstanten von $K_D = 5.9 \pm 0.7 \mu\text{M}$ beziehungsweise $K_D = 6.2 \pm 0.8 \mu\text{M}$.²¹⁶ CARVALHO *et al.* fanden für die Bindung von Ezrin an submizellares PIP₂ in Lösung Dissoziationskonstanten von $K_D = 0.4\text{--}0.6 \mu\text{M}$.²¹² Dies sind um einen Faktor zehn kleinere Werte im Vergleich zu BLIN *et al.* und um einen Faktor zehn größere Werte im Vergleich zur vorliegenden Arbeit.

Hingegen wurde von JAYASUNDAR *et al.* die Bindung einer isolierten N-terminalen FERM-Domäne (N-ERMAD) von Ezrin an PIP₂-funktionalisierten Chips mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) untersucht und ein K_D -Wert in gleicher Größenordnung im Vergleich zu dieser Arbeit von 77 nM ermittelt.

Aus den beschriebenen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Bindungsaffinität von Ezrin an PIP₂ stark von der Art des untersuchten Lipidmembransystems abhängt. Unterschiede zwischen den Resultaten aus Bindungsstudien an LUVs und SLBs kann der starken Krümmung von LUVs zugeschrieben werden. Diese könnte mögliche laterale Wechselwirkungen unter Ezrinmolekülen verhindern, welche im Fall der planaren SLBs möglich sind. Auch ein Einfluss der PIP₂-Form ist wahrscheinlich, in der Zelle ist PIP₂ weder gelöst noch mizellar zu finden.²¹⁷

Die Charakterisierung der Bindungsaffinitäten und der Proteinhöhe von Ezrin wt, Ezrin T567D und Ezrin T567A an DOGS-Ni-NTA- und PIP₂-haltigen festkörperunterstützten Lipidmembranen mit einem Rezeptorlipidgehalt von 8 mol% zeigen, dass sowohl die Bindungsaffinitäten und als auch die Proteinhöhen ähnlich groß sind. Im Vergleich zu literaturbekannten Dissoziationskonstanten ähnlicher planarer Modellsysteme zeigen die Werte eine große Übereinstimmung. Die ermittelte Proteinhöhe entspricht einer Monoschicht.

4.5.3 Zusammenhang bezüglich der Organisation von Ezrin an Lipidmembranen und der konformationsregulierten Aktivierung

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Organisation von Ezrin an festkörperunterstützten Lipidmembranen und der konformationsregulierten Aktivierung des Proteins wurde die Bindung Ezrins an SLBs mittels reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIfS), Rasterkraftmikroskopie (AFM), abgeschwächter Totalreflexions-FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie (ATR-FTIR-Spektroskopie) und Fluoreszenzmikroskopie charakterisiert. Die Ergebnisse ließen bei abschließender Betrachtung den Schluss zu, dass eine vollständige Aktivierung des Proteins eine Kombination aus (Pseudo-)Phosphorylierung und PIP₂-Bindung erfordert und in einem Konformationswechsel resultiert, welcher keine Änderung in der Sekundärstruktur von Ezrin mit sich bringt.

Die Ergebnisse reihen sich in die kontroverse Diskussion bezüglich der Aktivierung der ERM-Proteine ein. Die zwei zur Aktivierung beitragenden Faktoren, Phosphorylierung und PIP₂-Bindung sind allgemein anerkannt.^{202,218} Beide Faktoren beeinflussen den Wechsel von einer geschlossenen, selbstassoziierten hin zur geöffneten Konformation, welche eine C-terminale F-Aktinbindung ermöglicht. Es bleibt allerdings fraglich inwiefern ein Zusammenspiel beider Faktoren nötig ist oder die alleinige PIP₂-Bindung beziehungsweise Phosphorylierung zu einer Konformationsänderung führen kann.²¹⁷

Auf Grundlage der Ergebnisse bezüglich der Proteinhöhe von Ezrin an festkörperunterstützten Lipidmembranen unter verschiedenen aktivierenden Bedingungen, detektiert mittels reflektometrischer Interferenzspektroskopie und Rasterkraftmikroskopie, lässt sich folgendes postulieren: Die vollständige Aktivierung des Proteins Ezrin durch PIP₂-Bindung und (Pseudo-)Phosphorylierung führt zu einer sowohl mittels RIfS als auch AFM detektierbaren drastisch reduzierten Höhe des Proteins. Hierzu sei anzumerken, dass diese Aussage nur auf einen niedrigen Rezeptorlipidgehalt (<6.5 mol%³⁰) zutrifft. Im Rahmen von Ezrinbindungsstudien an SLBs mit einem Rezeptorlipidgehalt von 8 mol% konnten keine Unterschiede in der optischen Schichtdicke mittels RIfS beobachtet werden. Aufgrund der bei 8 mol% vorliegenden maximalen Belegungsdichte mit Protein (bei Vorliegen einer Sättigungskonzentration) und der geringeren Belegungsdichte bei einem Rezeptorlipidgehalt von 2-4 mol% ist dieser Unterschied ursächlich für die detektierten Unterschiede.

Da bisher nur Moesin der ERM-Proteinfamilie als Gesamtprotein kristallographisch charakterisiert wurde, soll basierend auf den ermittelten Höhenwerten für die N-terminale Domäne Ezrins (N-ERMAD) ein Vergleich zu kristallographischen Daten gezogen werden. Gebunden an PIP₂ beziehungsweise DOGS-Ni-NTA wurden rasterkraftmikroskopisch Proteinhöhen von 3.3 ± 0.9 nm und 3.4 ± 1.3 nm für N-ERMAD bestimmt. Dies steht in Einklang mit den mittels JMOl bestimmten Maße der Kristallstruktur N-ERMADs (vgl. Abb. 4.37).¹⁶⁰

Abbildung 4.37: Kristallographische Maße von N-ERMAD bestehend aus drei Untereinheiten F1, F2 und F3.¹⁶⁰ **A:** Seitliche Ansicht, welche die minimale und maximale Ausdehnung N-ERMADs darstellt. **B:** Frontale Ansicht, in welcher die zwei Bindungsstellen für DOGS-Ni-NTA und PIP₂ hervorgehoben sind. Rot eingezeichnet ist die mögliche Orientierung bei der Bindung von N-ERMAD an PIP₂, welche in der gemessenen Höhe von etwa 3.4 nm resultieren würde.

Bei der Bindung an PIP₂, dessen Bindungstasche sich zwischen den Subdomänen F1 und F3 befindet, lässt sich eine Höhe von 3.4 nm bestimmen, welche mit den rasterkraftmikroskopisch ermittelten Proteinhöhen übereinstimmt.

Interessanterweise konnten für Ezrin wt ($d = 3.5 \pm 1.0$ nm) und Ezrin T567D ($d = 3.2 \pm 0.9$ nm) ähnliche Höhen bei der His₆-Tag vermittelten Bindung an DOGS-Ni-NTA festgestellt werden. Unter der Annahme, dass die pseudophosphorylierte Ezrinmutante T567D in (vor-)aktivierter Form vorliegt und daher in geöffneter(er) Konformation vorliegen könnte, wären Unterschiede bezüglich der detektierten Proteinhöhen denkbar, welche allerdings mittels AFM nicht beobachtet werden konnten. Unterstützt

wird dieses Ergebnis von CHAMBERS *et al.*, welche mittels Bindungsstudien zeigten, dass die Pseudophosphorylierung von Ezrin an Position 567 die Assoziation von N- und C-ERMAD nur geringfügig stört.¹⁴⁶ Auch JAYASUNDAR *et al.* machten ähnliche Beobachtungen in Kleinwinkel-Neutronenbeugungsexperimenten (engl. *small-angle neutron scattering*, SANS) in dem sie zeigen konnten, dass Ezrin wt und Ezrin T567D in geschlossener Konformation vorliegen.²¹³

Auch für Ezrin wt gebunden an PIP₂ wurde mit 3.0 ± 0.4 nm eine ähnliche Proteinhöhe im Vergleich zu N-ERMAD und Ezrin wt/Ezrin T567D an DOGS-Ni-NTA detektiert. Hieraus lässt sich einerseits ableiten, dass sowohl die Linkerregion, als auch die C-terminale Domäne des Ezrin wt Proteins nicht ausschlaggebend für die an PIP₂-haltigen SLBs ausgebildete Proteinhöhe ist. Andererseits konnte ein allein durch die PIP₂-Bindung induzierter Konformationswechsel anhand einer veränderten Proteinhöhe nicht beobachtet werden. Das Vermögen der alleinigen PIP₂-Bindung von Ezrin eine Konformationswechsel zu induzieren und somit das Protein zu aktivieren, findet Belege in der Literatur. CARVALHO *et al.* zeigten anhand von Fluoreszenzspektren der Ezrin-Tryptophanreste, dass die Zugabe von submizellaren PIP₂-Konzentrationen zu einem Abfall der Fluoreszenz führte. Sie erklärten dies durch einen Konformationswechsel, welcher die Tryptophanreste in eine polarere Umgebung bringt und eine anteilige Löschung der Fluoreszenz bewirkt.²¹² JAYASUNDAR *et al.* zeigten zusätzlich anhand von SANS-Experimenten, dass mizellares PIP₂ in Lösung einen vollständigen Konformationswechsel induziert, welcher eine Interaktion mit F-Aktin ermöglicht.²¹³

Hierzu sei anzumerken, dass der Nachweis eines Konformationswechsels von Ezrin basierend auf der Zugabe von PIP₂ in Lösung im zellulären Kontext kritisch gesehen werden muss. In Zellen ist PIP₂ weder in gelöster noch mizellarer Form zu finden.²¹⁷ Somit schließt sich die Frage an, inwiefern Literaturkenntnisse über einen PIP₂-induzierten Konformationswechsel Ezrins bestehen, in denen PIP₂ lipidmembrangekoppelt vorlag. MANITI *et al.* wiesen anhand der veränderten Tryptophanfluoreszenz von Ezrin und Moesin in Anwesenheit von PIP₂-LUVs (engl. *large unilamellar vesicles*) eine geöffnete(re) Konformation der Proteine nach. Darüber hinaus konnten sie anhand von infrarotspektroskopischen Messungen von Ezrin und Moesin in Lösung in Anwesenheit PIP₂-haltiger LUVs eine Änderung in der Sekundärstruktur bestimmen, welche für einen Konformationswechsel spricht.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Kenntnisse. So konnte ein Konformationswechsel anhand der veränderten Proteinhöhe

nur für Ezrin T567D an PIP₂ gebunden und anhand einer veränderten FRET-Effizienz, ebenfalls bei Vorliegen beider aktivierender Faktoren, abgeleitet werden. Eine mögliche Änderung der Sekundärstrukturverteilung aufgrund des Konformationswechsels konnte nicht detektiert werden.

MANITI *et al.* geben an, dass durch Membranbindung auch eine Veränderung der Sekundärstruktur innerhalb der N-terminalen Domäne denkbar sei. Diese Annahme widerlegen sie aber mit kristallographischen ERM-Daten, welche in An- und Abwesenheit der C-terminalen Domäne und der Kopfgruppe von PIP₂, Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), die gleiche Struktur der drei N-terminalen Untereinheiten F1, F2 und F3 aufweisen.^{29,219,220} Eine Änderung im Bereich der α -helikalen Linkerregion, welche eine *Coiled-coil*-Struktur ausbildet, erscheint aufgrund der hohen Stabilität dieses Strukturelements eher unwahrscheinlich.^{1,221} Hieraus lässt sich schließen, dass die von MANITI *et al.* detektierte Änderung der Sekundärstruktur auf einen Konformationswechsel in der C-terminalen Domäne zurückzuführen sein sollte. Dieser Schluss deckt sich jedoch nicht mit ihren Ergebnissen zur Tryptophanfluoreszenz. Insgesamt finden sich sieben Tryptophanreste in der Aminosäuresequenz von Ezrin, allerdings sind sechs von ihnen in der N-ERMAD lokalisiert und ein weiterer in der α -helikalen Linkerregion. Die Erklärung für die gemessenen Unterschiede in der Tryptophanfluoreszenz bleiben somit fraglich und scheinen eher in einer veränderten Tertiärstruktur begründet zu sein.

Signifikante Unterschiede konnten im Rahmen dieser Arbeit bei Charakterisierung der Bindung der pseudophosphorylierten Ezrinmutante T567D an PIP₂-haltige SLBs detektiert werden. Die sowohl mittels RIfS als auch AFM bestimmten Proteinhöhen (2-4 mol% PIP₂) waren in diesem Fall drastisch reduziert und lagen in den rasterkraftmikroskopischen Studien bei 1.6 ± 0.3 nm. Diese geringe Höhe kann von der Kristallstruktur nicht abgeleitet werden, deren geringste Höhe für N-ERMAD mit 2.6 nm viel höher liegt (vgl. Abb. 4.37). Die Interpretation der niedrigen Proteinhöhe von 1.6 nm von Ezrin T567D gebunden an PIP₂-haltige SLBs mit niedrigem Rezeptorlipidgehalt im Vergleich zu den weiteren, detektierten Proteinhöhen ist anhand einer schematischen Darstellung in Abbildung 4.38 gezeigt.

Abbildung 4.38: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Bindungsszenarien für N-ERMAD (oben), Ezrin wt (Mitte) und Ezrin T567D (unten) an DOGS-Ni-NTA- (links) beziehungsweise PIP₂-haltigen (rechts) festkörperunterstützten Lipidmembranen. Besonders hervorzuheben ist die weniger dichte Packung der Ezrinmonoschicht im Fall der vollen Aktivierung (Ezrin T567D an PIP₂, unten rechts), welche zu einer geringer bestimmten Proteinhöhe führte.

Bei der Bindung von Ezrin T567D an DOGS-Ni-NTA (vgl. Abb. 4.38, unten links), ähnlich zu Ezrin wt bildet das Protein eine globuläre Struktur auf der SLB aus, stabilisiert durch die abgeschwächte, aber vorhandene N-ERMAD/C-ERMAD Wechselwirkung. Erst die Bindung an PIP₂ (vgl. Abb. 4.38, unten rechts) führt zu einer geöffneten Konformation des Proteins und aufgrund einer gestreckteren Form zu einer weniger dichten Packung des Proteins auf der Lipidmembranoberfläche.

Dies steht in Einklang zu den Ergebnissen der ähnlichen Proteinhöhen der Ezrinproteine an 8 mol% PIP₂-Lipidmembranen (vgl. Abs. 4.3). Die dichte Packung der Proteine bei maximaler Oberflächenbelegung (im Fall von 8 mol%) führt ungeachtet der Aktivierung und Konformation des Proteins zu einer ähnlichen Organisation der Proteine an der Lipidmembran, welches anhand der ähnlichen Proteinhöhe gemessen wurde. Erst eine geringere Rezeptorlipidkonzentration, erlaubt eine konformationsabhängige Organisation der Protein an der Membranoberfläche, welche im Falle von Ezrin T567D an PIP₂-haltigen SLBs in einer geringeren Packungsdichte resultiert. Da in den vorliegenden rasterkraftmikroskopischen Studien keine einzelnen Proteine aufgelöst werden konnten, wurde im Fall der Bindung von Ezrin T567D an PIP₂ eine gemittelte Proteinhöhe bestimmt, welche die weniger dichte Packung und die tatsächliche Höhe des Proteins widerspiegelt. Hieraus ergab sich, dass sowohl die PIP₂-Bindung als auch die (Pseudo-)Phosphorylierung von

Threoninrest 567 benötigt werden um die Interaktion von N- und C-Terminus von Ezrin zu schwächen. Zur genaueren Charakterisierung der N- und C-terminalen Interaktion von Ezrin wurden FÖRSTER-Resonanzenergietransferexperimente durchgeführt.

ZHU *et al.* hatten zuvor *in vivo* und *in vitro* zeigen können, dass intra- und intermolekularer FRET anhand von Ezrinkonstrukten beobachtet werden kann.²²² Hierzu konstruierten sie Ezrinproteine, welche YFP (engl. *yellow fluorescent protein*) N-terminal und CFP (engl. *cyan fluorescent protein*) C-terminal trugen. Sie beobachteten in Akzeptor-Photobleichexperimenten an Zellen, dass das pseudophosphorylierte Ezrinkonstrukt ein signifikant reduziertes FRET-Signal aufwies im Vergleich zum Wildtypkonstrukt. Dieses Ergebnis führten sie auf eine geöffnete Konformation zurück, in der die N- und C-terminale Bindungsstellen zugänglich sind.

Übereinstimmend hierzu konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Reduktion der FRET-Effizienz für Ezrin T567D-Konstrukte gebunden an PIP₂ beobachtet werden. Dies wurde als ein Zusammenspiel einer veränderten Proteinorganisation auf der Lipidmembranoberfläche und einer Dissoziation von N-ERMAD und C-ERMAD als Resultat der Aktivierung gedeutet.

Ergänzend hierzu stellten HOEFLICH *et al.* in zellulären FRET-Experimenten an YFP- und CFP-markierten Radixin-Konstrukten fest, dass das pseudophosphorylierte Radixinkonstrukt T564E im Gegensatz zum Radixinwildtyp-Konstrukt (nur geschlossene Konformation) neben der hauptsächlich geöffneten Konformation auch in geschlossener Form vorlag.²²¹ Sie distanzieren sich von einer An-/Aus-Vorstellung der Aktivierung und folgerten ein dynamisches Verhältnis zwischen beiden Konformationen, welches durch die Faktoren Phosphorylierung und PIP₂-Bindung bestimmt wird.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die gesammelten Ergebnisse im Rahmen dieses Abschnitts der Arbeit weitere Erkenntnisse über den molekularen Aktivierungsprozess des ERM-Proteins Ezrin liefern. Anhand der Ergebnisse lässt sich eine weniger dichte Packung der Ezrinmonoschicht an SLBs bei vollständiger Aktivierung und geöffneter Konformation (Ezrin T567D an PIP₂) postulieren, welche sich in einer reduzierten Proteinhöhe und einer reduzierten FRET-Effizienz äußerte, allerdings keine Sekundärstrukturänderung aufwies. Somit konnten weitere Belege gesammelt werden, dass ein Zusammenspiel von PIP₂-Bindung und (Pseudo-)Phosphorylierung des Threoninrests 567 essentiell für eine vollständige Aktivierung ist. Dies resultiert in einem Konformationswechsel des Proteins, welcher durch eine Schwächung der Interaktion von N-ERMAD und C-ERMAD zu einer Dissoziation beider führt und somit die Bindung an F-Aktin ermög-

licht.

Viele *in vitro* erzielte Ergebnisse bewegen sich fern von physiologischen Bedingungen. Im Vergleich zu Experimenten in Lösung bietet das vorliegende Modellsystem der festkörperunterstützten Lipidmembranen den Vorteil, dass eine Plasmamembran-ähnliche Umgebung geschaffen wird. Hierin könnte auch die erhöhte Übereinstimmung zu *in vivo* Ergebnissen zum Aktivierungsprozess der ERM-Proteine begründet liegen, welche das notwendige Zusammenspiel von PIP₂-Bindung und Phosphorylierung bestätigen.^{19, 223}

5 Ausbildung von F-Aktinnetzwerken an festkörperunterstützten Lipidmembranen

5.1 Einleitung

Die strukturelle und funktionelle Verknüpfung zwischen dem Zytoskelett und der Plasmamembran der Zelle ist ein essentieller Regulator für eine Vielzahl zellulärer Prozesse und Eigenschaften, wie Migration, Zellteilung, Zellform, Stabilität und Signaltransduktion.¹¹ Das Zytoskelett ist hauptsächlich aus filamentösem Aktin aufgebaut und bisher sind 70 F-Aktin-bindende Proteinfamilien bekannt.²²⁴ Zu diesen Proteinen zählt Ezrin, ein Bestandteil der ERM-Proteinfamilie. Ezrin bindet neben F-Aktin an das Phospholipid PIP₂ der Plasmamembran.

Die strukturelle Organisation von F-Aktin in Zellen ist für ihren Polymorphismus bekannt. Netzwerke aus quervernetztem Aktin bilden den Zellkortex, wohingegen gebündelte Filamente hauptsächlich Membranausstülpungen, wie Mikrovilli und Filopodia, bilden und stabilisieren.^{33,225} Um diese strukturelle Vielfalt zu gewährleisten existiert eine Vielzahl an Aktin-bindenden Proteinen (ABP). Aufgrund der ABP-Diversität und deren komplexem Zusammenspiel bei der Strukturierung des Zytoskeletts, eignen sich *in vitro* Systeme besonders um den Einfluss von einzelnen ABPs auf F-Aktinnetzwerke zu analysieren.²²⁶

Bezugnehmend auf das vorherige Kapitel (vgl. Abs. 4.2) in dem das Bindungsverhalten Ezrins, sowie die Aktivierung des Proteins näher behandelt wurden, steht im Folgenden die Bindung von filamentösem Aktin, unter Kenntnis der aktivierenden Faktoren, an Ezrin im Fokus. Hierzu soll, unseres Wissens nach erstmalig, die Struktur des ausgebildeten F-Aktinnetzwerkes nach Anbindung über das Linkerprotein Ezrin an PIP₂-haltige festkörperunterstützte Lipidmembranen charakterisiert werden.

Des Weiteren war die isolierte Betrachtungsweise des Einflusses von ABPs auf das F-Aktinnetzwerk von Interesse. Hier sollte in ersten Studien gezeigt werden, inwiefern sich die Struktur des F-Aktinnetzwerkes bei Quervernetzung durch die Aktin-bindenden Proteine Fascin und α -Actinin verändert.

5.2 PIP₂-haltige festkörperunterstützte Lipidmembranen

Die Verknüpfung F-Aktins über das Linkerprotein Ezrin an PIP₂ der Plasmamembran ist Gegenstand aktueller Forschung. Verschiedene Studien zeigen allerdings, dass konstitutiv inaktives Ezrin F-Aktin nicht oder nur in geringem Maße über die C-terminale Domäne binden kann.^{28,208} Nach erfolgter Aktivierung geht Ezrin in eine geöffnete Konformation über und ist so in der Lage F-Aktin zu binden.²¹ Die Aktivierung ist von zwei Faktoren abhängig: der N-terminalen PIP₂-Bindung und der Phosphorylierung des Threoninrests 567.¹⁹

5.2.1 F-Aktinbindung als Funktion der Phosphorylierung Ezrins

Zunächst sollte in ersten Bindungsstudien untersucht werden, inwiefern die F-Aktinbindefähigkeit Ezrins von der Phosphorylierung des Threoninrests 567 abhängt. Daher wurde mit dem Proteinwildtyp und der pseudophosphorylierten Ezrinmutante T567D gearbeitet, welche zur Imitation der Phosphorylierung eine zusätzliche negative Ladung trägt (vgl. Abs. 4.3.1). Um eine hohe F-Aktinnetzwerkdichte zu gewährleisten, wurde nach den unter Abschnitt 4.2.4 etablierten Bedingungen eine festkörperunterstützte Lipidmembran bestehend aus POPC/PIP₂/TxR (91.6:8:0.4) auf SiO₂-Siliciumwafern präpariert, Ezrin zugegeben ($c = 0.5\text{--}1.0\ \mu\text{M}$) und anschließend mit Aktin inkubiert. Es erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der F-Aktinanbindung (vgl. Abb. 5.1).

Abbildung 5.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von AlexaFluor®488-Phalloidin markierten F-Aktinnetzwerken auf PIP₂-haltigen festkörperunterstützten Lipidmembranen bestehend aus POPC/PIP₂/TxR (91.6:8:0.4) mit gebundenem Ezrin ($c = 0.5\text{-}1.0\text{ }\mu\text{M}$). **A:** Zeigt keine grüne Fluoreszenz, demnach bindet nicht-muskuläres F-Aktin nicht oder nur geringfügig an Ezrin wt. **B:** Zeigt grün fluoreszierende Filamente, demnach bindet nicht-muskuläres F-Aktin an Ezrin T567D.

Die prozentuale Belegung der Lipidmembran mit F-Aktin wurde mittels IMAGEJ über eine Pixelanalyse quantitativ ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst:

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der ermittelten F-Aktinoberflächenbelegung Θ der Lipidmembran in Abhängigkeit des Ezrin-Proteintyps und der Aktinisoform. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung σ .

Protein	Aktin	Aufnahmen	Oberflächenbelegung $\pm \sigma$ [%]
Ezrin wt	nicht-muskulär	2	0.6 ± 0.4
Ezrin T567D	nicht-muskulär	4	64 ± 4
Ezrin T567D	muskulär	3	69 ± 4

Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass neben der PIP₂-Bindung die (Pseudo)-Phosphorylierung des Threoninrests 567 essentiell für die F-Aktinbindefähigkeit Ezrins ist. Im Fall des nicht-phosphorylierten Proteinwildtyps, ist die F-Aktinbindefähigkeit nicht vorhanden. Erst im Zusammenhang mit der Pseudophosphorylierung, das heißt der Imitation der Phosphorylierung durch die negative Ladung des Aspartatrests, zeigt sich eine hohe Oberflächenbelegung mit F-Aktin. Obwohl im Rahmen dieser Untersuchungen die Rolle des Rezeptorlipids und somit der positive Einfluss von PIP₂ auf die F-Aktinbindefähigkeit Ezrins nicht untersucht wurde, kann dieser aus vorangegangenen Studien des Arbeitskreises vorausgesetzt werden.²⁰⁸ Somit sprechen die hier erzielten Ergeb-

nisse für das notwendige Zusammenspiel der zwei aktivierenden Faktoren PIP₂-Bindung und Phosphorylierung für die Bindung von F-Aktin.

Des Weiteren wurde für die Ezrinmutante T567D untersucht, inwiefern sich die F-Aktinbindefähigkeit bezogen auf die G-Aktinisoformen unterscheidet (vgl. Tab. 5.1). Hierzu wurde einerseits mit der physiologisch relevanten, nicht-muskulären Aktinform, welche aus 85% β -Aktin und 15% γ -Aktin besteht, gearbeitet. Andererseits wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Bindung von muskulärem F-Aktin durchgeführt, welches zu 100% aus α -Aktin aufgebaut ist und sich durch bessere präparative Eigenschaften auszeichnet (vgl. Abs. 5.4.1).²²⁷ Eine Pixelanalyse der Oberflächenbelegung an F-Aktin wies mit 64% beziehungsweise 69% (nicht-muskuläres bzw. muskuläres Aktin) eine ähnliche Belegungsdichte auf und Ezrin T567D zeigte demnach keine Aktinisoformspezifität. Somit wurde im Fall der Bindung F-Aktins über Ezrin T567D an PIP₂-haltige Lipidmembranen, ausschließlich mit dem physiologisch relevanten, nicht-muskulären Aktin gearbeitet.

5.2.2 Charakterisierung des F-Aktinnetzwerkes in Abhängigkeit der PIP₂-Konzentration

Diese Studien sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit der PIP₂-Gehalt der festkörperunterstützten Lipidmembran (engl. *supported lipid bilayer*, SLB) und somit die Oberflächenbelegung an Ezrin sowohl mit der F-Aktinnetzwerkdichte als auch mit den Maschengrößen und Segmentlängen des Netzwerkes korreliert. Der theoretische Zusammenhang zwischen F-Aktinnetzwerkdichte und Maschengröße sowie Segmentlänge ist in Abbildung 5.2 schematisch dargestellt.

Abbildung 5.2: Schematische Darstellung zweier F-Aktinnetzwerke mit unterschiedlicher Dichte. **A:** Ein weniger dichtes F-Aktinnetzwerk weist größere Maschen, welche im Folgenden anhand von Kreisen analysiert werden, im Vergleich zu **B** auf. Das rot gekennzeichnete Filament wird an zwei Punkten gekreuzt und demnach in drei Segmente (1-3) unterteilt. **B:** Ein dichter verwobenes F-Aktinnetzwerk, welches aufgrund der größeren Anzahl an Kreuzungspunkten kleinere Maschengrößen und kürzere Segmentlängen aufweist. Das rot gekennzeichnete Filament wird an fünf Punkten gekreuzt und demnach in sechs Segmente mit spezifischen Längen unterteilt. Während die Gesamtlänge sich in diesem Fall nicht verändert, ergeben sich in einem dichter verwobenen F-Aktinnetzwerk aufgrund der vermehrten Kreuzungspunkte kleinere Segmentlängen, welche mit kleineren Maschengrößen korrelieren.

Bei Variation der F-Aktinnetzwerkdichte über den PIP₂-Gehalt der SLB und somit der Anzahl an Ezrin-Bindungspartnern sollten sich dichtere F-Aktinnetzwerke mit steigender PIP₂-Konzentration ergeben. Bei unveränderter Gesamtlänge der Filamente würde sich bei einer erhöhten F-Aktinoberflächenbelegung eine dichtere Verwebung des Netzwerkes ergeben und somit kleinere Maschengrößen, sowie aufgrund der erhöhten Anzahl an Kreuzungspunkten kürzere Segmentlängen resultieren.

Grundlage dieser Studie ist die Tatsache, dass im gewählten PIP₂-Konzentrationsbereich noch keine Oberflächensättigung an Protein (Ezrin T567D respektive F-Aktin) erreicht ist.³⁰ Hierzu wurden SLBs bestehend aus POPC/PIP₂/TxR mit einem von 1.0-3.0 mol% variierenden Rezeptorlipidgehalt präpariert. Der niedrige PIP₂-Gehalt wurde gewählt, da hierdurch F-Aktinnetzwerke geringer Dichte erwartet wurden und aufgrund des weniger verwobenen F-Aktinnetzwerkes eine bessere Auswertbarkeit erwartet wurde.

Im nächsten Schritt wurde Ezrin T567D ($c = 0.5-1.0 \mu\text{M}$) zugegeben und nach erfolgter *in situ* Polymerisation (vgl. Abs. 3.2.8) von Aktin, wurden die Proben fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Anhand der beispielhaften fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (vgl. Abb. 5.3.1) ist eine Korrelation zwischen dem PIP₂-/Ezrin-Gehalt der SLB und der F-Aktinnetzwerkdichte erkennbar.

Abbildung 5.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken auf festkörperunterstützten Lipidmembranen bestehend aus POPC/PIP₂/TxR (98.8-96.8:1.0-3.0:0.2) mit gebundenem Ezrin T567D ($c = 0.5\text{--}1.0\text{ }\mu\text{m}$) in Abhängigkeit der PIP₂-Konzentration (oben links) und die dazugehörigen ausgewerteten Aufnahmen (unten rechts), welche die erkannten Aktinfilamente (grau) und Maschengrößen-beschreibenden Kreise (pink) zeigen. **A:** 1.0 mol% PIP₂. **B:** 1.5 mol% PIP₂. **C:** 2.0 mol% PIP₂. **D:** 3.0 mol% PIP₂.

Ein Teil der Auswertung der F-Aktinnetzwerkdichte der fluoreszenzmikroskopischen Daten, beruht auf der Analyse der Maschengrößen des F-Aktinnetzwerkes, nach einer von DR. I. MEY entwickelten MATLAB-Routine. Sie basiert auf der Detektion der Filamentstrukturen und zusammenhängender, Filament-freier Flächen. Die Größen der Filament-freien Flächen werden über maximal große Kreisdiameter beschrieben. Nach Auswertung einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme resultierte ein Bild, welches die erkannten Filamentstrukturen und einen eingezeichneten Kreis pro Filament-freie Fläche darstellt (vgl. Abb. 5.3.2).

Die Verteilung der Kreisdiametergrößen gibt Aufschluss über die Maschengrößen des jeweiligen Systems und somit ist ein direkter Vergleich zwischen der Maschengröße

des F-Aktinnetzwerkes und dem PIP₂-Gehalt der SLB möglich. Unter Berücksichtigung der Auflösungsgrenze des Mikroskops, wurde der minimale Kreisradius in der Auswertung auf 0.125 µm festgelegt. Nach erfolgter Kreisanalyse zur Bestimmung der F-Aktinmaschengrößen ist die Verteilung der ermittelten Kreisradiusgrößen in Abhängigkeit des PIP₂-Gehaltes der Lipidmembran mittels eines Boxplots dargestellt (vgl. Abb. 5.4).

Abbildung 5.4: Boxplots, welche die Verteilung der Kreisradien, zur Auswertung der Maschengrößen des F-Aktinnetzwerkes, in Abhängigkeit des PIP₂-Gehaltes der Lipidmembran darstellen. Hierbei repräsentiert die Box die mittleren 50% der Daten, den sogenannten Interquartilsbereich (engl. *interquartile range*, IQR), die waagerechte Linie den Median, das Quadrat innerhalb der Box den Mittelwert und die Antennen sind mit 1.5x IQR definiert. Schwarz: 1.0 mol% PIP₂, Anzahl der ausgewerteten Aufnahmen $n_{\text{Aufn.}} = 8$. Rot: 1.5 mol% PIP₂, $n_{\text{Aufn.}} = 27$. Blau: 2.0 mol% PIP₂, $n_{\text{Aufn.}} = 26$. Grün: 3.0 mol% PIP₂, $n_{\text{Aufn.}} = 6$. Ein nicht-parametrischer MANN-WHITNEY-U-Test weist signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen (mit *** $p < 0.001$) nach.

Die ermittelten Kreisradiusgrößen weisen eine negative Korrelation auf, bei der mit steigendem PIP₂-Gehalt der Lipidmembran die Maschengrößen (Kreisgrößen) des F-Aktinnetzwerkes signifikant abnehmen. Mit steigendem PIP₂-Gehalt sinkt der mittlere Kreisdurchmesser (bezogen auf den Mittelwert) von 0.81 µm auf 0.44 µm.

Des Weiteren wurde während der Auswertung deutlich, dass die Bestimmung von F-Aktinmaschengrößen auf einer SLB mit einem PIP₂-Gehaltes über 3 mol% nicht sinnvoll ist. Mit steigendem PIP₂-Gehalt verschieben sich die Verteilungen zu immer kleineren Werten und streuen deutlich weniger. Im Fall von 3 mol% PIP₂ wurden im Verlauf der Auswertung viele Kreisradien unterhalb der Minimalgrenze von 0.125 µm detektiert, somit konnte nur ein reduzierter Datensatz ausgewertet werden. Bei einer

F-Aktinnetzwerkanalyse auf PIP₂-haltigen Lipidmembranen über 3 mol% würde diese Problematik, aufgrund der erhöhten F-Aktinnetzwerkdichte, noch stärker ausgeprägt sein. Die Maschengrößen würden unter die Auflösungsgrenze des Mikroskops fallen und daher wurde mit maximal 3 mol% PIP₂ gearbeitet.

Der Zusammenhang zwischen einer sinkenden F-Aktinnetzwerkmaschengröße bei steigendem PIP₂-Gehalt der SLB, ließ sich schon aus den in Abbildung 5.3 gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ableiten. Das F-Aktinnetzwerk ist mit steigendem PIP₂-/Ezrin-Gehalt dichter verwoben und hieraus ergeben sich deutlich kleinere Filamentfreie Flächen, welche anhand der Auswertung über Kreisradien nachgewiesen werden konnten. Dies legt die Vermutung nahe, dass die F-Aktinoberflächenbelegung Θ mit dem PIP₂-Gehalt der SLB positiv korrelieren könnte.

Durch die Bestimmung der prozentualen Oberflächenbelegung Θ der Lipidmembran mit F-Aktin, mittels IMAGEJ über eine Pixelanalyse, wurde diese Korrelation quantifiziert. In Tabelle 5.2 sind die erhaltenen Mittelwerte mit Standardabweichung der F-Aktinoberflächenbelegung Θ in Abhängigkeit des PIP₂-Gehaltes der Lipidmembran aufgelistet.

Tabelle 5.2: Zusammenfassung der ermittelten F-Aktinoberflächenbelegung Θ in Abhängigkeit des PIP₂-Gehaltes und Ezrinoberflächenbelegung der Lipidmembran. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung σ .

PIP ₂ -Gehalt [mol%]	Aufnahmen	Oberflächenbelegung $\pm \sigma$ [%]
1.0	8	31 $\pm$ 10
1.5	27	30 $\pm$ 10
2.0	26	40 $\pm$ 8
3.0	6	61 $\pm$ 8

Die F-Aktinoberflächenbelegung Θ der Lipidmembran nimmt mit steigendem PIP₂-Gehalt zu. Durch den erhöhten Rezeptorlipidgehalt bindet mehr Ezrin T567D an die Lipidmembran und folglich ergeben sich mehr F-Aktinbindungstellen. Hieraus lässt sich auch ableiten, dass noch keine Sättigung der Lipidmembranoberfläche mit Protein in einem Konzentrationsbereich von 1.0-3.0 mol% PIP₂ erreicht war. Allerdings sind die Werte für 1.0 mol% und 1.5 mol% PIP₂ fast identisch. Dies lässt sich einerseits durch die Heterogenität der Proben erklären, welche auch durch die leicht größere Standardabweichung zu erkennen ist. Darüber hinaus konnten nur wenige Proben mit einer Konzentration von 1 mol% PIP₂ ausgewertet werden, da hier vermehrt Lipidmembrandefekte auftraten, an welche F-Aktin unspezifisch binden konnte (vgl. Abs. 9.1). Somit würde

sowohl die Oberflächenbelegung als auch die F-Aktinnetzwerkdicke zu höheren Werten verfälscht werden.

Zur weiteren Charakterisierung des F-Aktinnetzwerkes diente die Analyse der Segmentlängen (vgl. Abb. 5.2) mit Hilfe der Software SOAX.¹¹⁰ Die Auswertung wurde für die Daten von 1.0, 1.5 und 2.0 mol% PIP₂ durchgeführt. Aufgrund des stark verwobenen F-Aktinnetzwerkes im Fall von 3 mol% PIP₂ sind einzelne Filamentsegmente nicht mehr durch die Software zu detektieren und die Segmentlängen konnten in diesem Fall nicht analysiert werden. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mussten zunächst in 16-bit Graustufen-Bilder umgewandelt werden und konnten anschließend mit standardisierten Parametern (vgl. Abs. 3.7.8) mittels SOAX ausgewertet werden. In Abbildung 5.5 ist exemplarisch pro PIP₂-Rezeptorlipidgehalt ein ausgewertetes Graustufen-Bild (1) dem resultierenden überlagerten Bild (2), welches die detektierten Filamentsegmente pinkfarben kennzeichnet, gegenübergestellt.

Abbildung 5.5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken auf festkörperunterstützten Lipidmembranen bestehend aus POPC/PIP₂/TxR (98.8-97.8:1.0-2.0:0.2) mit gebundenem Ezrin T567D ($c = 0.5\text{--}1.0\ \mu\text{M}$) in Abhängigkeit der PIP₂-Konzentration in 16-bit Graustufen (1) und die dazugehörigen mittels SOAX ausgewerteten Aufnahmen (2), welche die erkannten Filamentsegmente (pink) zeigen. **A:** 1.0 mol% PIP₂. **B:** 1.5 mol% PIP₂. **C:** 2.0 mol% PIP₂. Maßstabsbalken: 5 μm .

Unter Berücksichtigung der Pixelgröße der Aufnahmen wurden aus den detektierten Filamentsegmenten die Längen quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.6 gegenübergestellt.

Abbildung 5.6: Boxplots, welche die Segmentlängen der mittels SOAXS detektierten F-Aktinfilamente in Abhängigkeit des PIP₂-Gehalts der Lipidmembran darstellen. Hierbei repräsentiert die Box die mittleren 50% der Daten, den sogenannten Interquartilsbereich (engl. *interquartile range*, IQR), die waagerechte Linie den Median, das Quadrat innerhalb der Box den Mittelwert und die Antennen sind mit 1.5x IQR definiert. Schwarz: 1.0 mol% PIP₂, Anzahl der ausgewerteten Aufnahmen $n_{\text{Aufn.}} = 8$. Rot: 1.5 mol% PIP₂, $n_{\text{Aufn.}} = 5$. Blau: 2.0 mol% PIP₂, $n_{\text{Aufn.}} = 6$. Ein nicht-parametrischer MANN-WHITNEY-U-Test weist signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen von 1.5 mol% und 2.0 mol% PIP₂ mit $***p < 0.001$ und keinen signifikanten Unterschied (ns) zwischen 1.0 mol% PIP₂ und 1.5 mol% PIP₂ nach.

Anhand der Segmentlängen lässt sich abermals eine PIP₂-abhängige Dichte des F-Aktinnetzwerkes ableiten. Diese negative Korrelation lässt sich beim Vergleich der Ergebnisse eines Rezeptorlipidgehalts von 1.0 mol% ($1.9 \pm 1 \mu\text{m}$) und 1.5 mol% PIP₂ ($1.9 \pm 1 \mu\text{m}$) nicht bestätigen, wird aber zwischen 1.5 mol% und 2.0 mol% ($1.5 \pm 1 \mu\text{m}$) PIP₂ deutlich. Somit wird die anfangs aufgestellte Hypothese einer negativen Korrelation von PIP₂-Gehalt und somit Ezrin-/F-Aktinoberflächenbelegung mit der Maschengröße des Netzwerkes und der Segmentlängen bestätigt.

Die Dichte und Verwebung eines F-Aktinnetzwerkes kann somit *in vitro* direkt über den PIP₂-Gehalt der Lipidmembran, resultierend in einer spezifischen Ezrinoberflächenbelegung, gesteuert werden.

5.2.3 Blindexperiment bezüglich der spezifischen Bindung von F-Aktin an PIP₂-haltige Lipidmembranen

In Blindexperimenten sollte sichergestellt werden, dass die Bindung von F-Aktin an PIP₂-haltige festkörperunterstützte Lipidmembranen spezifisch über das Linkerprotein Ezrin erfolgt. In zwei voneinander unabhängigen Experimenten wurden Lipidmembranen bestehend aus POPC/PIP₂/TxR (97.8:2:0.2) präpariert. Anschließend wurde nicht-muskuläres Aktin *in situ* auf den Lipidmembranen polymerisiert.

Abbildung 5.7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer festkörperunterstützten Lipidmembran bestehend aus POPC/PIP₂/TxR (97.8:2:0.2) nach Inkubation mit F-Aktin. **A:** Roter Kanal, TexasRed®-DHPE(TxR)-Fluoreszenz der Lipidmembran. Die homogene, rote Fluoreszenz kennzeichnet die planare festkörperunterstützte Lipidmembran, welche wenige größere Defekte (schwarz) aufweist. **B:** Im grünen Kanal ist keine Fluoreszenz des AlexaFluor®488-Phalloidin fluoreszenzmarkierten F-Aktins sichtbar. In Abwesenheit des Linkerproteins Ezrin bindet kein F-Aktin (**B**) an die PIP₂-haltige Lipidmembran (**A**).

Aus Abbildung 5.7 wird ersichtlich, dass die TexasRed®-DHPE(TxR)-markierte Lipidmembran (vgl. Abb. 5.7A) generell eine homogene, rote Fluoreszenz zeigt. Dies kennzeichnet die Ausbildung einer planaren festkörperunterstützten Lipidmembran. Des Weiteren weist die Lipidmembran einige größere Defekte (schwarze Bereiche) und überschüssiges Lipidmaterial (hellrote Bereiche) auf. Der grüne Kanal des AlexaFluor®488-Phalloidin markierten F-Aktins zeigt lediglich ein leichtes Hintergrundrauschen und keine F-Aktinfluoreszenz. Im Rahmen der Blindexperimente konnte gezeigt werden, dass planare festkörperunterstützte PIP₂-haltige Lipidmembranen in Abwesenheit von Ezrin kein F-Aktin binden können (vgl. Abb. 5.7B). Eine unspezifische Wechselwirkung zwischen F-Aktin und der Lipidmembran wurde somit ausgeschlossen.

Aufbauend auf Beobachtungen im Rahmen der F-Aktinbindungsstudie (vgl. Abs. 5.2.2)

wurden weitergehende Blindexperimente bezüglich einer möglichen unspezifischen Wechselwirkung zwischen dem Matrixlipid POPC und F-Aktin durchgeführt. Hier konnte festgestellt werden, dass F-Aktin unspezifisch an POPC-Lipidmembranen bindet. Aufgrund repulsiver Kräfte zwischen PIP_2 und F-Aktin tritt dies ab einem PIP_2 -Gehalt von 1.5 mol% nicht auf, ist aber bei der F-Aktinbindung über Ezrin an unter 1.5 mol% PIP_2 -haltige Lipidmembranen zu berücksichtigen. Es konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Verwendung des negativ geladenen Lipids POPS in Lipidmembranen mit niedrigem PIP_2 -Gehalt, die unspezifische Wechselwirkung zwischen F-Aktin und Matrixlipid unterbindet. Darum ist es empfehlenswert ab einem PIP_2 -Gehalt von 1 mol% und weniger festkörperunterstützte Lipidmembranen anteilig mit POPS zu präparieren. Die zugrundeliegenden Ergebnisse sind zur besseren Übersicht im Anhang (vgl. Abs. 9.1) aufgeführt.

5.2.4 Untersuchung des Einflusses von Calciumionen auf die F-Aktinnetzwerkdichte

In diesem Abschnitt der Arbeit sollte der Einfluss von divalenten Kationen, wie Calciumionen, auf die F-Aktinnetzwerkdichte beziehungsweise -organisation untersucht werden. In der Literatur finden sich Hinweise, dass Calciumionen ab Konzentrationen im niedrigen, millimolaren Bereich Aktinfilamente bündeln können.^{228,229}

Hierzu wurden Lipidmembranen bestehend aus POPC/ PIP_2 /TxR mit einem PIP_2 -Gehalt von 1.5-3.0 mol% präpariert, mit Ezrin T567D ($c = 0.5\text{-}1.0\ \mu\text{M}$) inkubiert und nach *in situ* Polymerisation von G-Aktin ein Calcium-haltiger Puffer so zugegeben, dass sich eine Konzentration an Ca^{2+} von 10-20 mM ergab.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ergab sehr klare, kontrastreiche Aufnahmen der F-Aktinnetzwerke. Die Zunahme der Qualität der Aufnahmen in Gegenwart von Calciumionen könnte in einer fixierenden Wirkung auf das F-Aktinnetzwerk begründet sein. Des Weiteren zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wie zuvor (vgl. Abb. 5.3), dass ein Zusammenhang zwischen dem PIP_2 -Gehalt der Lipidmembran und der F-Aktinnetzwerkdichte besteht.

Abbildung 5.8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken (markiert mit AlexaFluor®488-Phalloidin) auf SLBs bestehend aus POPC/PIP₂/TxR (98.3-96.8:1.5-3.0:0.2) mit gebundenem Ezrin T567D nach Inkubation mit Calciumionen (oben links) und die dazugehörigen ausgewerteten Aufnahmen (unten rechts). **A:** 1.5 mol% PIP₂. **B:** 2.0 mol% PIP₂. **C:** 3.0 mol% PIP₂.

Die anschließende Auswertung der Maschengrößen des F-Aktinnetzwerkes in Gegenwart von Calciumionen anhand von Kreisflächen (vgl. Abb. 5.9) weist, analog zu den unter Abschnitt 5.2.2 gezeigten Ergebnissen, eine negative Korrelation der Maschengrößen und dem PIP₂-Gehalt der Lipidmembran nach.

Abbildung 5.9: Boxplots, welche die Verteilung der Kreisradien, zur Auswertung der Maschengrößen des F-Aktinnetzwerkes, in Abhängigkeit des PIP₂-Gehaltes der Lipidmembran in Gegenwart von Calciumionen, darstellen. Hierbei repräsentiert die Box die mittleren 50% der Daten, den sogenannten Interquartilsbereich (engl. *interquartile range*, IQR), die waagerechte Linie den Median, das Quadrat innerhalb der Box den Mittelwert und die Antennen sind mit 1.5x IQR definiert. Rot: 1.5 mol% PIP₂, Anzahl der ausgewerteten Aufnahmen $n_{\text{Aufn.}} = 15$. Blau: 2.0 mol% PIP₂, $n_{\text{Aufn.}} = 8$. Grün: 3.0 mol% PIP₂, $n_{\text{Aufn.}} = 7$.

Mit steigendem PIP₂-Gehalt nimmt die mittlere Maschengröße (Kreisdurchmesser, bezogen auf den Mittelwert) von $0.72 \pm 0.6 \mu\text{m}$ auf $0.40 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ab. Wie zuvor (vgl. Abs. 5.2.2) ist dies durch die aus der erhöhten Oberflächenbelegung mit Ezrin T567D resultierenden höheren F-Aktinnetzwerkdichte auf der Lipidmembran zu erklären. Somit ergeben sich kleinere Filament-freie Flächen mit steigendem PIP₂-Gehalt, welches die signifikant kleineren Maschengrößen bei steigender PIP₂-Konzentration widerspiegeln.

Des Weiteren bewegen sich die mittleren Kreisradien in ähnlicher Größenordnung wie die ermittelten Werte in Abwesenheit von Calciumionen. Die Ermittlung der Signifikanz möglicher Unterschiede der Werte untereinander (in An-/Abwesenheit von Calciumionen pro Rezeptorlipidgehalt), mit Hilfe eines *U*-Tests (vgl. Abs. 5.2.2), zeigte ein inkonsistentes Bild. Im Fall der mittleren Maschengrößen auf PIP₂-haltigen SLBs mit einem Gehalt von 2.0 mol%, in An- und Abwesenheit von Calciumionen, konnte ein signifikanter Unterschied ausgeschlossen werden. Die Werte für 1.5 und 3.0 mol%, jeweils verglichen in An- und Abwesenheit von Calciumionen, unterscheiden sich signifikant voneinander. Ein Einfluss der Calciumionen auf die F-Aktinnetzwerkdichte kann auf Grundlage dieser Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber unwahrscheinlich.

Die prozentuale Oberflächenbelegung Θ der Lipidmembran mit F-Aktin wurde mittels

IMAGEJ über eine Pixelanalyse quantifiziert. In Tabelle 5.3 sind die erhaltenen Mittelwerte mit Standardabweichung der F-Aktinoberflächenbelegung Θ in Abhängigkeit des PIP₂-Gehaltes der Lipidmembran in Gegenwart von Calciumionen aufgelistet.

Tabelle 5.3: Zusammenfassung der ermittelten F-Aktinoberflächenbelegung Θ in Abhängigkeit des PIP₂-Gehaltes der Lipidmembran in Gegenwart von Calciumionen. Dargestellt ist der Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung σ .

PIP ₂ -Gehalt [mol%]	Aufnahmen	Oberflächenbelegung $\pm \sigma$ [%]
1.5	15	27 $\pm$ 10
2.0	8	36 $\pm$ 5
3.0	7	62 $\pm$ 7

Ähnlich zu den in Tabelle 5.2 gezeigten Ergebnissen, nimmt die F-Aktinoberflächenbelegung Θ der Lipidmembran mit steigendem PIP₂-Gehalt auch in Gegenwart der Calciumionen zu. Die Werte sind mit 27%, 36% und 62% sehr ähnlich im Vergleich zu den ermittelten Werten in Abwesenheit von Calciumionen (30%, 40% und 61%), so dass anhand der F-Aktinoberflächenbelegung kein Einfluss der Calciumionen auf die F-Aktinnetzwerkichte abzuleiten ist.

Des Weiteren wurde zur weiteren Charakterisierung der F-Aktinnetzwerkorganisation eine Segmentlängenanalyse mit Hilfe der Software SOAX für Fluoreszenzaufnahmen, welchen ein Rezeptorlipidgehalt an PIP₂ von 1.5 mol% und 2.0 mol% zugrunde liegt, durchgeführt. In Abbildung 5.10 ist beispielhaft pro PIP₂-Rezeptorlipidgehalt ein ausgewertetes Graustufen-Bild dem resultierenden überlagerten Bild, welches die detektierten Filamentsegmente pinkfarben kennzeichnet, gegenübergestellt.

Abbildung 5.10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken auf festkörperunterstützten Lipidmembranen bestehend aus POPC/PIP₂/TxR (98.3-97.8:1.5-2.0:0.2) mit gebundenem Ezrin T567D ($c = 0.5\text{-}1.0\text{ }\mu\text{M}$) in Abhängigkeit der PIP₂-Konzentration in Gegenwart von Calciumionen in 16-bit Graustufen (**1**) und die dazugehörigen mittels SOAX ausgewerteten Aufnahmen (**2**), welche die erkannten Filamentsegmente (pink) zeigen. **A:** 1.5 mol% PIP₂. **B:** 2.0 mol% PIP₂. Maßstabsbalken: 5 μm .

Unter Berücksichtigung der Pixelgröße der Aufnahmen wurden aus den detektierten Filamentsegmenten die Längen berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.11 anhand eines Boxplots dargestellt.

Abbildung 5.11: Boxplots, welche die Segmentlängen der mittels SOAXs detektierten F-Aktinfilamente in Abhängigkeit des PIP₂-Gehalts der Lipidmembran darstellen. Hierbei repräsentiert die Box die mittleren 50% der Daten, den sogenannten Interquartilsbereich (engl. *interquartile range*, IQR), die waagerechte Linie den Median, das Quadrat innerhalb der Box den Mittelwert und die Antennen sind mit 1.5x IQR definiert. Rot: 1.5 mol% PIP₂, $n_{\text{Aufn.}} = 8$. Blau: 2.0 mol% PIP₂, $n_{\text{Aufn.}} = 5$. Ein nicht-parametrischer MANN-WHITNEY-U-Test weist signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen von 1.5 mol% und 2.0 mol% PIP₂ mit *** $p < 0.001$ nach.

Der Vergleich der ermittelten Segmentlängen der Filamente in Anwesenheit von Calciumionen zwischen 1.5 mol% und 2.0 mol% PIP₂ weist einen signifikanten Unterschied hin zu kleineren Werten im Fall von 2.0 mol% PIP₂ auf. Auch liegen die Werte mit $1.8 \pm 1 \mu\text{m}$ und $1.5 \pm 1 \mu\text{m}$ (bezogen auf den Mittelwert) in ähnlicher Höhe wie die Segmentlängen in Abwesenheit von Calciumionen ($1.9 \pm 1 \mu\text{m}$ und $1.5 \pm 1 \mu\text{m}$). Würden Calciumionen eine stärkere Verknüpfung des F-Aktinnetzwerkes hervorrufen, so sollte sich dies in einer deutlichen Verringerung der Segmentlängen niederschlagen. Dies ist nicht der Fall und ein statistischer U-Test weist für 2 mol% PIP₂ in An- und Abwesenheit von Calciumionen keinen signifikanten Unterschied nach.

Somit lässt sich abschließend feststellen, dass kein Einfluss von Calciumionen auf die F-Aktinnetzwerkdichte, analysiert anhand von Maschengrößen, Oberflächenbelegung und Segmentlängen, nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse decken sich mit denen in Abwesenheit von Calciumionen und können als eine Erweiterung des Datensatzes und Validierung der Ergebnisse gesehen werden. Mit steigendem PIP₂-Gehalt nimmt die Dichte des F-Aktinnetzwerkes aufgrund der erhöhten Anzahl an Ezrinmolekülen als Bindungspartner, zu. Dies ließ sich mittels einer abnehmenden Maschengröße, zunehmenden F-Aktinoberflächenbelegung und abnehmenden Segmentlänge der Filamente bei steigendem PIP₂-Gehalt nachweisen.

5.3 DOEPC-haltige festkörperunterstützte Lipidmembranen

Die direkte, elektrostatische Verknüpfung von F-Aktin an Lipidmembranen über positiv geladene Lipide oder Tenside ist literaturbekannt.^{230,231} Hierbei macht man sich zu Nutze, dass jedes Aktinmonomer unter physiologischen Bedingungen einen Überschuss von vier negativen Ladungen trägt.²³¹

Die Immobilisierung F-Aktins an das positiv geladene Lipid 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholin (DOEPC), stellt eine robuste und wohldefinierte Alternative zur Verknüpfung von Aktin über Ezrin an PIP₂-haltige Lipidmembranen dar. Ziel war es den Einfluss von Aktin-bindenden Proteinen (ABPs) auf die F-Aktinnetzwerkorganisation zu untersuchen. Hierzu wurde die Interaktion zwischen muskulärem Aktin und den Aktin-bindenden Proteinen α -Actinin und Fascin, ohne den möglichen Einfluss eines dritten Proteins (Ezrin T567D), fluoreszenzmikroskopisch charakterisiert.

5.3.1 Ausbildung und Stabilität DOEPC-haltiger festkörperunterstützter Lipidmembranen

Die Ausbildung DOEPC-haltiger Lipidmembranen auf SiO₂-Siliciumwafern mit der Zusammensetzung DOPC/DOEPC/TxR (79.8:20:0.2) erfolgte in PBS. Aufgrund der partiell negativen Oberflächenladung der Wafer wurde das Spreiten der positiv geladenen Vesikel begünstigt.

Abbildung 5.12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer festkörperunterstützten Lipidmembran bestehend aus DOPC/DOEPC/TxR (79.8:20:0.2). **A:** TexasRed®-DHPE(TxR)-Fluoreszenz der Lipidmembran. **B:** TexasRed®-DHPE(TxR)-Fluoreszenz der Lipidmembran nach Inkubation mit F-Aktin/Fascin (10:1). In beiden Fällen ist eine homogene Fluoreszenz der Lipidmembran zu beobachten, welche die planare SLB kennzeichnet. Des Weiteren konnten wenige Defekte in der Lipidmembran (schwarze Bereiche) und überschüssiges Lipidmaterial (hell fluoreszierende Bereiche) detektiert werden.

In Abbildung 5.12 sind zwei fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dargestellt, welche repräsentativ eine SLB vor und nach Inkubation mit Aktinfilamenten zeigen. Die Lipidmembranen sind gekennzeichnet durch wenige Defekte (dunkle, schwarze Bereiche), sowie überschüssigem Lipidmaterial (Bereiche mit höherer, roter Fluoreszenzintensität) und einer ansonsten homogenen roten Fluoreszenz. Hieraus kann geschlossen werden, dass die Ausbildung einer planaren, DOEPC-haltigen Lipidmembran erfolgreich war. Durch die Anbindung von F-Aktin konnte eine Zunahme der überschüssigen Lipidmaterials detektiert werden (vgl. Abb. 5.12B). Die resultierte allerdings nicht in einem vermehrten Auftreten von Lipidmembrandefekten. Möglich wäre, dass das wenige freie, im Medium befindliche Lipidmaterial durch F-Aktin an der SLB-Oberfläche immobilisiert wurde. FRAP-Messungen (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*) beweisen die laterale Lipidmobilität innerhalb der festkörperunterstützten Membran. Die Fluoreszenzintensität kehrte innerhalb weniger Sekunden fast vollständig wieder (vgl. Abs. 3.7.6).

5.3.2 F-Aktinbindungsstudie an DOEPC-haltigen festkörperunterstützten Lipidmembranen

Mittels reflektometrischer Interferenzspektroskopie wurde sowohl die Ausbildung der DOEPC-haltigen Lipidmembran, als auch die anschließende Anbindung der muskulären

Aktinfilamente untersucht. In Abbildung 5.13 ist eine exemplarische Messung dargestellt, welche die Ausbildung der DOEPC-SLB und eine Bindung von F-Aktinfilamenten nachweist.

Abbildung 5.13: Zeitaufgelöste Änderung der optischen Schichtdicke ΔOT eines hydrophilisierten SiO_2 -Siliciumwafers nach Spreiten von Vesikeln (a) bestehend aus DOPC/DOEPC (80:20), anschließendem Spülen mit F-Puffer (b), der Zugabe von vorpolymerisierten, muskulären Aktinfilamenten (c, $c = 4 \mu\text{M}$) und weiterem Spülen mit F-Puffer (d), detektiert mittels RIfS.

Das Spreiten der DOEPC-haltigen Vesikel in PBS führte zu einem Anstieg der optischen Schichtdicke ΔOT um 5.8 nm, welche auch nach Spülen mit dem F-Aktinpuffer (F-Puffer) konstant blieb. Die Zugabe vorpolymerisierter, muskulärer Aktinfilamente ($c = 4 \mu\text{M}$) führte zu einem Anstieg von $\Delta OT = 1.8 \text{ nm}$ und fiel durch Spülen mit F-Puffer nur geringfügig auf 1.7 nm ab. Dies spricht für eine größtenteils irreversible Bindung der Filamente. Aus zwei RIfS-Messungen ergab sich eine mittlere optische Schichtdickenänderung von $\Delta OT = 5.6 \pm 0.4 \text{ nm}$ für die Lipidmembran und $\Delta OT = 2.1 \pm 0.4 \text{ nm}$ nach Anbindung von muskulärem F-Aktin. Die Resultate der RIfS-Messungen bestätigen, dass eine Immobilisierung muskulärer Aktinfilamente an festkörperunterstützte DOEPC-haltige Lipidmembranen stattfindet.

5.3.3 Charakterisierung der F-Aktinnetzwerkorganisation in Abhängigkeit von Aktin-bindenden Proteinen

Zur fluoreszenzmikroskopischen Charakterisierung der F-Aktinnetzwerkorganisation in Abhängigkeit von Aktin-bindenden Proteinen, wurden Lipidmembranen bestehend aus DOPC/DOEPC/TxR (79.8:20:0.2) auf Siliciumdioxid-Siliciumwafern präpariert. Der Re-

zeptorlipidgehalt war so gewählt, dass eine hohe Oberflächenbelegung mit F-Aktin gewährleistet ist.¹²³

Neben Proben mit Aktin-bindenden Proteinen (ABPs) wurden auch Proben ohne ABPs untersucht. Nur so ist eine Aussage über den Einfluss von α -Actinin und Fascin auf das F-Aktinnetzwerk möglich. α -Actinin ist *in vivo* dafür bekannt, Aktinfilamente quervernetzen, wohingegen Fascin Aktinfilamente überwiegend bündelt.^{226,232}

Es wurden unterschiedliche präparative Ansätze verfolgt: Zunächst wurde nach erfolgter *in situ* Polymerisation Aktins auf der Lipidmembranoberfläche die ABPs zugegeben. Das ausgebildete F-Aktinnetzwerk veränderte sich allerdings kaum und somit war präparativ keine zeitaufgelöste Detektion der F-Aktinnetzwerkreorganisation möglich. Auch die Zugabe der ABPs während der *in situ* Polymerisation zeigte kaum Unterschiede zu den F-Aktinnetzwerken in Abwesenheit von ABPs.

Somit wurde die Präparation so durchgeführt, dass G-Aktin in Gegenwart der ABPs vorpolymerisiert und in polymerisierter Form auf die Proben gegeben wurde. Hierzu wurde Fascin in einem Verhältnis von 1:10 bezogen auf die G-Aktinkonzentration zugegeben, α -Actinin in einem Verhältnis von 1:20. Die Verhältnisse wurden unter Berücksichtigung von literaturbekannten Werten gewählt, welche die bekannten Aktinbindungsstellen berücksichtigen. Fascin verfügt über eine nachgewiesene Bindungsstelle (eine Weitere wird für wahrscheinlich gehalten).²³³ α -Actinin hingegen besitzt in der dimerisierten Form zwei Aktinbindungsstellen.²³²

Im Verlauf der Experimente zeigte sich, dass Aktin-bindende Proteine eine sehr heterogene Organisation und Verknüpfung von F-Aktinfilamenten induzieren. Diese Heterogenität ist repräsentativ in Abbildung 5.14 dargestellt.

Abbildung 5.14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken (markiert mit AlexaFluor®488-Phalloidin) auf DOEPC-haltigen Lipidmembranen. **A1-3:** F-Aktinnetzwerk vorpolymerisiert mit Fascin (G-Aktin/Fascin 10:1). **B1-3:** F-Aktinnetzwerk vorpolymerisiert mit α -Actinin (G-Aktin/ α -Actinin 20:1).

Auf den Proben waren Bereiche detektierbar, welche eher unbeeinflusst von den Aktinbindenden Proteinen erschienen und eine ähnliche F-Aktinnetzwerkorganisation zu den ABP-freien Proben aufwiesen (vgl. Abb. 5.14A2/B3 mit 5.15A1). Es zeigten sich aber auch deutliche Unterschiede in der Netzwerkmorphologie im Vergleich zu ABP-freien Proben (vgl. Abb. 5.14A2/B3): Die Filamente lagen teilweise gebündelter vor, welches anhand lokal erhöhter Fluoreszenzintensitäten abgeleitet wurde und eine erhöhte Ausdehnung in alle Raumrichtungen mit sich bringt. Es konnten sowohl größere Segmentlängen als auch Maschen im Vergleich zu unveränderten Bereichen beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine heterogene Verteilung der ABPs innerhalb des F-Aktinnetzwerkes und somit eine unterschiedliche lokale Konzentrationen der ABPs. Für die F-Aktinnetzwerkanalyse wurden nur die Bereiche der Proben fluoreszenzmikroskopisch untersucht, welche sich deutlich von denen ohne ABPs unterschieden und lokal eine eher einheitliche Struktur aufwiesen.

Abbildung 5.15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken (markiert mit AlexaFluor®488-Phalloidin) auf DOEPC-haltigen SLBs in Abwesenheit und Gegenwart von Aktin-bindenden Proteinen (oben links) und die dazugehörigen ausgewerteten Aufnahmen (unten rechts). **A:** Ohne ABP. **B:** Vorpolymerisiert mit Fascin (G-Aktin/Fascin 10:1). **C:** Vorpolymerisiert mit α -Actinin (G-Aktin/ α -Actinin 20:1).

Die in Abbildung 5.15 dargestellten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine Korrelation zwischen der Zunahme der Maschengröße und der Gegenwart von Aktin-bindenden Proteinen. Die prozentuale Oberflächenbelegung Θ der Lipidmembran mit F-Aktin wurde mittels IMAGEJ über eine Pixelanalyse quantifiziert. In Tabelle 5.4 ist die F-Aktinoberflächenbelegung Θ in Abhängigkeit Aktin-bindender Proteine anhand der bestimmten Mittelwerte mit Standardabweichung σ gegenübergestellt.

Tabelle 5.4: Zusammenfassung der ermittelten F-Aktinoberflächenbelegung Θ DOEPC-haltiger Lipidmembranen in An- und Abwesenheit Aktin-bindender Proteine. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung σ .

Aktin-bindendes Protein	Aufnahmen	Oberflächenbelegung $\pm \sigma$ [%]
ohne	6	53 ± 11
α -Actinin	6	29 ± 4
Fascin	5	22 ± 11

Insgesamt nimmt die F-Aktinoberflächenbelegung Θ durch den Einfluss der Aktin-bindenden Proteine ab. Dieser Wert beschreibt allerdings nur die Oberflächenbelegung in der x-y-Ebene. Die erhöhte Ausdehnung ABP-gebündelter Filamente in z-Richtung kann bei der Θ -Bestimmung nicht berücksichtigt werden. Somit wird die ermittelte F-Aktinoberflächenbelegung in Gegenwart von Aktin-bindenden Proteinen unterbestimmt.

In Gegenwart der ABPs liegt eine geringere F-Aktinoberflächenbelegung vor, welche das Vorliegen von Netzwerken mit größeren Maschen erwarten lässt. Somit sollte auch die Analyse der Maschengrößen anhand von Kreisradien dieses Annahme bestätigen.

Die Boxplots in Abbildung 5.16 weisen eine Zunahme der Maschengrößen (Kreisradiusgrößen) des F-Aktinnetzwerkes durch den Einfluss von Aktin-bindenden Proteinen nach.

Abbildung 5.16: Boxplots, welche die Verteilung der Kreisradien auf DOEPC-haltigen SLBs, zur Auswertung der Maschengrößen des F-Aktinnetzwerkes, in Abwesenheit und Gegenwart von Aktin-bindenden Proteinen (ABPs) darstellen. Hierbei repräsentiert die Box die mittleren 50% der Daten, den sogenannten Interquartilsbereich (engl. *interquartile range*, IQR), die waagerechte Linie den Median, das Quadrat innerhalb der Box den Mittelwert und die Antennen sind mit $1.5 \times \text{IQR}$ definiert. Grau: Ohne ABPs, Anzahl der ausgewerteten Aufnahmen $n_{\text{Aufn.}} = 6$. Türkis schraffiert: α -Actinin, $n_{\text{Aufn.}} = 6$. Orange schraffiert: Fascin, $n_{\text{Aufn.}} = 5$. Ein nicht-parametrischer MANN-WHITNEY-U-Test weist signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen mit $***p < 0.001$ nach.

Die Maschengrößen steigen signifikant (belegt durch einen U-Test) in Gegenwart von α -Actinin und Fascin auf $1.0 \pm 1.0 \mu\text{m}$ beziehungsweise $1.2 \pm 0.8 \mu\text{m}$ (Kreisdurchmesser, bezogen auf den Mittelwert), im Vergleich zur Maschengröße von F-Aktinnetzwerken an DOEPC-haltigen SLBs in Abwesenheit von ABPs in Höhe von $0.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$. Der Einfluss der ABPs auf die Maschengrößen des F-Aktinnetzwerkes ist stark ausgeprägt, im Fall von α -Actinin findet eine Vergrößerung der Maschen (bezogen auf die Kreisflächen) um 73% und im Fall von Fascin sogar um 104% statt.

Die Werte für die Maschengrößen des F-Aktinnetzwerkes auf 20 mol% DOEPC-haltigen Lipidmembranen, in Abwesenheit von ABPs, liegen in ähnlicher Größenordnung zu denen auf 2.0 mol% PIP₂-haltigen Lipidmembranen.

Zur weiteren Charakterisierung des Einflusses von Aktin-bindenden Proteinen auf das F-Aktinnetzwerkes diente die Analyse der Segmentlängen (vgl. Abs. 3.7.8) mit Hilfe der Software SOAX. In Abbildung 5.17 ist exemplarisch für α -Actinin, Fascin und ohne ABPs ein ausgewertetes Graustufen-Bild (1) dem resultierenden überlagerten Bild (2), welches die detektierten Filamentsegmente pinkfarben kennzeichnet, gegenübergestellt.

Abbildung 5.17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken an festkörperunterstützten Lipidmembranen bestehend aus DOPC/DOEPC/TxR (79.8:20:0.2) in An- oder Abwesenheit von ABPs in 16-bit Graustufen (1) und die dazugehörigen mittels SOAX ausgewerteten Aufnahmen (2), welche die detektierten Filamentsegmente (pink) zeigen. **A:** Ohne Aktinbindendes Protein. **B:** Fascin (G-Aktin/Fascin 10:1). **C:** α -Actinin (G-Aktin/ α -Actinin 20:1). Maßstabsbalken: 5 μ m.

Unter Berücksichtigung der Pixelgröße der Aufnahmen wurden aus den detektierten Filamentsegmenten die Längen quantifiziert. Die Ergebnisse sind anhand eines Boxplots in Abbildung 5.18 dargestellt.

Abbildung 5.18: Boxplots, welche die Segmentlängen der mittels SOAXS detektierten F-Aktinfilamente in Abhängigkeit des Einflusses von Aktin-bindenden Proteinen darstellen. Hierbei repräsentiert die Box die mittleren 50% der Daten, den sogenannten Interquartilsbereich (engl. *interquartile range*, IQR), die waagerechte Linie den Median, das Quadrat innerhalb der Box den Mittelwert und die Antennen sind mit $1.5 \times \text{IQR}$ definiert. Grau: Ohne ABPs, Anzahl der ausgewerteten Aufnahmen $n_{\text{Aufn.}} = 3$. Türkis schraffiert: α -Actinin, $n_{\text{Aufn.}} = 6$. Orange schraffiert: Fascin, $n_{\text{Aufn.}} = 4$. Ein nicht-parametrischer MANN-WHITNEY-U-Test weist signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen mit $***p < 0.001$ nach.

Die Segmentlängen der Filamente werden durch die Gegenwart Aktin-bindender Proteine größer und steigen von $1.5 \pm 1 \mu\text{m}$ (bezogen auf den Mittelwert) auf $3.0 \pm 2 \mu\text{m}$ durch den Einfluss von α -Actinin und auf $3.7 \pm 3 \mu\text{m}$ durch Fascin. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Kreisanalyse der Maschen. Durch die ABPs konnte eine Vergrößerung der Maschen detektiert werden. Größere Maschen in F-Aktinnetzwerken bedeuten weniger Kreuzungspunkte der Filamente und resultieren in größeren Segmentlängen.

Des Weiteren lässt sich beim Vergleich der Maschengrößen und Segmentlängen feststellen, dass α -Actinin im Gegensatz zu Fascin mit F-Aktin Netzwerke signifikant kleinerer Maschengrößen und Segmentlängen ausbildet. Dies stimmt mit den Bindungseigenschaften überein mit welcher diese ABPs F-Aktinnetzwerke verknüpfen. α -Actinin zählt zu den quervernetzenden Proteinen und Fascin zu den bündelnden Proteinen.^{226,232} Demnach würde man für α -Actinin aufgrund der stärkeren Quervernetzung F-Aktinnetzwerke mit kleineren Maschen und Segmentlängen im Vergleich zu Fascin erwarten. Dies konnte anhand der ermittelten Ergebnisse beobachtet werden.

Die Werte für die Segmentlängen des F-Aktinnetzwerkes auf 20 mol% DOEPC-haltigen Lipidmembranen, in Abwesenheit von ABPs, liegen in ähnlicher Größenordnung zu denen auf 2.0 mol% PIP₂-haltigen Lipidmembranen.

Im Rahmen dieser Experimente konnte ein klarer Einfluss von ABPs auf die F-Aktinnetzwerkstruktur *in vitro* bei elektrostatischer Kopplung an Lipidmembranen nachgewiesen werden. Es bildeten sich Netzwerke sehr heterogener Struktur aus, welche gebündelte und quervernetzte Elemente aufwiesen. Generell konnte eine Vergrößerung der Maschen durch Aktin-bindende Proteine beobachtet werden, welche zunächst anhand der Oberflächenbelegung abgeleitet und durch eine Maschenanalyse sowie Segmentlängenbestimmung bestätigt wurde. Darüber hinaus korrelieren die Ergebnisse mit der physiologischen Funktion der eingesetzten ABPs in Zellen. F-Aktin bildet in Gegenwart des quervernetzenden ABPs α -Actinin stärker quervernetzte und demnach engmaschigere Netzwerke mit Filamenten kürzerer Segmentlängen, im Vergleich zum bündelnden Protein Fascin, aus.

Im Rahmen dieses Kapitels konnte gezeigt werden, dass Aktinfilamente an Lipidmembranen Protein-vermittelt und elektrostatisch immobilisiert werden können. Sowohl die Protein-vermittelte (2 mol% PIP₂) als auch die elektrostatische Anbindung (20 mol% DO-EPC) F-Aktins führte (in Abwesenheit von ABPs) zu ähnlichen Maschengrößen und Segmentlängen, welche eine hohe Übereinstimmung in der Netzwerkdichte und -organisation widerspiegeln. Hieraus wird abgeleitet, dass die elektrostatische Ankopplung der Filamente eine physiologische Verknüpfung nachahmen kann.

Die Bindung von nicht-muskulärem F-Aktin über das Linkerprotein Ezrin T567D an PIP₂-haltige festkörperunterstützte Lipidmembranen, zeigt eine Abhängigkeit der Maschengröße und Segmentlänge des F-Aktinnetzwerkes vom Rezeptorlipidgehalt der SLB. Es konnte nachgewiesen werden, dass mit steigendem Rezeptorlipidgehalt die Maschengröße und Segmentlänge des Aktinnetzwerkes, in Korrelation zur erhöhten Netzwerkdichte und Oberflächenbelegung der SLB, abnimmt.

Des Weiteren zeigte die elektrostatische Anbindung muskulärer F-Aktinfilamente an die Lipidmembran eine Abhängigkeit der detektierten Maschengrößen und Segmentlängen von der Gegenwart Aktin-bindender Proteine. Sowohl Fascin als auch α -Actinin führten zu einer Vergrößerung der Maschen und Segmentlängen des F-Aktinnetzwerkes. Darüber hinaus wurde eine heterogenere und komplexere Netzwerkstruktur durch die Aktin-bindenden Proteine induziert.

5.4 Diskussion

In den letzten Jahrzehnten hat sich gezeigt, dass filamentöses Aktin in *in vitro* Studien unter verschiedenen Bedingungen, in Abhängigkeit der Konzentration und von Aktin-bindenden Proteinen unterschiedliche Netzwerkstrukturen ausbildet. Die Morphologie und die damit verbundenen zellulären Funktionen der Netzwerke besser zu verstehen ist Gegenstand aktueller Forschung.^{226,229,234,235} Zwei *in vitro* Ansätze werden in der Literatur häufig verfolgt um F-Aktinnetzwerke untersuchen zu können: Einerseits die Charakterisierung von Netzwerken in F-Aktinlösungen und andererseits Aktinfilamente gebunden an Lipidmembranen. Im Gegensatz zu Untersuchungen in Lösung, in denen sich F-Aktingele und -bündel ausbilden, welche einen 3D-Charakter aufweisen, bietet die Immobilisierung der Filamente an Lipidmembranen den großen Vorteil, dass die Ausdehnung in die dritte Dimension gehindert ist.²³⁰ Somit werden quasi-2D-Systeme generiert, welche leichter zu charakterisieren sind und durch die Immobilisierung an die Lipidmembran eher der zellulären Situation entsprechen.

In der Literatur finden sich drei prinzipielle Vorgehensweisen, um F-Aktin an Lipidmembranen zu binden:²³⁶ 1) durch Proteine (zu unterscheiden sind hier Membran- und Linkerproteine),^{208,236} sowie artifizielle Bindungspartner,^{237,238} 2) durch divalente Kationen^{239,240} und 3) durch positiv geladene Lipide.^{241,242}

Im Rahmen dieses Kapitels wurden F-Aktinnetzwerke einerseits Protein-vermittelt und andererseits elektrostatisch an festkörperunterstützte Lipidmembranen gekoppelt. Anhand dessen konnte sowohl eine Steuerung der F-Aktinnetzwerkdichte über den Rezeptorlipidgehalt der Membran, als auch der Einfluss von Aktin-bindenden Protein auf die Netzwerkstruktur untersucht werden.

5.4.1 Protein-vermittelte Immobilisierung von Aktinfilamenten

Zur Protein-vermittelten Immobilisierung wurden F-Aktinnetzwerke über das Linkerprotein Ezrin an PIP₂-haltige festkörperunterstützte Lipidmembranen gebunden. Es wurde festgestellt, dass mit steigendem PIP₂-Gehalt die Dichte des F-Aktinnetzwerkes aufgrund der erhöhten Anzahl an Ezrinmolekülen als Bindungspartner zunimmt. Dies wurde anhand einer abnehmenden Maschengröße, zunehmenden F-Aktinoberflächenbelegung und abnehmenden Segmentlänge der Filamente bei steigendem PIP₂-Gehalt nachgewiesen. Neben Ezrin existieren viele bekannte Aktin-bindende, membrangekoppelte Proteine.²⁴³ Die Linkerproteine Talin und Hisactophillin wurden am umfassendsten, hauptsächlich an

Lipidmonoschichten, untersucht. Talin ist in der Lage F-Aktin an Lipidmembranen bestehend aus Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylcholin (PC) zu binden.²⁴⁴ Hisactophilin hingegen bindet sowohl an PIP₂ und als auch an Phosphatidylglycerol (PG) in der Lipidmembran.²⁴⁵ Eine der wenigen *in vitro* Untersuchungen von Aktinfilamenten, welche physiologisch über das Membranprotein Ponticulin an eine planare Lipiddoppelschicht verknüpft wurden, führten BARFOOT *et al.* durch.²³⁶ Hierzu spreiteten sie PC-Vesikel unter anderem auf Siliciumdioxid-Siliciumwafern oder Mica-Substraten. Neben oberflächensensitiven Techniken, wie SPR (engl. *surface plasmon resonance*) und QCM-D (engl. *quartz crystal microbalance with dissipation*), führten sie auch rasterkraftmikroskopische Untersuchungen durch.

Hierzu wurde Phalloidin-stabilisiertes F-Aktin über Ponticulin an die Lipidmembran gebunden. Aus den AFM-Höhenbildern ermittelten sie sowohl die helikale, halbe Ganghöhe der Filamente (37.3 ± 1.1 nm), als auch die durchschnittliche Filamenthöhe (7.0 ± 1.6 nm). Die gemessenen Werte liegen in guter Übereinstimmung zu den in der Literatur akzeptierten Werten, mit einem Filamentdurchmesser von 7-10 nm und einer halben Filamentganghöhe von 36 nm.^{246, 247}

Eine häufig eingesetzte Alternative zur Verknüpfung von F-Aktin über physiologische ABPs an Lipidmembranen, ist die artifizielle Kopplung der Filamente über eine Biotin-Avidin Wechselwirkung. Hier erfolgt die Kopplung in der Regel über einen Anteil an biotinyliertem Lipid und biotinyliertem Aktin, vermittelt durch Streptavidin/Neutravidin.^{238, 240, 248, 249} HONIGMANN *et al.* zeigten, ähnlich zu den vorliegenden Ergebnissen, dass mit zunehmendem Anteil an biotinyliertem Lipid in der Membran auch die F-Aktinnetzwerkdichte anstieg. Hierzu präparierten sie auf Mica-Substraten fluide Membransysteme bestehend aus DOPC/DOPE-Biotin (vgl. Abb. 5.19).²⁴⁹

Abbildung 5.19: Biotin-Streptavidin-Aktin Modellsystem, welches fluoreszenzmikroskopisch eine positive Korrelation zwischen der Aktinnetzwerkdicke und dem biotinylierten Lipid zeigt. **A:** Schematische Darstellung des Modellsystems. **B-D:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Aktinnetzwerkdicke in Abhängigkeit des biotinylierten Lipids. Rechts ist die überlagerte Darstellung mit der DPPE-KK14-markierten Lipidmembran gezeigt. ©^{249,250}

Im ersten Teil dieses Kapitels wurde auf ähnliche Weise die F-Aktinnetzwerkdicke durch den Rezeptorlipidgehalt (PIP_2) der Membran gesteuert. Bewusst wurde allerdings eine physiologisch relevante Verknüpfung Aktins über das Linkerprotein Ezrin gewählt. Denn mit einer Dissoziationskonstante von $K_D \approx 0.01 \text{ pM}$ ist die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin eine der stärksten nicht-kovalenten Wechselwirkungen in der Natur.²⁵¹ Die Dissoziationskonstante von Ezrin bezüglich artifizieller, PIP_2 -haltiger Lipidmembranen liegt hingegen im nanomolaren Bereich und spiegelt die Möglichkeit von dynamischen Prozessen wider.²⁰⁸ Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass mit steigendem PIP_2 -Gehalt der Lipidmembran die Dichte des F-Aktinnetzwerkes, aufgrund der erhöhten Anzahl an Ezrinmolekülen als Bindungspartner, zunimmt. Auch in der Zelle werden über die lokale PIP_2 -Dichte/-Synthese Plasmamembran-Zytoskelett-Interaktionen reguliert.¹¹ So führt eine erhöhte PIP_2 -Konzentration in der Zelle zu einer gesteigerten Aktinpolymerisation und umgekehrt führt eine Verarmung an PIP_2 zur Depolymerisation und Ablösung von F-Aktin.²⁵² Auch Linkerproteine wie Ezrin steuern die Verknüpfung von Plasmamembran und Zytoskelett. In Genexperimenten an Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Ezrin eine gestörte Morphogenese der intestinalen Mikrovilli hervorruft und

zum Tod der Mäuse führte.²⁵³ Hieraus lässt sich ableiten, dass eine fehlende Verknüpfung zwischen Membran und Zytoskelett durch Ezrin, zur strukturellen Veränderungen führte und Ezrin demnach direkt die Ausbildung von Aktinnetzwerken steuern kann.

F-Aktinbindefähigkeit in Abhängigkeit der Pseudophosphorylierung Ezrins

Die F-Aktinbindungsstudie zeigte, dass an PIP₂ gebundenes Ezrin in Abhängigkeit der Phosphorylierung des Threoninrests 567 in unterschiedlichem Ausmaß F-Aktin bindet. Der Ezrinwildtyp wies in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen eine geringe bis nicht detektierbare F-Aktinbindefähigkeit auf. Die pseudophosphorylierte Ezrinmutante T567D hingegen zeigte eine ausgeprägte F-Aktinbindefähigkeit.

Das Ausmaß der einzelnen Beiträge von Phosphorylierung und PIP₂-Bindung auf die Aktivierung Ezrins, und somit dem Wechsel in eine geöffnete Konformation, ist weiterhin kontrovers diskutiert. Insgesamt findet man häufig die Aussage, dass die F-Aktinbindefähigkeit, begründet in der Dissoziation von N- und C-Terminus Ezrins durch alleinige Phosphorylierung nicht oder nur eingeschränkt gegeben ist.^{146,213} So diskutieren sowohl MANITI *et al.* als auch CARVALHO *et al.* einen allein durch PIP₂-Bindung induzierten Konformationswechsel Ezrins.^{212,254}

BOSK *et al.* charakterisierten schon 2011, in sehr ähnlicher Vorgehensweise zu den vorliegenden Experimenten, die F-Aktinbindefähigkeit von Ezrin in Abhängigkeit der Phosphorylierung und PIP₂-Bindung an festkörperunterstützten Lipidmembranen (POPC/PIP₂ 9:1) mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie.²⁰⁸ Hier konnte gezeigt werden, dass die PIP₂-Bindung eine notwendige Voraussetzung für die C-terminale Bindung F-Aktins ist. Darüber hinaus spielte auch die Phosphorylierung eine bedeutende Rolle. Ezrin wt zeigte, im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen, mit einer Oberflächenbelegung an F-Aktin von $49 \pm 27\%$ schon eine deutliche F-Aktinbindefähigkeit, welche durch Einsatz von Ezrin T567D nochmals erheblich auf $93 \pm 11\%$ Belegungsdichte gesteigert werden konnte. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Bindefähigkeit des Ezrin wt, könnte in verschiedenen präparativen Vorgehensweisen, wie den unterschiedlichen Spreitbedingungen, begründet liegen (vgl. Abs. 4.2.1). Ein weiterer Unterschied zum vorliegenden System stellt die Phalloidinstabilisierung der Aktinfilamente in den Studien von BOSK *et al.* dar. Phalloidin setzt die kritische G-Aktinkonzentration zur Polymerisation herab und verhindert die Depolymerisation der Filamente.^{61,62} Dies führt zur Ausbildung stabiler, sehr dicht verwobener Aktinnetzwerke. Im Rahmen der Studien an festkörperunterstützten Lipidmembranen wurde auf eine Phalloidinstabilisierung, aufgrund der starken Beeinflussung der Aktinnetzwerkdichte,

verzichtet. Nur in Abwesenheit von Phalloidin war es möglich die filamentöse Struktur der Aktinnetzwerke fluoreszenzmikroskopisch zu detektieren.

Darüber hinaus zeigten BRAUNGER und BRÜCKNER *et al.* in kraftspektroskopischen, kolloidalen Sondenexperimenten, dass die PIP₂-Bindung allein eine vermehrte Bindung an F-Aktin ermöglicht.²⁵⁵ Die Phosphorylierung spielte hier nur eine untergeordnete Rolle, dies wurde aus ähnlichen Adhäsionskräften und -energien für Ezrin wt und Ezrin T567D in Abwesenheit von PIP₂ abgeleitet. Es wurde postuliert, dass aufgrund der ähnlich hohen gemessenen Bindungskräfte (≈ 50 pN) zwischen F-Aktin und Ezrin, unabhängig vom Aktivierungsgrad des Proteins, die Anzahl der Bindungen entscheidend ist. Durch den aktivierenden Einfluss von PIP₂, steigen sowohl für Ezrin wt als auch für Ezrin T567D die kumulativen Adhäsionsenergien. Dies bedeutet eine steigende Anzahl an Bindungen zu F-Aktin, welche auf ein Vorliegen vermehrt geöffneter Ezrinkonformationen durch PIP₂-Bindung schließen lassen. Eine vergleichbare F-Aktinbindefähigkeit in Bezug auf Ezrin wt und Ezrin T567D in Gegenwart von PIP₂ kann auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden.

F-Aktinbindefähigkeit Ezrins in Abhängigkeit der Aktinisoform

Im Rahmen der F-Aktinbindungsstudie wurde im Fall der Ezrinmutante T567D getestet, ob eine Aktinisoformspezifität vorliegt. Hier konnte gezeigt werden, dass unter den gegebenen Bedingungen keine präferierte Bindung Ezrins zum physiologisch relevanten, nicht-muskulären β -/ γ -Aktin gegenüber dem muskulären α -Aktin erfolgte.

Nachdem Ezrin erstmals 1983 an der apikalen Zelloberfläche in Mikrovilli und Membraneinstülpungen lokalisiert und hieraus aufgereinigt wurde, wurde die F-Aktinbindefähigkeit des Proteins über 10 Jahre hinweg kontrovers diskutiert.^{14,256} Erst Arbeiten von TURUNEN *et al.* aus 1994 und von SHUSTER und HERMAN aus 1995 zeigten eine C-terminale Bindung Aktins an Ezrinkonstrukte.^{23,257}

Aufgrund der Lokalisation von Ezrin in nicht-muskulären Zellen, wurde auch eine mögliche Aktinisoformspezifität untersucht.¹⁴ Die Isoformen Aktins werden in muskulären und nicht-muskulären Zellen zeitlich und räumlich reguliert exprimiert. Dadurch erscheint es wahrscheinlich, dass die Aktinisoformen unterschiedliche strukturelle und biochemische Eigenschaften ausweisen. Sechs verschiedene Isoformen werden häufig genannt, welche sich untereinander zum Teil nur in wenigen Aminosäuren, bevorzugt am N-Terminus, unterscheiden.²²⁷ Die quergestreift-muskulären Aktinformen: α -skelettartig und α -kardial; die glatt-muskulären Aktinformen: α -vaskulär und γ -viszeral; sowie

die nicht-muskulären Aktinformen: β und γ .²³² In Bezug auf die Isoformspezifität finden sich widersprüchliche Ergebnisse. SHUSTER und HERMAN fanden auf Grundlage affinitätschromatographischer Untersuchungen eine bevorzugte Assoziation zwischen Ezrin und β -Aktin, aber keine zu α -Aktin.²⁵⁷ YAO *et al.* wiesen eine bevorzugte Bindung gastrischen Ezrins von β -Aktin gegenüber α -Aktin mit Hilfe von Kosedimentationsexperimenten nach.²⁵⁸ Im Gegensatz hierzu arbeiteten ROY *et al.* erstmals mit rekombinantem Ezrin aus *E. coli* und zeigten, ähnlich zu den vorliegenden Ergebnissen, dass Ezrin in der Lage ist sowohl α -Aktin als auch β -/ γ -Aktin zu binden. Sie begründen die widersprüchlichen Ergebnisse zur Aktinisoformspezifität Ezrins in den unterschiedlichen Ezrinquellen und möglichen, damit verbundenen, post-translationalen Veränderungen, sowie der Durchführung unterschiedlicher Analysemethoden.²⁵⁹

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ezrin T567D sowohl nicht-muskuläres als auch muskuläres Aktin bindet. Eine Aktinisoformspezifität in Form einer höheren Bindungsaffinität konnten nicht festgestellt werden, was in Bezug auf die Literatur zu erwarten gewesen wäre. Aufgrund unterschiedlicher Methodiken und Bedingungen, können die Unterschiede zum Beispiel in der Proteinquelle, fehlenden post-translationalen Veränderungen und der unterschiedlichen physiologischen Relevanz begründet sein. Hierzu sei anzumerken, dass eine Lipidmembran-gekoppelte Charakterisierung (wie hier durchgeführt) der Aktinisoformspezifität Ezrins physiologisch relevanter ist, als die Methodiken in der vorgestellten Literatur.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde der physiologische Bindungspartner β -/ γ -Aktin im Zusammenhang mit Ezrin verwendet. Der Einsatz von muskulärem α -Aktin bei der direkten, elektrostatischen Verknüpfung an DOEPC-haltige Lipidmembranen ist der Tatsache geschuldet, dass sich hier präparative Vorteile in der Polymerisation ergeben. Diese Unterschiede zeigten sich besonders deutlich in *in vitro*-Experimenten bei reduzierter Temperatur. Muskuläres F-Aktin polymerisiert im Gegensatz zu nicht-muskulärem Aktin *in vitro* deutlich effizienter und verschiebt das Gleichgewicht stärker in Richtung des Polymers.²²⁷ Des Weiteren binden viele Aktinmonomer-bindende Proteine mit höherer Affinität an nicht-muskläres Aktin im Vergleich zu muskulärem Aktin.^{260,261} Auch dies lässt auf Unterschiede im Monomer-Polymer-Gleichgewicht zwischen muskulärem und nicht-muskulärem Aktin schließen und eine höhere Stabilität der Polymerform im Fall von muskulärem Aktin erwarten.

5.4.2 Elektrostatische Immobilisierung von Aktinfilamenten

Die elektrostatische Anbindung muskulärer F-Aktinfilamente an DOEPC-haltige Lipidmembranen (20 mol% DOEPC) führte zur Ausbildung ähnlicher Aktinnetzwerke im Vergleich zur Protein-vermittelten (2 mol% PIP₂) Aktinbindung. Abgeleitet wurde dies anhand ähnlicher Maschengrößen und Segmentlängen, welche eine hohe Übereinstimmung in der Netzwerkdicke und -organisation widerspiegeln. Hieraus wurde abgeleitet, dass die elektrostatische Anknüpfung der Filamente geeignet ist, um eine physiologische Verknüpfung nachzuahmen.

Die elektrostatische Verknüpfung von Aktinfilamenten mit Hilfe von positiv geladenen Lipiden und Tensiden an Lipidmembranen ist in der Literatur weit verbreitet. Erstmals nutzten diese Art der Kopplung RIOUX und GICQUAUD 1985, um F-Aktin an der positiv geladenen Oberfläche von Vesikeln zu assemblieren.²⁶² Hierzu nutzten sie das Tensid Stearylamin (SA) und konnten darüber hinaus zeigen, dass die positive Ladung des Tensids eine Polymerisation Aktins unter Niedrigsalz-Bedingungen initiieren kann.²⁶³ Dieses Protokoll wurde von der gleichen Arbeitsgruppe auch auf Experimente an Lipidmonoschichten übertragen, welche zeigten, dass das Ausmaß der Aktinadsorption mit der Konzentration an Stearylamin korreliert.²⁴¹

Weitere interessante Studien führten DEMÉ *et al.* mittels Filmwaage- und Neutronenreflektivitätsexperimenten durch. Sie konnten nachweisen, dass globuläres Aktin (G-Aktin) nicht an positiv geladene 1,2-Dimyristoyl-3-trimethylammoniumpropan (DMTAP)-Lipidmembranen bindet.²³¹ Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die durchgeführten Experimente, denn demnach würde eine unvollständige Polymerisation oder eine Depolymerisation das Ergebnis bezüglich der F-Aktinbindefähigkeit (durch G-Aktin blockierte Bindungsstellen) nicht verfälschen.

Des Weiteren führten DEMÉ *et al.* theoretische Überlegungen durch und berechneten die maximale Oberflächenbelegung Θ einer reinen DMTAP-Lipidmembran mit einer perfekt gepackten Monolage an F-Aktin. Sie ermittelten einen Wert von $\Theta = 37\%$.²³¹ Im Rahmen der reflektometrischen interferenzspektroskopischen Messungen wurde eine optische Schichtdickenänderung von 2.1 ± 0.4 nm nach F-Aktinbindung an eine DOEPC-haltige SLB detektiert. Hieraus ergibt sich unter Berücksichtigung des Brechungsindex eines Proteinlayers von $n_{\text{Prot}} = 1.455$ eine physikalische Schichtdicke von $d_{\text{Aktin}} = 1.4 \pm 0.3$ nm für F-Aktin.⁷⁸ Bei Annahme eines Durchmessers von 7 nm für ein Aktinfilament ergibt sich bei einer Oberflächenbelegung von 37% eine theoretische physikalische Schichtdicke von 2.6 nm für eine F-Aktinmonoschicht. Bezieht man dies auf die gemessene

physikalische Schichtdicke ($d_{\text{Aktin}} = 1.4 \text{ nm}$) so ergibt sich eine Oberflächenbelegung von 20%.

Die maximale Oberflächenbelegung wurde allerdings für eine pure, aus positiven Lipiden bestehende Membran berechnet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Rezeptorlipidgehalt von 20 mol% des positiv geladenen Lipids verwendet. Im Rahmen der Dissertation von D. MORICK konnte gezeigt werden, dass die maximale Oberflächenbelegung mit F-Aktin bei diesem Rezeptorlipidgehalt noch nicht erreicht ist.¹²³ Somit kann die maximale Oberflächenbelegung von $\Theta = 37\%$ in dem vorliegenden System nicht erreicht werden.

HEATH *et al.* führten systematische, rasterkraftmikroskopische Studien an DOPC- beziehungsweise DPPC-Lipidmembranen durch, welche einen variierenden Anteil des positiv geladenen artifiziellen Lipids 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP) beziehungsweise des positiv geladenen artifiziellen Lipids 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholin (DPEPC) (0-30 mol%) beinhalten. Sie bestätigten die Beobachtung von LALIBERTE *et al.*, dass die positive Ladung der SLBs eine Polymerisation G-Aktins unter Niedrigsalz-Bedingungen induzieren kann.^{242,263} Des Weiteren zeigten sie eine pH-Wert-Abhängigkeit der Polymerisation und im Rahmen dessen ein vermehrtes Auftreten von überschüssigem Lipidmaterial. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte im Rahmen der F-Aktinbindungsstudien an positiv geladene SLBs eine Zunahme an überschüssigem Lipidmaterial nach F-Aktinbindung an die Lipidmembran beobachtet werden (vgl. Abb. 5.12). HEATH *et al.* halten das Herauslösen von Lipidmaterial aus der unterliegenden Membran durch die Aktinpolymerisation für wahrscheinlich. Im Gegensatz hierzu wurden in diesem Abschnitt der Arbeit Filamente nicht *in situ* polymerisiert, sondern vopolymerisiert und es konnte das gleiche Phänomen beobachtet werden. Somit scheint die Kopplung der Filamente selbst an die positiv geladenen SLBs zu einem Herauslösen von Lipidmaterial zu führen. Neben dem Herauslösen von Lipidmaterial, welches ein verstärktes Auftreten von Lipidmembrandefekten induzieren würde (konnte in diesem Ausmaß nicht beobachtet werden), ist die Rekrutierung von wenig freiem Lipidmaterial an die Membran durch die Filamente eine weitere Erklärung.

Einfluss von Aktin-bindenden Proteinen auf die F-Aktinnetzwerkstruktur

Die Charakterisierung des Einflusses der Aktin-bindenden Proteine Fascin und α -Actinin zeigte, dass bei der elektrostatischen Anbindung der F-Aktinfilamente die Gegenwart von ABPs zu Netzwerken mit größeren Maschen und Segmentlängen führten. Darüber hinaus

wurde eine heterogenere und komplexere Netzwerkstruktur durch die Aktin-bindenden Proteine induziert.

Diese Heterogenität in der F-Aktinnetzwerkorganisation ist Grundlage dafür, dass F-Aktin innerhalb der Zelle unterschiedliche Funktionen ausüben kann.²²⁶ Der Zellkortex, welcher hauptsächlich aus Aktinfilamenten in Verbindung mit Myosin-Motorproteinen und Aktin-bindenden Proteinen (ABPs) aufgebaut ist, weist eine große strukturelle Vielfalt auf.²⁶⁴ Die Quervernetzung der Filamente ist zum Beispiel wichtig für die Aufrechterhaltung der Zellform und deren mechanischer Stabilität.²⁶⁵ Gebündelte F-Aktinfilamente hingegen unterstützen und verursachen Membranausstülpungen, wie Mikrovilli und Filopodien.^{225, 266}

Die Konstruktion solcher F-Aktinnetzwerkstrukturen erfordert spezifische Aktin-bindende Proteine. Aufgrund der Vielzahl an ABPs und deren gleichzeitiger Lokalisierung im Zytoskelett ist eine aussagekräftige Korrelation zwischen einem Aktin-bindenden Protein und der Netzwerkmorphologie nicht möglich.²²⁶ Daher eignen sich sogenannte *Bottom-up* Ansätze, wie in der vorliegenden Arbeit, um in wohldefinierten *in vitro* Systemen die F-Aktinnetzwerkvielfalt systematisch zu ergründen.

LIELEG *et al.* untersuchten detailliert den Einfluss von ABP-Konzentration und ABP-Masse auf die Aktinnetzwerkstruktur in Lösung). Sie beobachteten, dass kleinere Aktin-bindende Proteine, wie Fascin, Aktinfilamente eher parallel bündeln und größere ABPs, wie α -Actinin, ein komplexeres Phasenverhalten induzieren, welches von quervernetzten Filamenten, zu gebündelten Filamenten bis hin zu einer Mischung aus Beidem reicht.²²⁶ Dies steht im Einklang mit den in dieser Arbeit beobachteten Netzwerkstrukturen. Sowohl für Fascin, als auch für α -Actinin wurden Aktinnetzwerke sehr heterogener Struktur detektiert (vgl. Abb. 5.14).

Für α -Actinin konnten Cluster-ähnliche Strukturen beobachtet werden (vgl. Abb. 5.14B2), welche demnach durch hohe lokale Konzentrationen begünstigt werden.

Fascin hingegen ist dazu in der Lage, auch gemischte Netzwerke auszubilden (vgl. Abb. 5.14A2). Die Ergebnisse lassen zwei unterschiedliche Einflüsse auf die Netzwerkstruktur erkennen, welche das gleichzeitige, unterschiedlich lokalisierte Vorliegen von Quervernetzung und Bündelung der F-Aktinfilamente durch Fascin erklären. Einerseits die elektrostatische Kopplung an die Lipidmembran, welche aufgrund von Verknüpfungspunkten eine gewisse Struktur induziert und andererseits der Einfluss der ABPs, welcher anhand veränderter Maschengrößen und Segmentlängen nachgewiesen wurde.

SCHALLER *et al.* postulierten 2013, dass Fascin *in vitro* Netzwerke ausbildet, bestehend aus gebündelten Filamenten, welche untereinander mit F-Aktin quervernetzt sind.²³⁴

Ähnliche Ergebnisse erzielten TSENG *et al.* und PELLETIER *et al.* bei der *in situ* Polymerisation von G-Aktin in Gegenwart von Fascin beziehungsweise α -Actinin. Hier bildete Fascin in Lösung, bestehend aus 24 μM G-Aktin und 2.4 μM Fascin (10:1, identisch zu dieser Arbeit), ein Aktinnetzwerk aus rigiden Bündeln, welches über die Zeit anwuchs und eng verknüpfte.²³⁵ In vergleichbarer Weise organisierte α -Actinin Aktin zu Filamentbündeln, welche isotropisch quervernetzt mit wohldefinierter Maschengröße von ungefähr 5 μm waren. Das Verhältnis von G-Aktin zu α -Actinin lag in diesem Fall mit 25:1 in vergleichbarer Höhe zu den vorliegenden Bedingungen mit 20:1.²²⁹

Der von PELLETIER *et al.* abgeschätzte Wert für die Maschengröße von ungefähr 5 μm , ist im Vergleich zu der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Maschengröße für F-Aktin/ α -Actinin Netzwerke mit 0.74 μm (bezogen auf den mittleren Kreisdurchmesser) deutlich größer. Die Unterschiede lassen sich auf die verschiedenen F-Aktinnetzwerksysteme zurückführen, welche F-Aktinfilamente in Lösung, Lipidmembran-gebunden Aktinfilamenten gegenüberstellt. Im Fall der Lipidmembranen kann die elektrostatische Immobilisierung der Aktinfilamente einen weiteren Einfluss auf die Netzwerkstruktur haben.

Im Vergleich zum zellulären System erscheint die von PELLETIER *et al.* bestimmte Maschengröße recht groß. In Zellen werden typischerweise Maschengrößen von 20-250 nm gefunden.²⁶⁴ Dies rückt die im Rahmen der Arbeit ermittelten F-Aktinnetzwerkmaschengrößen, welche sich in einem Bereich von 400-1200 nm bewegen, in eine physiologisch relevante Größenordnung.

5.4.3 Quantitative Beschreibung von F-Aktinnetzwerken

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur quantitativen Beschreibung von F-Aktinnetzwerken sowohl die Maschengrößen als auch die Segmentlängen der Netzwerke bestimmt. Bei der Protein-vermittelten Kopplung von F-Aktinnetzwerken über Ezrin an PIP₂-haltige (1-3 mol% PIP₂) festkörperunterstützte Lipidmembranen konnten Maschengrößen von 0.4-0.8 μm und Segmentlängen von 1.5-1.9 μm bestimmt werden. Die elektrostatische Bindung von Aktinfilamenten an SLBs bildete Netzwerkstrukturen mit Maschengrößen von $0.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ und Segmentlängen von $1.5 \pm 1 \mu\text{m}$ in Abwesenheit von Aktin-bindenden Proteinen aus. Aktin-bindende Protein veränderten die Netzwerkmorphologie und so konnten für Netzwerke bestehend aus α -Actinin/Aktin (1:20) Maschengrößen von $1.0 \pm 1 \mu\text{m}$ und Segmentlängen von $3.0 \pm 2 \mu\text{m}$ und für Fascin/Aktin (1:10) Maschengrößen

ßen von $1.2 \pm 1 \mu\text{m}$ und Segmentlängen von $3.7 \pm 3 \mu\text{m}$ bestimmt werden.

Eine der ersten Arbeiten zur Bildanalyse bei der Computer-assistiert Informationen über ein Netzwerk quantifiziert werden konnten, wurde 1995 von BARADET *et al.* entwickelt.²⁶⁷ Seitdem wird intensiv an halb- oder vollautomatisierten Bildanalysen von Netzwerkstrukturen geforscht. Es wurden unterschiedliche mathematische Herangehensweisen entwickelt auf denen die jeweilige Auswertemethode basiert.^{268–271} Hierzu zählt der sogenannte SOAC (engl. *stretching open active contours*)-Ansatz, bei welchem initialisierte SOACs entlang der helleren Zentrallinie der Filamente wachsen indem sie eine Energiefunktion minimieren.^{111,272} Basierend auf diesem Ansatz entwickelten XU *et al.* die vollautomatisierte, frei erhältliche, in dieser Arbeit angewandte Software SOAX, welche es ermöglicht Parameter wie Länge, Orientierung, Kreuzungspunkte von Filamenten, aus Aufnahmen von 2D- und 3D-Netzwerken zu extrahieren.¹¹⁰

Methoden zur Auswertung von dreidimensionalen Netzwerkaufnahmen sind zwangsläufig aussagekräftiger und liefern mehr Informationen bezüglich der zellulären Situation, zum Beispiel zur räumlichen Orientierung der Filamente, im Vergleich zu zweidimensionalen Teilaufnahmen. Allerdings ist diese Art der Auswertung hoch komplex, zeitaufwändig und anspruchsvoll.^{273,274} In der Literatur finden sich zwei Lösungsstrategien: Einerseits kann die 3D-Stapelaufnahme in eine 2D-Projektion umgewandelt werden und andererseits die einzelnen quasi-zweidimensionalen Schichtaufnahmen, auf denen die 3D-Stapelaufnahme beruht, separiert ausgewertet werden. Der erste Lösungsansatz stellt eine harsche Näherung dar und verliert bei der Umwandlung in die 2D-Projektion wichtige Informationen über räumliche Merkmale des Netzwerkes. MOLTENI *et al.* optimierten den zweiten Ansatz in dem sie eine 2D-Auswertung einzelner Schichtaufnahmen zur Maschenanalyse des Netzwerkes durchführten und diese anschließend dreidimensional rekonstruierten.²⁷⁴

Diese Art der Maschenanalyse ist in der Literatur noch wenig verbreitet. Häufig wurde die Maschengröße aus Partikelverfolgungsmessungen (engl. *single/multiple particle tracking*) in Aktinellen abgeleitet. Die Auswertung basiert auf den Unterschieden im Diffusionsverhalten von Partikeln verschiedener Größe. Anhand der eingesetzten Partikelgrößen, kann die ungefähre Maschengröße ζ abgeleitet werden, welche sich für reine F-Aktinelle mit einer Konzentration von 0.1 mg/mL im Bereich von $\zeta \approx 1 \mu\text{m}$ bewegt.^{275,276} Die Maschengröße einer verwobenen F-Aktinlösung ist abhängig von der G-Aktinkonzentration und es gibt sich näherungsweise folgender Zusammenhang:^{276,277}

$$\zeta \approx \frac{0.3}{\sqrt{c_A}}. \quad (5.1)$$

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei Experimenten mit vorpolymerisierten Aktinlösungen an DOEPC-haltigen SLBs in Abwesenheit von Aktin-bindenden Proteinen mit einer Konzentration von $c_A = 0.36 \text{ mg/mL}$ gearbeitet. Nach der Näherung 5.1 ergibt sich hieraus eine Maschengröße von 500 nm, welche im Rahmen dieser Arbeit tatsächlich auf 500 nm bestimmt wurde. Die Werte sind identisch, obwohl hier ein 3D-Netzwerk mit einem quasi-2D-Netzwerk verglichen wird und es ließe sich vermuten, dass unter gleichen Bedingungen vorpolymerisiertes Aktin in Lösung und immobilisiert an Membranen eine ähnlich Netzwerkstruktur aufweist. In den vorliegenden Experimenten konnte allerdings über die Variation des Rezeptorlipidgehalts in der SLB auch die Aktinnetzwerkdichte variiert werden und es wurde keine Stabilisierung der Aktinfilamente mittels Phalloidin vorgenommen. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die elektrostatische Kopplung des 3D-Netzwerkes an eine Lipidmembran einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Netzwerkorganisation bezüglich der Maschengröße und Segmentlängen eines vorpolymerisierten F-Aktinnetzwerkes hat.

Des Weiteren finden sich in der Literatur *in vitro* Untersuchungen zur Persistenzlängenbestimmung von Aktinfilamenten. Diese werden häufig unter wenig physiologischen Bedingungen durchgeführt, um separierte Filamente außerhalb einer Netzwerkstruktur analysieren zu können. Hier finden sich zum Beispiel fluoreszenzmikroskopische Arbeiten von OTT *et al.* und ISAMBERT *et al.* welche die Persistenzlänge von F-Aktin unter stabilisierenden und nicht-stabilisierenden Bedingungen zu 9-17 μm bestimmt haben.^{278,279}

Mit Hilfe der Kryoelektronentomographie visualisierten RIGORT *et al.* einzelne Aktinfilamente in einer physiologischen, dreidimensionalen Zellumgebung (*Dictyostelium discoideum* Zellen).²⁷³ Sie analysierten die Persistenzlängen der Filamente anhand der von ihnen optimierten und automatisierten Segmentierungsmethode in drei verschiedenen Zellstrukturen: Stressfasern (3.7 μm), Zellausstülpungen (2.9 μm) und Filopodien (2.4 μm). Die Autoren weisen darauf hin, dass ihre Werte deutlich unter den bekannten (oben genannten) Werten liegen und führen dies auf die "überfüllte Umgebung" innerhalb von Zellen zurück, welche Einfluss auf die Persistenzlänge haben kann. Hieraus lässt sich schließen, dass die Autoren durch Überlappung und Kreuzung von Filamenten eine Unterbestimmung der Persistenzlänge (in Richtung einer Segmentlänge) vermuten.

PODOLSKI *et al.* diskutierten diese Problematik wie folgt: Die Länge von Filamenten sei sowohl im kortikalen Netzwerk als auch in Bündelstrukturen schwer bestimmbar. Es sei meistens nicht eindeutig ermittelbar ob ein Filament nur von einem Anderen gekreuzt würde oder tatsächlich ende.²⁸⁰ Um diese Schwierigkeiten zu umgehen werden in dichten Netzwerkstrukturen häufig nicht die Persistenzlängen, sondern Segmentlängen (oder Konturlänge), dass heißt die Länge zwischen zwei Kreuzungspunkten eines Filaments, bestimmt.²⁸¹⁻²⁸³

HARTWIG *et al.* und RUBINO *et al.* ermittelten aus invasiven, elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Zytoskeletts von Lungenmakrophagen beziehungsweise Amöben (*Dictyostelium discoideum*) Segmentlängen der Aktinfilamente im Bereich von 100-200 nm.^{281,282} MEDALIA *et al.* analysierten ebenfalls die Aktinfilamentorganisation in *Dictyostelium discoideum* Zellen.²⁸⁴

Sie arbeiteten hingegen unter nicht-invasiven Bedingungen und ermittelten aus elektronentomographischen Aufnahmen Segmentlängen von 400-500 nm.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Segmentlängen für F-Aktinnetzwerke immobilisiert an festkörperunterstützten Lipidmembranen mit variierendem Rezeptorlipidgehalt und in An- und Abwesenheit von Aktin-bindenden Proteinen im Bereich von wenigen Mikrometern (1.5-3.7 μm) bestimmt und liegen in ähnlicher Größenordnung zu den von RIGORT *et al.* angegebenen Filamentlängen.²⁷³ Obwohl das in dieser Arbeit untersuchte *in vitro* System nicht die Komplexität zellulärer Strukturen erfasst, liegen die ermittelten Werte in einer physiologisch relevanten Größenordnung und ermöglichen somit eine ausreichende Rekonstruktion der physiologischen Situation.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bezüglich der F-Aktinnetzwerkorganisation an festkörperunterstützten Lipidmembranen spiegeln wichtige Eigenschaften des kortikalen Zytoskeletts anhand eines *in vitro* Systems wider. Sowohl die bestimmten Maschengrößen als auch Segmentlängen der Aktinnetzwerke, bewegen sich in einem physiologisch relevanten Bereich. Anhand des Modellsystems konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an Verknüpfungspunkten mit der Lipidmembran und die Gegenwart von Aktin-bindenden Proteine die F-Aktinnetzwerkdichte reguliert. Dies trägt zum Verständnis der Regulation der F-Aktindichte in Zellen bei, welche die Morphologie und Topologie von Aktinnetzwerken bestimmt. Auf Grundlage der Ergebnisse ist es möglich Verknüpfungparameter in *in vitro*-Aktinnetzwerken zu steuern, um präzise Modellsysteme zu entwickeln, welche das komplexe Zytoskelett der Zelle besser beschreiben.²⁸⁵

6 Einfluss von F-Aktin auf die Mechanik porenüberspannender Lipidmembranen

6.1 Einleitung

Die Plasmamembran der Zelle besitzt neben ihrer strukturgebenden Rolle auch wichtige mechanische Eigenschaften. Viele biologische Zellfunktionen gehen einher mit Membrandeformationen wie Endo- und Exozytose, Zellmigration sowie Interaktionen mit dem Zytoskelett.^{286,287} Um diese fundamentalen Prozesse und die damit verbundenen mechanischen Parameter besser verstehen zu können, müssen diese sowohl in Zellexperimenten als auch in *in vitro* Experimenten untersucht und charakterisiert werden. Aufgrund der heterogenen Organisation der Plasmamembran und des darunter liegenden F-Aktinzytoskeletts ist das Verständnis der Membranmechanik sowohl auf der Mikrometerskala als auch auf Nanometerskala (in Größenordnung der F-Aktinmaschengrößen 20-250 nm) notwendig.²⁶⁴

Hierzu wurden unterschiedliche Modellsysteme entwickelt, um die Eigenschaften zellulärer Membranen zu studieren. Festkörperunterstützte Lipidmembranen zeichnen sich durch ihre hohe Stabilität aus. Die Notwendigkeit des Festkörpers ist gleichzeitig der größte Nachteil des Systems, denn im Gegensatz zu natürlichen Membranen ist nur eine Seite zugänglich und die mechanischen Eigenschaften der Lipidmembranen werden dominiert durch den darunter liegenden Festkörper.²⁸⁸

Diese Problematik kann durch die Verwendung von riesigen, unilamellaren Vesikeln (engl. *giant unilamellar vesicles*, GUVs) umgangen werden. Hieraus ergeben sich allerdings andere Nachteile. GUVs sind in der Regel mit einer nicht-physiologischen, nicht-ionischen Sucroslösung gefüllt. Auch die sphärische Struktur ist für eine Vielzahl an Methoden von Nachteil und eine Fixierung ist erschwert.

Die Vorteile der zwei beschriebenen Systeme konnten im Modell der porenüberspannenden Lipidmembranen vereint werden. Hierbei werden Lipidmembranen über einem porösen Substrat durch das Spreiten von GUVs ausgebildet.^{117,120,289} Dieses Modellsystem kombiniert den stabilisierenden Einfluss des Festkörpers mit der Zugänglichkeit und wässrigen Umgebung beider Lipidmembranschichten.

Das etablierte System der porenüberspannenden Lipidmembranen soll im Folgenden durch ein überliegendes F-Aktinnetzwerk erweitert werden. Im Gegensatz zu den vorherigen Kapiteln, in denen in grundlegenden Studien das Bindungsverhalten und die Netzwerkorganisation F-Aktins untersucht wurde, soll nun der Einfluss des kortikalen F-Aktinzytoskeletts auf die mechanischen Eigenschaften von Lipidmembranen untersucht werden. Hierzu werden rasterkraftmikroskopische Indentationsexperimente durchgeführt. Des Weiteren besteht die Option, das F-Aktinnetzwerk einerseits über ein physiologisches Linkerprotein oder andererseits direkt an die Lipidmembran zu binden und somit die Komplexität des Systems, anders als in Zellen, direkt zu steuern.

6.2 PIP₂-haltige Lipidmembranen

Die Verknüpfung von F-Aktin über das Linkerprotein Ezrin an PIP₂ der Plasmamembran unterliegt einer konformationsregulierten Aktivierung. Die Aktivierung Ezrins ist abhängig von der PIP₂-Bindung und der Phosphorylierung des Threoninrests 567.^{19,208}

Um eine vollständige Aktivierung und somit eine maximale F-Aktinbindefähigkeit zu garantieren, wurde in diesem Teil der Arbeit ausschließlich mit der pseudophosphorylierten Ezrinmutante T567D an PIP₂-haltigen Lipidmembranen gearbeitet.

6.2.1 F-Aktinbindungsstudie an PIP₂-haltigen festkörperunterstützten Lipidmembranen

In ersten Bindungsstudien an 8 mol% PIP₂-haltigen festkörperunterstützten Lipidmembranen sollte untersucht werden, ob die Anbindung F-Aktins über Ezrin T567D an PIP₂ zur Ausbildung dichter F-Aktinnetzwerke führt. Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass der Rezeptorlipidgehalt (PIP₂) mit der Aktinnetzwerkdichte positiv korreliert. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein Rezeptorlipidgehalt ≥ 6.5 mol% zu einer maximalen Belegungsdichte an Ezrin führt und daher wird ab diesem Wert auch ein maximal dichtes Aktinnetzwerk erwartet.³⁰ Ein Rezeptorlipidgehalt von 8 mol% PIP₂ soll somit ein maximal dichtes F-Aktinnetzwerk gewährleisten. Dies ist essentiell für die hieran anschließenden Studien auf porenüberspannenden Lipidmembranen (engl. *pore spanning lipid bilayers*, PSLBs). Denn es wird erwartet, dass eine hohe F-Aktinnetzwerkdichte auch den möglichen Einfluss F-Aktins auf die PSLB-Mechanik verstärkt.

Abbildung 6.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer festkörperunterstützten Lipidmembran bestehend aus POPC/PIP₂/TxR (91.6:8:0.4) nach Inkubation mit Ezrin T567D und F-Aktin. **A:** Roter Kanal, TexasRed®-DHPE(TxR)-Fluoreszenz der Lipidmembran. **B:** Grüner Kanal, AlexaFluor®488-Phalloidin (AF) fluoreszenzmarkiertes F-Aktin, **C:** Überlagerte Darstellung der beider Kanäle. Maßstabsbalken: 10 µm.

Insgesamt wurden acht Proben in vier voneinander unabhängigen Präparationen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zu beobachten war, dass die membrangekoppelte, rote TexasRed®-DHPE(TexasRed)-Fluoreszenz (vgl. Abb.6.1A) durchweg Lipidmembranen mit vielen, größeren, asymmetrischen Defekten (schwarze Bereiche) zeigte. Des Weiteren waren Bereiche höherer, roter Fluoreszenzintensität auszumachen, welche auf überschüssiges Lipidmaterial zurückzuführen sind. Die grüne F-Aktinfluoreszenz (vgl. Abb. 6.1B) zeigt ein in sich geschlossenes, dichtes Netzwerk, welches eine gewisse Ausdehnung in z-Richtung aufweist. Auffällig ist, dass die Defekte auch in den schwarzen Bereichen der F-Aktin-Fluoreszenzaufnahme wiederzufinden sind. Dies wird in der überlagerten Darstellung (vgl. Abb. 6.1C) noch deutlicher. Das F-Aktin ist fast ausschließlich auf der Membran und nur zum Teil im Bereich der Defekte lokalisiert.

Die Anzahl der Defekte in der Lipidmembran erscheinen zunächst problematisch in Hinblick auf die Präparation von PSLBs. Da hier aber zwei unterschiedliche Modellsysteme betrachtet werden, muss diese Tatsache auch differenziert bewertet werden. Defekte in PSLBs würden zum Reißen der betroffenen Membranbereiche führen und wären somit für weitere Untersuchungen nicht mehr zugänglich. Solange genügend stabile PSLBs generiert werden, sind Membrandefekte beziehungsweise Membranreißen irrelevant für die weiteren Schritte.

Sowohl die Langzeitstabilität der Lipidmembranen als auch der Einfluss der Bindung von Ezrin T567D wurden kontrolliert und es konnte kein vermehrtes Auftreten von Defekten über die Zeit beziehungsweise durch Ezrinbindung beobachtet werden. Die Defekte lassen sich demnach auf die Gegenwart von F-Aktin bei Membranen mit

höherem Rezeptorlipidgehalt (PIP_2) zurückführen. Eine mögliche Erklärung wäre eine Art konstringierende Wirkung des engmaschigen, dreidimensionalen F-Aktinnetzwerkes, welches Scherkräfte auf die Membran ausübt. Hierfür spricht auch die für Membrandefekte eher untypische, asymmetrische und nicht kreisähnliche Form.

Erste Akinbindungsstudien an festkörperunterstützten Lipidmembranen mit einem Rezeptorlipidgehalt von 8 mol% PIP_2 zeigten nach Ezrin T567D Bindung die Ausbildung dichter F-Aktinnetzwerke. Somit sollten unter diesen Bedingungen ausgebildete Aktinnetzwerke auch an PSLBs ausreichend verwoben sein und eine mögliche Auswirkung auf die Lipidmembranmechanik leichter detektierbar sein.

6.2.2 Ausbildung PIP_2 -haltiger porenüberspannender Lipidmembranen

Für die Ausbildung PIP_2 -haltiger porenüberspannender Lipidmembranen wurden GUVs bestehend aus POPC/ PIP_2 /Perylen (91:8:1) auf hydrophil funktionalisierten, porösen Siliciumnitridsubstraten mit einem Porendurchmesser von $1.2\ \mu\text{m}$ in E1-Puffer gespreitet (vgl. Abs. 3.1.2). Die erfolgreiche Ausbildung PIP_2 -haltiger porenüberspannender Lipidmembranen konnte fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden (vgl. Abb. 6.2). Dies resultierte in zahlreichen, über das gesamte Substrat verteilte, porenüberspannenden Lipidmembranflecken, welche mit Durchmessern von über $40\ \mu\text{m}$, aufgrund einer leichteren Relokalisierung, besonders geeignet für die rasterkraftmikroskopische Untersuchung waren. Daher wurden die PSLBs zunächst fluoreszenzmikroskopisch detektiert und genau lokalisiert. Aufgrund der Struktur der porösen Substrate konnten einmal lokalisierte Lipidmembranen leicht für die rasterkraftmikroskopische Untersuchung relokalisiert werden.

Abbildung 6.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von porenüberspannenden Lipidmembranen bestehend aus POPC/PIP₂/Perylen (91:8:1). **A,B:** Gezeigt sind zwei größere Membranflecken, welche im Bereich der überspannten Poren eine kreisrunde rote Fluoreszenz zeigen. Im Bereich der Porenstege ist die Fluoreszenz durch das aufgedampfte Gold gelöscht.

Abbildung 6.2 zeigt zwei typische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen porenüberspannender Lipidmembranen. Bereiche überspannter Poren zeigen eine kreisrunde rote Fluoreszenz, wohingegen die festkörperunterstützten Bereiche der Lipidmembran auf den Porenstegen nicht fluoreszieren. Aufgrund der für die Funktionalisierung notwendigen aufgedampften Goldschicht kommt es in diesen Bereichen zur Fluoreszenzlöschung.²⁹⁰ Neben den großen Membranflecken sind kleinere PSLBs sowie überschüssiges Lipidmaterial im Randbereich zu beobachten.

Im nächsten Schritt sollte die Lipidmembranmechanik der PSLBs rasterkraftmikroskopisch charakterisiert werden. Die porenüberspannenden Lipidmembranen rissen während des Indentationsprozesses der Messung. Auch eine Herabsetzung des Triggerpunktes (bis 150 pN), das bedeutet eine Verringerung der Endkraft beziehungsweise Indentationstiefe, führte zu keiner Verbesserung der Stabilität der PSLBs während des Indentationsprozesses.

So wurde im weiteren Verlauf die Zusammensetzung der Lipidmischung variiert. Der Austausch des Matrixlipids POPC gegen DPhPC (1,2-Diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin), welches Membranen mit höherer mechanischer Stabilität ausbildet, führte zu keiner Verbesserung der Problematik, die Lipidmembranen rissen weiterhin bei Indentation.²⁹¹ Auch eine Verringerung des PIP₂-Gehalts führte zu keiner erhöhten Stabilität der Membranen.

Letztlich wurde eine für Proteoliposomen erprobte Lipidmischung aus Phosphatidyl-

cholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Cholesterin angepasst.²⁹² Die verwendete Lipidmischung bestand aus POPC/POPE/PIP₂/Chol/TxR (51.6:20:8:20:0.4). Aus den elektroformierten GUVs resultierten stabile, porenüberspannende Lipidmembranen (vgl. Abb. 6.3), welche sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch rasterkraftmikroskopisch untersucht werden konnten.

Abbildung 6.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von porenüberspannenden Lipidmembranen bestehend aus POPC/POPE/PIP₂/Chol/TxR (51.6:20:8:20:0.4). **A, B:** Gezeigt sind zwei Membranflecken, welche im Bereich der überspannten Poren eine kreisrunde, rote Fluoreszenz zeigen. Im Bereich der Porenstege ist die Fluoreszenz durch das aufgedampfte Gold gelöscht.

Anhand von FRAP-Messungen (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*) konnte qualitativ abgeleitet werden, dass die laterale Lipidmobilität innerhalb der PSLB gewährleistet ist, da die Fluoreszenz innerhalb weniger Sekunden fast vollständig wiederkehrte.

6.2.3 Bindung von Ezrin T567D an PIP₂-haltige PSLBs

Im Anschluss an die Charakterisierung der Lipidmembran folgte die Proteinbindung von Ezrin T567D. Hierzu wurde Abschnitt 3.3.2 entsprechend vorgegangen und die Probe anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Wie aus Abbildung 6.4 ersichtlich, konnten Unterschiede in der Fluoreszenzintensität vor und nach Inkubation mit Ezrin T567D beobachtet werden.

Abbildung 6.4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der gleichen porenüberspannenden, TexasRed®-DHPE-markierten, PIP₂-haltigen Lipidmembran vor (A) und nach (B,C) Inkubation mit Ezrin T567D. C: Vergrößerter Ausschnitt aus B. Maßstabsbalken: 20 µm.

In Abbildung 6.4A sind zwei größere Lipidmembranflecken vor der Inkubation mit Ezrin T567D zu sehen. Mit der Zeit und aufgrund der rasterkraftmikroskopischen Indentationsexperimente sind einige PSLBs gerissen (vgl. Abb. 6.4A/B). In der vergrößerten Darstellung 6.4C wird eine Veränderung des TexasRed-Fluoreszenzsignals der Lipidmembran auffällig. Die Fluoreszenz der PSLBs erscheint nach Proteininkubation sehr unscharf und verschwommen. Die Lipidmembran über einer Pore weist keine einheitliche Fluoreszenzintensität mehr auf. Zentriert erscheint die Fluoreszenz weniger intensiv und daher dunkler. Da die Aufnahmen konfokal detektiert wurden, lässt sich vermuten, dass die Lipidmembran nicht mehr planar sondern gewölbt vorliegt. Somit befindet sich der Membranbereich in der Porenmitte nicht im Fokus, wahrscheinlich liegt der Fokus etwas tiefer und der überspannte Bereich der Lipidmembran liegt tiefer in der Pore, denkbar ist aber auch eine Ausstülpung nach Außen. Auch die Fluoreszenzlöschung durch die Goldschicht auf den Porenstegen ist weniger ausgeprägt, was für einen vergrößerten Abstand zwischen Substrat und Lipidmembran spricht. Diese Tatsache ist erstaunlich, denn zu einer Abnahme der Fluoreszenzlöschung durch das Gold kommt es erst ab einem Abstand von 5 nm.²⁹⁰ Aus der heterogenen Fluoreszenzintensität der PSLBs nach Ezrininkubation lässt sich ableiten, dass Ezrin T567D die Lipidmembranorganisation verändert.

Dieses Phänomen konnte reproduzierbar nach Inkubation mit Ezrin T567D beobachtet werden. Die durch Ezrin induzierte Änderung in der Membranmorphologie hatte auch Auswirkungen auf die PSLB-Stabilität. Indentationsexperimente mit dem AFM waren nur in Ausnahmefällen möglich und führten im überwiegenden Teil der Messungen zum Reißen der Membran. Das Reißen der Membran während des Indentationsprozesses macht eine spätere Auswertung der Daten unmöglich.

6.2.4 Bindung von nicht-muskulärem F-Aktin an PIP₂-haltige PSLBs

Als nächster Schritt sollte die Anbindung von nicht-muskulärem F-Aktin an die PIP₂-Ezrin T567D-PSLBs erfolgen (vgl. Abs. 3.3.2). Aufgrund der Instabilität der Ezrin T567D-gebundenen PSLBs wurde auf die rasterkraftmikroskopische Charakterisierung größtenteils verzichtet. Stattdessen erfolgte eine direkte Inkubation mit F-Aktin in der Erwartung einer stabilisierenden Wirkung F-Aktins auf die PSLBs.

Allerdings zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, dass keine Kolokalisation der TxR-PSLB-Fluoreszenz und der AlexaFluor®488 Phalloidin F-Aktinfluoreszenz beobachtet werden konnte. Repräsentativ ist dies in Abbildung 6.5 dargestellt:

Abbildung 6.5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer porenüberspannenden, PIP₂-haltigen Lipidmembran nach der Inkubation mit Ezrin T567D und nicht-muskulärem F-Aktin. **A:** Roter Kanal der TexasRed®-DHPE-PSLB Fluoreszenz. **B:** Grüner Kanal der AlexaFluor®488 Phalloidin F-Aktinfluoreszenz. **C:** Überlagerte Darstellung beider Kanäle. Maßstabsbalken: 5 µm.

Auch hier lässt sich in der roten Membranfluoreszenz (vgl. Abb. 6.5A) ein unscharfes Bild im Bereich der PSLBs erkennen, welches, wie zuvor erwähnt, auf die Ezrin T567D Bindung zurückzuführen ist. Die F-Aktinfluoreszenz (vgl. Abb. 6.5B) ist ausschließlich auf den Porenstegen nicht membrantragender Poren lokalisiert. Deutlich zu erkennen ist, dass der mit F-Aktin belegte Bereich zuvor auch Teil der PSLB war. Nach Reißen der Lipidmembran sind in diesem Bereich Lipidreste auf den Porenstegen zurückgeblieben. Dies deutet daraufhin, dass die F-Aktinlokalisierung nicht auf eine unspezifische Wechselwirkung zurückzuführen ist. Unklar bleibt allerdings, warum F-Aktin bevorzugt an Lipidreste gerissener PSLBs im Bereich der Porenstege und nicht an intakte PSLBs bindet.

Eine mögliche Erklärung könnte die Krümmung der PSLB sein. Wie bereits erwähnt

scheinen die PSLBs nach Inkubation mit Ezrin T567D in die Poren hineinzuragen. Diese Aussackung in die Pore hinein scheint eine F-Aktinanbindung zu verhindern. Die Filamente binden bevorzugt an die planaren Bereiche der Porenstege.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Präparation PIP₂-haltiger porenüberspannender Lipidmembranen und deren rasterkraftmikroskopische Charakterisierung erfolgreich war. Die anschließende Inkubation mit dem physiologischen Linkerprotein Ezrin führte zu Veränderungen der Membranmorphologie, welche sich in einer Instabilität äußerte und Indentationsexperimente fast unmöglich machte. Der darauffolgende Schritt der Immobilisierung von F-Aktin führte zu keiner Stabilisierung der PSLB, da das nicht-muskuläre F-Aktin und die PSLBs nicht kolokalisiert waren.

Somit umfassen die folgenden Ergebnisse der AFM-Studie (vgl. Abs. 6.2.5) hauptsächlich die Charakterisierung der PIP₂-haltigen PSLBs und wenige Ergebnisse zur Lipidmembranmechanik nach der Inkubation mit Ezrin T567D.

6.2.5 Rasterkraftmikroskopische Charakterisierung PIP₂-haltiger porenüberspannender Lipidmembranen

Bei der rasterkraftmikroskopischen Charakterisierung der PIP₂-haltigen porenüberspannenden Lipidmembranen wurden sogenannte *Force Volume Maps* aufgenommen. In einer solchen Karte repräsentiert jeder Pixel eine Kraft-Abstandskurve. Eine typische Kraft-Abstandskurve an einer PIP₂-haltigen porenüberspannenden Lipidmembran ist in Abbildung 6.6 dargestellt. Gezeigt ist der Hin- (rot) und Rückweg (blau) bei der Indentation einer PSLB. In allen Experimenten war die lineare Kraftantwort der Membran vollelastisch, was aus dem Fehlen einer nicht-linearen Hysterese während der Retraktion ableitbar ist.¹¹⁴

Abbildung 6.6: Beispielhafte Kraft-Abstandskurve einer porenüberspannenden PIP₂-haltigen Lipidmembran. In Rot ist der Hinweg der Indentation und in Blau der Rückweg gezeigt. Beide Kurven zeigen einen fast identischen Verlauf, dies lässt auf ein vollelastisches Verhalten der PSLB schließen.

Im Fall der PIP₂-haltigen PSLBs wurden *Force Volume Maps* fünf voneinander unabhängiger Experimente ausgewertet und über dessen Kraft-Abstandskurven ($n = 235$) eine mittlere apparente Federkonstante von $1.7 \pm 0.2 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ermittelt. Nach Anbindung von Ezrin T567D und der damit verbundenen Membranstabilität konnten in zwei voneinander unabhängigen Experimenten Kraft-Abstandskurven ($n = 32$) ausgewertet werden. Hier ergab sich eine mittlere apparente Federkonstante von $1.1 \pm 0.1 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$.

Abbildung 6.7: Histogramme, welche die Häufigkeiten der apparenten Federkonstanten für eine PIP₂-haltige PSLB vor (rot schraffiert) und nach (blau schraffiert) der Anbindung von Ezrin T567D zeigen. Die Daten wurden durch Anpassung einer logarithmischen Normalverteilung ausgewertet.

Die ermittelten apparenten Federkonstanten k_{app} vor und nach Ezrin T567D-Anbindung liegen in einem ähnlichen Bereich. Eine leichte Tendenz zu niedrigeren Werten kann nach der Bindung Ezrins abgelesen werden. Die Durchführung eines ungepaarten STUDENT t -Tests unter Erwartung einer Normalverteilung bestätigt, dass ein signifikanter Unterschied vorliegt.²⁹³

Die beobachteten k_{app} -Werte liegen unter dem für POPC-PSLBs ($2.60 \pm 0.12 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) typischen Bereich.²⁸⁷ Dies wird auf die komplexere Lipidmischung zurückgeführt. Eine mögliche Erklärung wäre eine durch die Lipide induzierte abgeschwächte Wechselwirkung mit den Porenstegen und somit eine erniedrigte Vorspannung der PSLB.

Aufgrund der Instabilität PIP₂-haltiger PSLBs nach Inkubation mit Ezrin T567D und dem Ausbleiben der F-Aktinbindung, wurde im folgenden Verlauf auf das unter 5.3 beschriebene, direkte elektrostatische F-Aktin Immobilisierungssystem zurückgegriffen. Dieser *Bottom-up*-Ansatz ermöglicht eine separierte Betrachtungsweise des F-Aktineinflusses auf die Membranmechanik und bildet somit eine Grundlage für das komplexere Modellsystem mit dem Linkerprotein Ezrin. Hierdurch können auftretende Schwierigkeiten isoliert betrachtet und gezielter bewältigt werden.

6.3 DOEPC-haltige porenüberspannende Lipidmembranen

- Das vorliegende Modellsystem wurde im Rahmen der Doktorarbeit von D. MORICK etabliert. Hierauf aufbauend sind die folgenden Ergebnisse entstanden.¹²³

Analog zu den Messungen auf festkörperunterstützten Lipidmembranen (vgl. Abs. 5.3) wurde auch bei porenüberspannenden Lipidmembranen mit einem DOEPC-Gehalt von 20 mol% gearbeitet. Im Rahmen dieser Arbeit sowie in einer vorangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser Rezeptorlipidgehalt ein F-Aktinnetzwerk hoher Dichte ausbildet.¹²³ Hiermit sollte ein möglicher Einfluss auf die PSLB-Mechanik besonders deutlich werden.

Des Weiteren wurde mit muskulärem F-Aktin gearbeitet, denn diese G-Aktinisform weist Vorteile bei der Polymerisation auf und ist somit eine robuste Alternative zum nicht-muskulärem G-Aktin (vgl. Abs. 5.4.1).²²⁷ Die elektrostatischen Bindungseigenschaften sollten hiervon allerdings nicht beeinflusst werden.

6.3.1 Ausbildung DOEPC-haltiger porenüberspannender Lipidmembranen

Zunächst wurden GUVs bestehend aus DOPC/DOEPC/Perylen (79:20:1) hergestellt (vgl. Abs. 3.1.2). Zur Ausbildung der PSLBs wurde in isoosmolarem PBS-Puffer gespreitet. Die porenüberspannenden Lipidmembranen wurden nach fluoreszenzmikroskopischer Sichtung rasterkraftmikroskopisch untersucht. Die PSLBs erwiesen sich als sehr stabil und somit als gut geeignet für AFM-Studien sowie weiterer Präparationsschritte.

6.3.2 Bindung von muskulärem F-Aktin an DOEPC-haltige porenüberspannende Lipidmembranen

Die Bindung muskulären F-Aktins an DOEPC-haltige porenüberspannende Lipidmembranen konnte anhand von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (vgl. Abb. 6.8) nachgewiesen werden.

Abbildung 6.8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen DOEPC-haltiger PSLBs nach Inkubation mit muskulärem F-Aktin. **A,B:** Zwei Membranflecken, welche ein kolokalisiertes Fluoreszenzsignal der PSLB- und F-Aktinfluoreszenz zeigen. **1:** Roter Kanal*, der Perylen-Lipidmembranfluoreszenz. **2:** Grüner Kanal, der AlexaFluor®488 Phalloidin F-Aktin Fluoreszenz. **3:** Überlagerte Darstellung beider Kanäle. Maßstabsbalken: 20 μm . *zur besseren Übersicht in rot dargestellt

Im Gegensatz zu den PIP_2 -haltigen PSLBs waren der Lipidmembranfluorophor Perylen und AlexaFluor®488 Phalloidin markiertes F-Aktin kolokalisiert.

6.3.3 Ergebnisse der rasterkraftmikroskopischen Charakterisierung DOEPC-haltiger PSLBs

Zwei typische Kraft-Abstandskurven an einer DOEPC-haltigen porenüberspannenden Lipidmembran vor und nach F-Aktin Anbindung sind in Abbildung 6.9 dargestellt. Gezeigt ist jeweils der Hin- (rot) und Rückweg (blau) bei der Indentation der PSLB. In allen Fällen war die lineare Kraftantwort der Membran vollelastisch, welches aus dem Fehlen einer nicht-linearen Hysterese während der Retraktion ableitbar ist.¹¹⁴

Abbildung 6.9: Typische Kraft-Abstandskurven eines Indentationsexperiments einer porenüberspannenden DOEPC-haltigen Lipidmembran. **A:** Vor F-Aktin Anbindung. **B:** Nach F-Aktin Anbindung. Hin- (rot) und Rückweg (blau) zeigen einen fast identischen Verlauf, dies lässt auf ein vollelastisches Verhalten der PSLB schließen.¹¹⁴ Der Rückweg zeigt in beiden Fällen im Bereich des Kontaktpunktes mit der PSLB einen Peak, der das Überwinden der Adhäsionsenergie repräsentiert.

Des Weiteren fallen lineare Hysteresen im Nicht-Kontakt- sowie Kontaktbereich als eine Verschiebung zwischen Hin- und Rückweg auf. Hysteresen im Bereich der Null-Kraftlinie sind typisch für hydrodynamische Effekte.¹¹⁴ Der hydrodynamische Widerstand, welcher in wässrigen Medien unumgänglich ist, zeigt eine Abhängigkeit von der Rastergeschwindigkeit und wird durch eine Verbiegung des Cantilevers hervorgerufen.²⁹⁴

Lineare Hysteresen im Kontaktbereich sind auch abhängig von der Rastergeschwindigkeit, allerdings treten diese auch in niedrig-viskosen Medien wie Luft auf. Eine Erklärung hierfür ist der sogenannte *Stick-Slip*-Effekt, welcher das ruckartige Gleiten zweier gegeneinander bewegter Festkörper beschreibt.²⁹⁵ Es wird angenommen, dass die Reibung zwischen Spitze und Probe dazu führt, dass sich der Cantilever bei Kontaktaufnahme und -verlust nach vorne beziehungsweise hinten biegt. Somit ergibt sich sowohl im Hin- als auch im Rückweg ein *Offset*. Exakterweise liegt die "wahre" Kraftantwort in der Mitte.²⁹⁶ Auffällig ist in beiden Retraktionskurven der Peak im Bereich des Kontaktpunktes ($-0.02 \mu\text{m}$ bis $-0.04 \mu\text{m}$). Die Adhäsionskraft hält die Spitze so lange in Kontakt mit der Probe, bis die Kraft des Cantilevers die Adhäsionskraft überwindet. In Abwesenheit von Probenverformungen gleicht die Adhäsionsenergie dem Integral des Peaks.¹¹⁴

Nach Auswertung der Steigung der linearen Kraftantwort aller relevanten Kraft-Abstandskurven, konnten die berechneten apparenten Federkonstanten der PSLBs in einem Histogramm dargestellt werden (vgl. Abs. 3.8.4). Die Anpassung einer GAUSS-Verteilung an die zwei Histogramme resultierte in einem mittleren Wert für k_{app} und

dessen Standardabweichung σ . Insgesamt wurden für DOEPC-haltige PSLBs 26 *Force Volume Maps* aus sieben voneinander unabhängigen Experimenten ausgewertet und über dessen Kraft-Abstandskurven ($n=1386$) eine mittlere apparente Federkonstante von $7.1 \pm 1.0 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ermittelt. Nach Anbindung von muskulärem F-Aktin konnten aus 31 *Force Volume Maps* und vier voneinander unabhängigen Experimenten Kraft-Abstandskurven ($n=1570$) ausgewertet und eine mittlere apparente Federkonstante von $11.0 \pm 3.0 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ bestimmt werden.

Abbildung 6.10: Histogramme, welche die Häufigkeiten der apparenten Federkonstanten für eine DOEPC-haltige PSLBs vor (rot schraffiert) und nach der Anbindung (grün schraffiert) von muskulärem F-Aktin zeigen. Oben rechts sind die Ergebnisse für die apparenten Federkonstanten eines Kontrollexperimentes an einer reinen DOPC-PSLB dargestellt. Die Histogramme wurden durch Anpassung einer GAUSS-Funktion ausgewertet.

Die in Abbildung 6.10 dargestellten Ergebnisse für die apparenten Federkonstanten der DOEPC-haltigen PSLBs vor (rot schraffiert) und nach (grün schraffiert) F-Aktin Anbindung zeigen einen deutlichen Einfluss von F-Aktin auf die Lipidmembranmechanik. Nach F-Aktinanbindung steigt der mittlere k_{app} -Wert von $7.1 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ um das Eineinhalbfache auf $11.0 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$. Diesen signifikanten Unterschied bestätigt ein durchgeführter STUDENT t -Test.²⁹³ Das F-Aktinnetzwerk auf der PSLB erhöht die Rigidität der Lipidmembran demnach deutlich.

Generell liegen die ermittelten apparenten Federkonstanten im Vergleich zur reinen DOPC-PSLB mit $k_{\text{app}} = 1.42 \pm 0.02 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ deutlich höher.²⁸⁷ Um einen systematischen

Fehler auszuschließen wurden im Rahmen dieser Arbeit Indentationsexperimente auch an einer reinen DOPC-PSLB durchgeführt (vgl. Abb. 6.10 oben rechts). Hier wurden ähnlich niedrige Werte für k_{app} von $0.53 \pm 0.10 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ermittelt. Die hohen Werte für die apparenten Federkonstanten können somit eindeutig einerseits auf das Rezeptorlipid DOEPC selbst und die Anbindung von F-Aktin zurückgeführt werden.

Des Weiteren weisen die Werte der linearen Kraftantwort der PSLB nach F-Aktinanbindung eine breitere Verteilung auf. Es erscheint offensichtlich, dass das F-Aktinnetzwerk für die Verbreiterung verantwortlich ist. Dies lässt auf ein heterogenes System schließen, welches durch unterschiedliche Faktoren, wie Rezeptorlipidverteilung und präparative Unterschiede hervorgerufen wird. Eine Variation im Rezeptorlipidgehalt würde auch eine Variation der F-Aktinnetzwerkdichte verursachen. Darüber hinaus wird das Ausmaß der F-Aktinbindung durch Faktoren wie der Güte der Polymerisation (F filamentlänge/Netzwerkdichte) und präparative Unterschiede beeinflusst, dies würde zur Ausbildung heterogener F-Aktinnetzwerkdichten beitragen und zu größeren Streuungen der k_{app} -Werte im Vergleich zur puren PSLB führen.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass im Gegensatz zu PIP_2 -haltigen PSLBs die Ausbildung DOEPC-haltiger PSLBs und die anschließende F-Aktinbindung zu stabilen PSLBs führte, deren Mechanik rasterkraftmikroskopisch anhand von Indentationsexperimenten untersucht werden konnten. Hierbei zeigte sich, dass die Anbindung eines Aktinnetzwerkes an PSLBs zu rigideren Lipidmembranen führte, was aus größeren apparenten Federkonstanten abgeleitet wurde.

6.4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das bestehende Modellsystem der porenüberspannenden Lipidmembranen weiterentwickelt, um F-Aktin an PSLBs zu binden.^{120, 287, 297} Die mechanische Charakterisierung des artifiziellen F-Aktinkortexes wurde, in Adaption zu Zellexperimenten, mit Hilfe von lokalen rasterkraftmikroskopischen Sonden durchgeführt. Von besonderem Interesse war hierbei der Einfluss F-Aktins auf die Lipidmembranspannung. Ähnlich zu Zellen, in denen sich die Plasmamembranspannung aus der kortikalen und inhärenten Spannung zusammensetzt, wurden zwei Fälle generiert und verglichen: die inhärente Lipidmembranspannung, abhängig unter anderem von Lipidmembranzusammensetzung, Porengeometrie und Funktionalisierung; sowie die kortikale Lipidmembranspannung nach Anbindung des F-Aktinnetzwerkes.²⁹⁸

Die mechanischen und (visko-)elastischen Eigenschaften des F-Aktinzytoskeletts wurden in den letzten Jahren *in vivo* und *in vitro* intensiv erforscht. Auf zellulärer Ebene lassen sich die eingesetzten Methoden in drei Klassen unterteilen: 1) Lokale Sonden, welche einen Teil der Zelle deformieren; 2) Mechanische Belastung der gesamten Zelle; 3) Gleichzeitiges Belasten einer Zellpopulation.²⁸⁶ Die komplexe Zellantwort auf mechanische Manipulation wird auch über das filamentöse Aktinnetzwerk definiert.

Um *in vivo*-Phänomene besser analysieren und verstehen zu können, sind differenzierte *in vitro* Experimente unumgänglich. Über die letzten Jahrzehnte wurden verschiedene Modellsysteme, wie Aktingele^{299–301} und aktingekoppelte Lipidmembranen,^{237,302,303} etabliert, um die mechanischen Eigenschaften von F-Aktinnetzwerken zu untersuchen. Hierbei stellen die Einzelpartikelverfolgung (engl. *Single particle tracking*) und die Scherrheologie die am häufigsten verwendeten Methoden dar.^{303–305}

6.4.1 Laterale Lipidmembranspannung porenüberspannender Lipidmembranen

Aus den Indentationsexperimenten ergeben sich aus der linearen Kraftantwort der porenüberspannenden Lipidmembranen die apparenten Federkonstanten k_{app} der PSBLs. Daher soll zunächst erläutert werden, wie die k_{app} -Werte mit der lateralen Lipidmembranspannung σ zusammenhängen. Die apparente Federkonstante, welche über die Steigung des linearen Kraftanstiegs bestimmt wird, vereint alle Einflüsse auf das elastische Verhalten der Membran.^{287,306} Insgesamt müssen bei der Indentation einer freitragenden Lipidmembran drei Beiträge betrachtet werden: die laterale Membranspannung, Streckung sowie Biegung der Lipidmembran.³⁰⁷

Die laterale Lipidmembranspannung dominiert das elastische Verhalten der PSLB und wird im vorliegenden Modellsystem hauptsächlich durch die Adhäsion der Membran zu den festkörperunterstützten Bereichen, den Porenstegen, definiert. Durch adhäsive Kräfte zwischen den Lipidkopfgruppen und der Thiol-Funktionalisierung entsteht eine Diskrepanz in der freien Energie zwischen der freitragenden und festkörperunterstützten Lipidmembran.¹¹⁷ Die laterale Lipidmembranspannung liegt hauptsächlich darin begründet, dass die Lipide der PSLB aufgrund der geringeren freien Energie zum festkörperunterstützten Bereich streben und somit eine Art Vorspannung generiert wird.

Eine laterale Streckung der PSLB kann als Hauptbeitrag der Kraftantwort bei Indentation ausgeschlossen werden, da dies in einer nicht-linearen Kraftantwort resultieren würde.²⁹⁷ Des Weiteren war in den AFM-Experimenten eine Indentationstiefe von ungefähr

50-220 nm zu beobachten. Dies würde bei Annahme einer Kegel-Indentationsgeometrie einer Oberflächenvergrößerung von 0.4-6.5% entsprechen, wobei eine laterale Streckung nur eine maximale Oberflächenvergrößerung von 5% zulassen würde.³⁰⁸ Die Indentationstiefen sind demnach damit zu erklären, dass während der Indentation der Lipidmembran weiteres Lipidmaterial von den Porenstegen "nachfließt".

Als weiterer Einfluss auf die elastische Kraftantwort der PSLB wäre noch die Lipidmembranbiegung zu diskutieren. Hierzu lässt sich aus theoretischen Überlegungen ableiten, dass die k_{app} -Werte in einem Bereich um $0.01 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ liegen würden, wenn Lipidmembranbiegung der dominierende Einfluss wäre.¹¹⁷ Die gemessenen Werte liegen deutlich über diesem Wert und somit kann die Membranbiegung als Hauptbeitrag zur elastischen Kraftantwort der PSLB ausgeschlossen werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass die elastische Kraftantwort einer PSLB hauptsächlich durch die laterale Membranspannung definiert ist, welche wiederum durch die Vorspannung der PSLB aufgrund der Adhäsion zu den Porenstegen bestimmt ist. Die Lipidmembranspannung wird somit durch die Geometrie des porösen Substrats und deren Funktionalisierung beeinflusst.^{297,309} BHATIA *et al.* entwickelten ein Modell für runde vorgespannte elastische Schichten, welche mit Hilfe einer hemisphärischen Spitze zentral indentiert werden.³¹⁰ An den Rändern der Schicht wirkt eine tangentielle Kraft, welche eine Vorspannung induziert. Diese ist vergleichbar mit der aus den Unterschieden in der freien Energie resultierenden Vorspannung der PSLBs.

Die Modellvorstellung ist in Abbildung 6.11 schematisch dargestellt. Hieraus wird der Zusammenhang zwischen der Indentationstiefe $h(r)$ und der applizierten Kraft $F(r)$, der lateralen Lipidmembranspannung σ sowie der Geometrie von Substrat R_{pore} und Indenter R_{tip} deutlich.

Abbildung 6.11: Modell für die Beschreibung der Indentation einer freistehenden Lipidmembran mit einer parabolischen Spitze.²⁹⁷ Hierbei werden der Porenradius R_{pore} , die laterale Lipidmembranspannung σ , der Radius der Spitzenkrümmung R_{tip} , die Kraft mit welcher indentiert wird F sowie die Indentationstiefe $h(r)$ als Funktion der Auslenkung r vom Mittelpunkt der Pore berücksichtigt.

Durch eine asymptotische Anpassung des folgenden nicht-linearen Zusammenhangs (vgl. Gl. 6.1) an die Indentationskurven ist eine Ermittlung der lateralen Lipidmembranspannung möglich.^{117,307,310}

$$h(r) = \frac{F(r)}{4\pi\sigma} \left[1 - \ln \left(\frac{F(r)R_{\text{tip}}}{2\pi\sigma R_{\text{pore}}^2} \right) \right]. \quad (6.1)$$

Für die Berechnung der lateralen Lipidmembranspannungen wurde ein Porenradius $R_{\text{pore}} = 600 \text{ nm}$ und ein Spitzenradius $R_{\text{tip}} = 25 \text{ nm}$ angenommen. Damit eine lineare asymptotische Annäherung erfolgen kann müssen kleine Indentationstiefen $h(r)$ angenommen werden. Diese Einschränkung ergibt sich aus der vereinfachten Vorstellung zur Messspitzengeometrie.³⁰⁷

Berechnet man aus den ermittelten apparenten Federkonstanten für beide Modellsysteme die laterale Lipidmembranspannung σ , so liegen die Werte für die physiologische Aktin-verknüpfung über Ezrin an PIP₂-haltige PSLBs vor der Inkubation mit Ezrin T567D bei $0.8 \pm 0.6 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ und nach der Inkubation bei $0.5 \pm 0.2 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$.

Abbildung 6.12: Histogramme, welche die Häufigkeiten der Lipidmembranspannungen σ für eine PIP_2 -haltige PSLB vor (rot schraffiert) und nach der Anbindung (blau schraffiert) von Ezrin T567D zeigen. Die Daten wurden, unter Erwartung jeweils einer Verteilung, durch Anpassung einer logarithmischen Normalverteilung ausgewertet.

Berechnet man für die direkte elektrostatische Immobilisierung Aktins an DOEPC-haltige PSLBs aus den ermittelten apparenten Federkonstanten die laterale Lipidmembranspannung σ , so liegen die Werte vor der Inkubation mit muskulärem F-Aktin bei $4.3 \pm 1.0 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ und nach der Inkubation bei $7.1 \pm 3.0 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$.

Abbildung 6.13: Histogramme, welche die Häufigkeiten der Lipidmembranspannungen σ für eine DOEPC-haltige PSLBs vor (rot schraffiert) und nach der Anbindung (grün schraffiert) von muskulärem F-Aktin zeigen. Die Histogramme wurden durch Anpassung einer GAUSS-Funktion ausgewertet.

Vergleicht man die Werte der Lipidmembranspannungen mit typischen Plasmamembranspannungen von $\sigma = 0.01\text{--}0.1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, welche über Membran-*Tether*-Experimente bestimmt wurden, so unterscheiden sich diese deutlich.³¹¹ Dies lässt sich darauf zurückführen, dass das untersuchte Modellsystem die Komplexität der Zelle nur in kleinen Teilbereichen beleuchtet. Somit sind die deutlichen Unterschiede nicht verwunderlich und spiegeln die Wichtigkeit der Verknüpfung von *in vitro* und *in vivo* Experimenten wider. Denn nur so lassen sich grundlegende, zelluläre Charakteristika systematisch untersuchen und verstehen.

PIP₂-haltige porenüberspannende Lipidmembranen

Die ermittelten apparenten Federkonstanten für die Kraftantwort porenüberspannender POPC/PIP₂-haltiger Lipidmembranen bei Indentation liegen mit $1.7\pm 0.3 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ in ähnlicher Größenordnung, aber unter dem mittleren k_{app} -Wert einer reinen POPC-Membran mit $2.60\pm 0.12 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.²⁸⁷

Da im Rahmen dieser Arbeit eine deutlich komplexere Lipidmischung bestehend aus POPC/POPE/PIP₂/Chol verwendet wurde, kann die Ursache auch darin begründet sein. Interessant ist allerdings, dass Cholesterin die Membran eher stabilisieren und somit versteifen sollte.²⁸⁶ Gezeigt wurde dies von KOCUN *et al.* in AFM-Indentationsexperimenten an DOPC/Chol(7:3) PSLBs, welche im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen einen erhöhten k_{app} -Wert von $3.82\pm 0.16 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ aufwiesen.²⁸⁷ Somit scheint die stabilisierende Wirkung Cholesterins im vorliegenden Lipidmembransystem keinen nennenswerten Beitrag zu leisten.

Das Zusammenspiel der Komponenten POPE und PIP₂ beziehungsweise nur ein Lipidbestandteil übt demnach eine destabilisierende Wirkung auf die PSLBs aus und führt zu einer erniedrigten Membranspannung. Über Phosphatidylethanolamin ist bekannt, dass dieses Lipid (in Abhängigkeit der Fettsäurereste) eine Membrankrümmung induzieren kann und hexagonale, nicht planare Phasen bevorzugt.³¹² Daher weist POPE eine eher destabilisierende Wirkung auf, in dem es die spontane Krümmung einer Lipidmembran erhöht und könnte somit eine Ursache für die ermittelten niedrigeren Werte darstellen.³¹³ Wie allerdings zuvor erwähnt, wird die Lipidmembranspannung vorwiegend durch die Adhäsion zu den Porenstegen definiert. Der Beitrag von Krümmung beziehungsweise Biegung der PSLB sollte einen vernachlässigbaren Einfluss haben.¹¹⁷

Somit sollte die Interaktion der Lipidkopfgruppen mit der Funktionalisierung der Porenstege die gemessenen Unterschiede erklären. Da sowohl POPC als auch POPE zwitterio-

nischen Charakter aufweisen, scheint das unter physiologischen Bedingungen ungefähr vierfach negativ geladene PIP₂-Lipid eine besondere Rolle zu spielen.³¹ Aufgrund der gemessenen kleineren k_{app} -Werte, im Vergleich zur reinen POPC-PSLB, erscheint eine Art repulsive Wechselwirkung zu den Porenstegen, welche das Nachfließen der Lipide bei Indentation der PSLB erleichtert und somit die Vorspannung erniedrigt, denkbar. Genau genommen wechselwirken die PIP₂-Lipide mit dem β -Mercaptoethanol der Funktionalisierung. Gestützt wird diese Annahme durch elektrochemische Untersuchungen an selbstorganisierenden Monoschichten bestehend aus β -Mercaptoethanol, in denen gezeigt wurde, dass diese ein teilweise negatives Oberflächenpotential besitzen können.³¹⁴ Ein negatives Oberflächenpotential ist eine plausible Erklärung für den gemessenen niedrigeren k_{app} -Wert und würde ein Nachfließen der Lipide aufgrund repulsiver Wechselwirkungen zwischen PIP₂ und der β -Mercaptoethanol-Funktionalisierung begünstigen.

DOEPC-haltige porenüberspannende Lipidmembranen

Die ermittelten apparenten Federkonstanten für die Kraftantwort porenüberspannender DOPC/DOEPC-haltiger Lipidmembranen bei Indentation liegen über den Werten einer reinen DOPC-Membran.²⁸⁷ Da ein systematischer Fehler ausgeschlossen werden konnte, ist dies auf die Gegenwart des Rezeptorlipids DOEPC zurückzuführen.

Eine Erklärung hierzu muss in der positiven Ladung des DOEPC Lipids begründet liegen. STELTENKAMP *et al.* führten AFM-Indentationsexperimente an porösen Aluminaten mit einem Porenradius von 90 nm durch.¹²⁰ Hierzu spreiteten sie große unilamellare Vesikel des positiv geladenen artifiziellen Lipids DOTAP (1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan (Chlorid Salz)) auf einer mit 3-Mercaptopropionsäure funktionalisierten porösen Oberfläche. Die gemessenen apparenten Federkonstanten lagen mit $3.9 \pm 0.8 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ deutlich unter den gemessenen Werten für das PSLB-System mit 20 mol% DOEPC. Hierzu sei anzumerken, dass die k_{app} -Werte direkt mit der Porengröße zusammenhängen, das heißt: mit steigender Porengröße sinken die Werte.¹¹⁷ Dieser Trend lässt sich im Vergleich mit den vorliegenden Ergebnissen nicht ableiten. Denkbar wäre darüber hinaus, dass der positive Ladungsüberschuss der dem Festkörper zugewandten Lipidmonoschicht mit den festkörperunterstützten Bereichen verstärkt wechselwirken könnte und so eine größere Vorspannung der PSLB generiert würde. Im Vergleich zu den PIP₂-PSLBs würde hier der umgekehrte Fall vorliegen (vgl. Abs. 6.4.1). Die DOEPC-Lipide könnten aufgrund ihrer positiven Ladung attraktiv mit der Funktionalisierung, dem β -Mercaptoethanol, wechselwirken. Ein teilweise negatives Oberflächenpotential der Festkörperoberfläche unter den vorliegenden Bedingungen ist möglich und

könnte zu einer stärkeren elektrostatischen Wechselwirkung mit dem positiv geladenen DOEPC führen, was ein Nachfließen der Lipide bei Indentation erschwert und in höheren k_{app} -Werten resultiert.³¹⁴

6.4.2 F-Aktinbindung an porenüberspannende Lipidmembranen

Die Anbindung muskulären F-Aktins an porenüberspannende Lipidmembranen führt zu einer deutlichen Erhöhung der mittleren lateralen Membranspannung. Ähnliche Resultate erzielten LUO *et al.* an artifiziellen Aktinkortizes. Sie zeigten, dass mit steigender Konzentration an gebundenem F-Aktin auch das Elastizitätsmodul und somit die Membranspannung steigt. Hierzu wurden Mikropipetten-Aspirationsexperimente an Vesikeln, welche über PIP₂ und das Linkerprotein Cortexillin-I F-Aktin an der inneren Monoschicht gebunden hatten, durchgeführt. Darüber hinaus belegten sie, dass nicht nur eine erhöhte Aktinkonzentration, sondern auch der Grad der Quervernetzung die Membranspannung erhöht.³⁰³

LORENZ *et al.* konnten zeigen, dass die apparente Federkonstante von basolateralen Zellmembranen direkt abhängig ist von der Aktinfilamentdichte.¹¹⁸ Hierzu führten sie AFM-Indentationsexperimente an basolateralen Membranfragmenten auf porösen Substraten durch. Die Behandlung der Membranfragmente mit DNase I beziehungsweise β -Mercaptoethanol zur Entfernung der Aktinfilamente führte zu einer Reduzierung der k_{app} -Werte um 44% bis 65%. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Charakterisierung der elastischen Eigenschaften von apikalen Zellmembranfragmenten auf porösen Substraten erzielt. Auch hier zeigte sich eine Abhängigkeit der k_{app} -Werte von der F-Aktinnetzwerkdichte.³¹⁵

Eine mögliche Erklärung für die detektierte erhöhte Rigidität der PSLBs nach F-Aktinanbindung ist, dass die Immobilisierung F-Aktins an die PSLB zu einer verminderten lateralen Mobilität der Lipide in der Aktin-zugewandten Monoschicht führen könnte. Dies könnte wiederum eine erhöhte Vorspannung der PSLB zur Folge haben und zu einer erhöhten Steifigkeit der PSLB führen.

Vergleichen lässt sich dies mit FCS-(engl. *Fluorescence correlation spectroscopy*) Ergebnissen eines ähnlichen Modellsystems, in dem F-Aktin über eine Biotin-Neutravidin-Bindung an die PSLB gekoppelt wurde. HEINEMANN *et al.* zeigten, dass der Diffusionskoeffizient der Lipide mit steigender F-Aktinnetzwerkdichte sank.

Diese Hypothese findet sich auch in einem Konzept zur Zellmembran, dem sogenannten *Picket-Fence*-Modell:¹⁸² Hier wird davon ausgegangen, dass das Aktin-basierte Zytoske-

lett zu Barrieren in der Plasmamembran führt und diese in einzelne Kompartimente einteilt. Durch die Interaktion mit unterschiedlichen Membrankomponenten kann die Diffusion sowohl von (Membran-)Proteinen als auch von Lipiden eingeschränkt sein. Nur durch eine Reorganisation von Membrankomponenten oder des Zytoskeletts ist eine Diffusion in andere Bereiche der Membran möglich. Dies wird als *Hop*-Diffusion bezeichnet.³¹⁶ Diese Modellvorstellung soll die Diskrepanz zwischen der molekularen Mobilität in Zellmembranen verglichen mit der in artifiziellen Lipidmembransystemen erklären.^{317,318}

In der Literatur finden sich sowohl morphologische als auch funktionelle Messergebnisse, welche das *Picket-Fence*-Modell und die damit verbundene *Hop*-Diffusion stark unterstützen, trotz allem ist diese Modellvorstellung Gegenstand aktueller Forschung und kontrovers diskutiert.^{224,319}

Des Weiteren erscheint eine präferierte Anbindung F-Aktins an die Porenstege wahrscheinlich. Dies konnte eindrücklich in den F-Aktinbindungsstudien an PIP₂-haltigen PSLBs gezeigt werden (vgl. Abs. 6.2.4). Hieraus könnte eine weiter erhöhte Vorspannung der porenüberspannten Bereiche durch eine hohe F-Aktinbelegungsichte auf den festkörperunterstützten Bereichen induziert werden.

Im Fall der DOEPC-haltigen PSLBs konnte beobachtet werden, dass die Bindung F-Aktins an Lipidmembranflecken zu unterschiedlichen Belegungsichten mit F-Aktin führte. Abgeleitet wurde dies aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Dieses Phänomen zeigt sich auch in dem entsprechenden Histogramm (vgl. Abb. 6.10) vor und nach F-Aktinbindung. Nach F-Aktinbindung ist eine breitere Verteilung der k_{app} -Werte detektierbar. Schaut man sich hierzu den Ursprung der Werte genauer an, so fällt auf, dass die Höhe der k_{app} -Werte innerhalb einer *Force Volume Map* sehr konsistent waren, aber von Membranfleck zu Membranfleck deutlich variierten. Ähnliches konnte auch für die reinen DOEPC-PSLBs beobachtet werden, wurde aber nach F-Aktinbindung offenkundiger. Eine mögliche Erklärung hierzu ist ein variierender DOEPC-Rezeptorlipidgehalt in den einzelnen Membranflecken.

LARSON *et al.* konnten zeigen, dass die Verteilung zweier Lipide nach Elektroformation zu GUVs unterschiedlicher Lipidzusammensetzung führten.³²⁰ Gestützt wird diese Annahme durch Ergebnisse aus AFM-Indentationsstudien an reinen PSLBs eines zwitterionischen Lipids, welche im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen eine sehr schmale Verteilung aufweisen.²⁸⁷ Somit führt einerseits die alleinige Variation an

DOEPC in den PSLBs zu schwankenden k_{app} -Werten und andererseits nach Bindung von F-Aktin zu unterschiedlichen Belegungsgraden und daher variierenden k_{app} -Werten.

Abschließend lässt sich festhalten, dass im Rahmen dieses Kapitels die Lipidmembranmechanik an porenüberspannenden Lipidmembranen in Abhängigkeit eines gebundenen F-Aktinnetzwerkes mittels rasterkraftmikroskopischen Indentationsexperimenten untersucht wurde. Zwei Aktinimmobilisierungsansätze wurden verfolgt: Die physiologische Anbindung über Ezrin an PIP₂-haltige SLBs und die direkte elektrostatische Anbindung F-Aktins an DOEPC-haltige SLBs. Hierbei führte die Präparation PIP₂-haltiger PSLBs mit gebundenem Ezrin T567D zur Instabilität der PSLBs gegen Indentation. Der mögliche Einfluss von gebundenem F-Aktin auf die Lipidmembranmechanik konnte nicht untersucht werden. Die Ausbildung DOEPC-haltiger SLBs resultierte in stabilen Lipidmembranen, welche rasterkraftmikroskopisch vor und nach F-Aktinbindung charakterisiert wurden. Hier zeigte sich, dass durch gebundenes F-Aktin die Lipidmembranen rigider wurden, gemessen an höheren apparenten Federkonstanten/Lipidmembranspannungen. Die höheren Werte lassen sich auf eine, durch das F-Aktinnetzwerk induzierte, eingeschränkte laterale Lipidmobilität zurückführen. Dies resultiert in einer erhöhten Vorspannung der PSLBs, welche das Nachfließen von Lipidmaterial während der Indentation erschwert. Diese Interpretation steht in Einklang zum *Picket-Fence*-Modell der Plasmamembran, welches durch eine F-Aktinnetzwerk-induzierte Kompartimentierung der Plasmamembran eine eingeschränkte Diffusion von Lipiden und (Membran-)Proteinen zwischen den Kompartimenten postuliert.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Aspekte der Verknüpfung zwischen der Plasmamembran und dem Zytoskelett der Zelle charakterisiert. Die Bindung von Ezrin an L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) der Plasmamembran und filamentöses Aktin (F-Aktin) als Funktion des Aktivierungszustands und hierauf aufbauend die Organisation von F-Aktinnetzwerken und deren Einfluss auf die Lipidmembranmechanik wurde an artifiziellen Lipidmembransystemen untersucht.

Im ersten Abschnitt der Arbeit wurde einerseits die Bindungsaffinität und andererseits die Organisation des Plasmamembran- und Zytoskelett-verknüpfenden Proteins Ezrin an festkörperunterstützten Lipidmembranen untersucht. Ezrin kann in zwei Konformationen vorliegen: in einer inaktiven, globulären, N- und C-terminal assoziierten und einer aktivierten, geöffneten, N- und C-terminal dissoziierten Form. Die Aktivierung ist abhängig von der Bindung an das physiologische Rezeptorlipid PIP₂ und der (Pseudo-)Phosphorylierung des Threoninrests 567. Mit Hilfe der detektierten Parameter Proteinhöhe und FRET (FÖRSTER-Resonanzenergietransfer)-Effizienz konnte gezeigt werden, dass Ezrin nur bei Vorliegen beider aktivierender Faktoren eine veränderte Organisation an der Lipidmembranoberfläche aufweist. Hieraus wurde abgeleitet, dass die vollständige Aktivierung sowohl die PIP₂-Bindung als auch die (Pseudo-)phosphorylierung voraussetzt und neben dem Vorliegen einer geöffneten Konformation, welche keine Änderung der Sekundärstruktur mit sich bringt, zu einer weniger dichten Packung der Ezrinmonoschicht auf der SLB führt. Die vorliegenden Ergebnisse stehen in Einklang mit Erkenntnissen zur Aktivierung von Ezrin aus *in vivo*-Experimenten und unterstreichen die physiologische Relevanz des gewählten Modellsystems. Auf Grundlage der Ergebnisse konnte ein weiterentwickeltes Aktivierungsmodell erstellt werden, welches eine geringere Packungsdichte von pseudophosphoryliertem Ezrin an festkörperunterstützten Lipidmembranen bei der Bindung an PIP₂ postuliert. Diese weniger dicht gepackte Anordnung von Ezrin erlaubt die C-terminale F-Aktinbindung. Dies stellt eine Voraussetzung für wichtige dynamische Zellprozesse, wie der Entstehung von Mikrovilli und Filopodien, dar.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde die Netzwerkorganisation von F-Aktin an festkörperunterstützten Lipidmembranen in Abhängigkeit von Verknüpfungspunkten und Aktin-bindenden Proteinen (Fascin und α -Actinin) untersucht. Hierbei wurden zwei verschiedene Ansätze gegenübergestellt: Einerseits wurde F-Aktin über pseu-

dophosphoryliertes Ezrin an PIP₂-haltige SLBs mit variierendem Rezeptorlipidgehalt (welches den Bedingungen einer vollständigen Aktivierung von Ezrin entspricht) und andererseits über eine direkte elektrostatische Verknüpfung mittels des positiv geladenen Lipids 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholin (DOEPC) unter Berücksichtigung des Einflusses der Aktin-bindenden Proteine gebunden. Der direkte Vergleich der physiologischen (über PIP₂ und Ezrin T567D) und elektrostatischen Kopplung der Aktinfilamente an SLBs zeigte (in Abwesenheit von ABPs) bei der Netzwerkanalyse ähnliche Maschengrößen und Segmentlängen, welche eine hohe Übereinstimmung in der Netzwerkdicke und -organisation widerspiegeln.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass mit zunehmender Anzahl an Verknüpfungspunkten (PIP₂-Gehalt der Lipidmembran und Ezrin T567D-Dichte) auch die F-Aktinnetzwerkdicke ansteigt. Auch im zellulären System wird die F-Aktinbindung über eine lokale Anreicherung an PIP₂, resultierend in einer erhöhten Ezrindichte, lokal reguliert um dynamische Prozesse zu ermöglichen.

Die Gegenwart von Aktin-bindenden Proteinen (Fascin und α -Actinin) führte zu einer deutlichen Änderung der Aktinnetzwerkmorphologie, welche anhand einer Vergrößerung der Maschen und größeren Segmentlängen quantifiziert wurde. Sowohl die bestimmten Maschengrößen (400-1200 nm) als auch die Segmentlängen (1.5-3.7 μ m) der F-Aktinnetzwerke weisen eine physiologisch relevante Größenordnung auf und unterstreichen die Eignung des verwendeten *in vitro*-Systems zur Analyse der Verknüpfung von Plasmamembran und Zytoskelett.

Im dritten Abschnitt der Arbeit wurden die Modellsysteme auf porösen Substraten etabliert, um den Einfluss eines F-Aktinnetzwerkes auf die mechanischen Eigenschaften von Lipidmembranen zu untersuchen. Hierzu wurden mittels Rasterkraftmikroskopie Indentationsexperimente an porenüberspannenden Lipidmembranen (PSLBs) durchgeführt. Die lineare Kraftantwort bei der Indentation der PSLB beschreibt die Elastizität der porenüberspannenden Lipidmembranen. Bei der elektrostatischen Anbindung der Aktinfilamente an DOEPC-haltige PSLBs konnte eine Zunahme der apparenten Federkonstante der PSLBs detektiert werden. Die erhöhte Stabilität und Rigidität der PSLBs nach F-Aktinbindung wird darauf zurückgeführt, dass die Lipide in der Aktin-zugewandeten Monoschicht in ihrer lateralen Mobilität gehindert sind und dies eine erhöhte Vorspannung der PSLBs zur Folge hat. Diese Hypothese findet sich in dem *Picket-Fence*-Modell zur Zellmembran wieder, in welchem eine verminderte Diffusion

von Lipiden und (Membran-)Proteinen auf eine Aktin-basierte Kompartimentierung der Plasmamembran zurückgeführt wird.

Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit wichtige Einblicke in die Organisation von F-Aktinnetzwerken an artifiziellen Lipidmembranen gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine vollständige Aktivierung des Linkerproteins Ezrin die Bindung von F-Aktin gewährleistet und über die Variation des PIP₂-Rezeptorlipidgehalts, welcher mit der Ezrindichte korreliert, die F-Aktinnetzwerkdichte direkt gesteuert werden kann. Der Einfluss von Aktin-bindenden Proteinen auf die Aktinnetzwerkmorphologie wurde im Sinne einer Vergrößerung der Maschen und Segmentlängen nachgewiesen. Die Organisation und Reorganisation des F-Aktinzytoskeletts ist essentiell für fundamentale zelluläre Prozesse, wie Zellmorphogenese und -motilität. Die hohe Anzahl an Aktin-bindenden Proteinen und die Vielfalt der ausgebildeten Strukturen spiegeln die Dynamik und Relevanz der lokalen F-Aktindichte wider. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt, korreliert die F-Aktinnetzwerkdichte mit der Membranmechanik und kann über Verknüpfungspunkte und Aktin-bindende Proteine reguliert werden.

8 Literaturverzeichnis

- [1] R. G. Fehon, A. I. McClatchey, A. Bretscher, Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins, *Nature reviews Molecular cell biology* **2010**, 11(4), 276–287.
- [2] D. A. Fletcher, R. D. Mullins, Cell mechanics and the cytoskeleton, *Nature* **2010**, 463(7280), 485–492.
- [3] P. W. Gunning, U. Ghoshdastider, S. Whitaker, D. Popp, R. C. Robinson, The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments, *Journal of Cell Science* **2015**, 128(11), 2009–2019.
- [4] L. R. Otterbein, P. Graceffa, R. Dominguez, The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state, *Science* **2001**, 293(5530), 708–711, molekulares Bild der RCSB PDB www.rcsb.org mit der PDB ID: 1J6Z.
- [5] J. Collins, M. d. Elzinga, The primary structure of actin from rabbit skeletal muscle. Completion and analysis of the amino acid sequence, *Journal of Biological Chemistry* **1975**, 250(15), 5915–5920.
- [6] T. D. Pollard, J. A. Cooper, Actin, a central player in cell shape and movement, *Science* **2009**, 326(5957), 1208–1212.
- [7] D. Pantaloni, C. Le Clainche, M.-F. Carlier, Mechanism of actin-based motility, *Science* **2001**, 292(5521), 1502–1506.
- [8] M.-F. Carlier, V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G.-X. Xia, Y. Hong, N.-H. Chua, D. Pantaloni, Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility, *The Journal of cell biology* **1997**, 136(6), 1307–1322.
- [9] C. Dos Remedios, D. Chhabra, M. Kekic, I. Dedova, M. Tsubakihara, D. Berry, N. Nosworthy, Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments, *Physiol. Rev.* **2003**, 83(2), 433–473.
- [10] T. D. Pollard, J. A. Cooper, Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions, *Annual Review of Biochemistry* **1986**, 55(1), 987–1035.
- [11] G. J. Doherty, H. T. McMahon, Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions, *Annual Review of Biophysics* **2008**, 37, 65–95.
- [12] P. Bieling, L. Laan, H. Schek, E. L. Munteanu, L. Sandblad, M. Dogterom, D. Brunner, T. Surrey, Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro, *Nature* **2007**, 450(7172), 1100–1105.

- [13] F. Ndlec, T. Surrey, A. C. Maggs, S. Leibler, Self-organization of microtubules and motors, *Nature* **1997**, 389(6648), 305–308.
- [14] A. Bretscher, Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells, *The Journal of cell biology* **1983**, 97(2), 425–432.
- [15] S. Tsukita, Y. Hieda, A new 82-kD barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell-to-cell adherens junction: purification and characterization, *The Journal of cell biology* **1989**, 108(6), 2369–2382.
- [16] W. Lankes, A. Griesmacher, J. Grünwald, R. Schwartz-Albiez, R. Keller, A heparin-binding protein involved in inhibition of smooth-muscle cell proliferation, *Biochemical Journal* **1988**, 251(3), 831–842.
- [17] Y. Doi, M. Itoh, S. Yonemura, S. Ishihara, H. Takano, T. Noda, S. Tsukita, S. Tsukita, Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout, *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274(4), 2315–2321.
- [18] H. S. Saleh, U. Merkel, K. J. Geißler, T. Sperka, A. Sechi, C. Breithaupt, H. Morrison, Properties of an ezrin mutant defective in F-actin binding, *Journal of molecular biology* **2009**, 385(4), 1015–1031.
- [19] B. T. Fievet, A. Gautreau, C. Roy, L. Del Maestro, P. Mangeat, D. Louvard, M. Arpin, Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin, *The Journal of cell biology* **2004**, 164(5), 653–659.
- [20] A. Bretscher, K. Edwards, R. G. Fehon, ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex, *Nature reviews Molecular cell biology* **2002**, 3(8), 586–599.
- [21] R. Gary, A. Bretscher, Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site, *Molecular Biology of the Cell* **1995**, 6(8), 1061–1075.
- [22] L. Zhu, J. Hatakeyama, C. Chen, A. Shastri, K. Poon, J. G. Forte, Comparative study of ezrin phosphorylation among different tissues: more is good; too much is bad, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2008**, 295(1), 192–202.
- [23] O. Turunen, T. Wahlström, A. Vaheri, Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family, *The Journal of cell biology* **1994**, 126(6), 1445–1453.
- [24] F. Nakamura, M. R. Amieva, H. Furthmayr, Phosphorylation of threonine 558 in the carboxyl-terminal actin-binding domain of moesin by thrombin activation of human platelets, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270(52), 31377–31385.

- [25] Y. Fukata, K. Kimura, N. Oshiro, H. Saya, Y. Matsuura, K. Kaibuchi, Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase, *The Journal of cell biology* **1998**, 141(2), 409–418.
- [26] R. J. Shaw, M. Henry, F. Solomon, T. Jacks, RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts, *Molecular biology of the cell* **1998**, 9(2), 403–419.
- [27] S. F. Pietromonaco, P. C. Simons, A. Altman, L. Elias, Protein kinase C- θ phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273(13), 7594–7603.
- [28] M. Janke, A. Herrig, J. Austermann, V. Gerke, C. Steinem, A. Janshoff, Actin Binding of Ezrin Is Activated by Specific Recognition of PIP₂-Functionalized Lipid Bilayers, *Biochemistry* **2008**, 47(12), 3762–3769.
- [29] K. Hamada, T. Shimizu, T. Matsui, S. Tsukita, S. Tsukita, T. Hakoshima, Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain, *The EMBO journal* **2000**, 19(17), 4449–4462.
- [30] S. Bosk, Dissertation, Georg-August Universität Göttingen, **2011**.
- [31] S. McLaughlin, J. Wang, A. Gambhir, D. Murray, PIP₂ and proteins: interactions, organization, and information flow, *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **2002**, 31(1), 151–175.
- [32] F. Fernandes, L. M. Loura, A. Fedorov, M. Prieto, Absence of clustering of phosphatidylinositol-(4, 5)-bisphosphate in fluid phosphatidylcholine, *Journal of lipid research* **2006**, 47(7), 1521–1525.
- [33] B. Alberts, J. Lewis, D. Bray, *Molecular biology of the cell*, Garland Science, **2000**.
- [34] D. Raucher, T. Stauffer, W. Chen, K. Shen, S. Guo, J. D. York, M. P. Sheetz, T. Meyer, Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton–plasma membrane adhesion, *Cell* **2000**, 100(2), 221–228.
- [35] A. Zachowski, Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement, *Biochemical Journal* **1993**, 294(1), 1.
- [36] E. G. Tall, I. Spector, S. N. Pentyala, I. Bitter, M. J. Rebecchi, Dynamics of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate in actin-rich structures, *Current Biology* **2000**, 10(12), 743–746.
- [37] J. Donaldson, Arfs, phosphoinositides and membrane traffic, *Biochemical Society Transactions* **2005**, 33(6), 1276–1278.

- [38] J. Tong, L. Nguyen, A. Vidal, S. A. Simon, J. P. Skene, T. J. McIntosh, Role of GAP-43 in sequestering phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate to raft bilayers, *Biophysical journal* **2008**, 94(1), 125–133.
- [39] T. Laux, K. Fukami, M. Thelen, T. Golub, D. Frey, P. Caroni, GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI (4, 5) P₂ at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism, *The Journal of cell biology* **2000**, 149(7), 1455–1472.
- [40] A. Bangham, C. Morley, M. Phillips, The physical properties of an effective lung surfactant, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **1979**, 573(3), 552–556.
- [41] L. Saunders, J. Perrin, D. Gammack, Ultrasonic irradiation of some phospholipid sols, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1962**, 14(1), 567–572.
- [42] M. B. Abramson, R. Katzman, H. P. Gregor, Aqueous dispersions of phosphatidylserine ionic properties, *Journal of Biological Chemistry* **1964**, 239(1), 70–76.
- [43] F. Szoka Jr, D. Papahadjopoulos, Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes), *Annual review of biophysics and bioengineering* **1980**, 9(1), 467–508.
- [44] C.-H. Huang, Phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics, *Biochemistry* **1969**, 8(1), 344–352.
- [45] S. Johnson, The effect of charge and cholesterol on the size and thickness of sonicated phospholipid vesicles, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1973**, 307(1), 27–41.
- [46] A. Forge, P. Knowles, D. Marsh, Morphology of egg phosphatidylcholine-cholesterol single-bilayer vesicles, studied by freeze-etch electron microscopy, *The Journal of membrane biology* **1978**, 41(3), 249–263.
- [47] L. Mathivet, S. Cribier, P. F. Devaux, Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field., *Biophysical journal* **1996**, 70(3), 1112.
- [48] M. I. Angelova, D. S. Dimitrov, Liposome electroformation, *Faraday discussions of the Chemical Society* **1986**, 81, 303–311.
- [49] G. Hannig, S. C. Makrides, Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*, *Trends in biotechnology* **1998**, 16(2), 54–60.
- [50] F. Baneyx, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *Current opinion in biotechnology* **1999**, 10(5), 411–421.

- [51] H. P. Sørensen, K. K. Mortensen, Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*, *Microbial cell factories* **2005**, 4(1), 1.
- [52] F. W. Studier, B. A. Moffatt, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *Journal of molecular biology* **1986**, 189(1), 113–130.
- [53] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature* **1975**, 258, 598–599.
- [54] V. Gaberc-Porekar, V. Menart, Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography, *Journal of biochemical and biophysical methods* **2001**, 49(1), 335–360.
- [55] F. H. Arnold, Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing, *Nature biotechnology* **1991**, 9(2), 151–156.
- [56] U. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **1970**, 227(5259), 680–685.
- [57] P. J. d. Atkins P. W., *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, **2006**.
- [58] SIB Swiss Institute of Bioinformatics, ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>), aufgerufen Februar 2015.
- [59] Y. Kim, S. O. Ho, N. R. Gassman, Y. Korlann, E. V. Landorf, F. R. Collart, S. Weiss, Efficient site-specific labeling of proteins via cysteines, *Bioconjugate chemistry* **2008**, 19(3), 786–791.
- [60] T. Wieland, 50 Jahre Phalloidin, *Naturwissenschaften* **1987**, 74(8), 367–373.
- [61] P. Dancker, I. Löw, W. Hasselbach, T. Wieland, Interaction of actin with phalloidin: Polymerization and stabilization of F-actin, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure* **1975**, 400(2), 407–414.
- [62] J. E. Estes, L. A. Selden, L. C. Gershman, Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of muscle actin, *Biochemistry* **1981**, 20(4), 708–712.
- [63] R. P. Richter, R. Bérat, A. R. Brisson, Formation of solid-supported lipid bilayers: an integrated view, *Langmuir* **2006**, 22(8), 3497–3505.
- [64] E. T. Castellana, P. S. Cremer, Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design, *Surface Science Reports* **2006**, 61(10), 429–444.
- [65] S. Johnson, T. Bayerl, D. McDermott, G. Adam, A. Rennie, R. Thomas, E. Sackmann, Structure of an adsorbed dimyristoylphosphatidylcholine bilayer measured with specular reflection of neutrons, *Biophysical journal* **1991**, 59(2), 289–294.

- [66] B. Seantier, B. Kasemo, Influence of mono-and divalent ions on the formation of supported phospholipid bilayers via vesicle adsorption, *Langmuir* **2009**, 25(10), 5767–5772.
- [67] J. A. Braunger, C. Kramer, D. Morick, C. Steinem, Solid supported membranes doped with PIP2: influence of ionic strength and pH on bilayer formation and membrane organization, *Langmuir* **2013**, 29(46), 14204–14213.
- [68] G. Gauglitz, Multiple reflectance interference spectroscopy measurements made in parallel for binding studies, *Review of scientific instruments* **2005**, 76(6), 062224.
- [69] G. Gauglitz, in *Optical Chemical Sensors*, Springer, **2006**, S. 217–237.
- [70] G. Hernández, *Fabry-Perot Interferometers*, Bd. 3, Cambridge University Press, **1988**.
- [71] G. Gauglitz, G. Proll, in *Biosensing for the 21st Century*, Springer, **2008**, S. 395–432.
- [72] A. H. Harvey, J. S. Gallagher, J. L. Sengers, Revised formulation for the refractive index of water and steam as a function of wavelength, temperature and density, *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **1998**, 27(4), 761–774.
- [73] I. Malitson, Interspecimen comparison of the refractive index of fused silica, *JOSA* **1965**, 55(10), 1205–1208.
- [74] D. Halliday, R. Resnick, J. Walker, *Fundamentals of physics extended*, Bd. 1, John Wiley & Sons, **2010**.
- [75] M. Stephan, Dissertation, Georg-August Universität in Göttingen, **2013**.
- [76] O. Stenzel, *The physics of thin film optical spectra: an introduction*, Bd. 44, Springer Science & Business Media, **2005**.
- [77] G. Gauglitz, A. Brecht, G. Kraus, W. Mahm, Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-) layers, *Sensors and Actuators B: Chemical* **1993**, 11(1), 21–27.
- [78] J. Vörös, The density and refractive index of adsorbing protein layers, *Biophysical journal* **2004**, 87(1), 553–561.
- [79] C. Kramer, Masterarbeit, Georg-August-Universität Göttingen, **2011**.
- [80] J. Kong, S. Yu, Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures, *Acta biochimica et biophysica Sinica* **2007**, 39(8), 549–559.
- [81] A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **2007**, 1767(9), 1073–1101.

- [82] A. Lamola, M. Wrighton, Recommended standards for reporting photochemical data (Recommendations 1983), *Pure and Applied Chemistry* **1984**, 56(7), 939–944.
- [83] J. L. R. Arrondo, A. Muga, J. Castresana, F. M. Goñi, Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Progress in biophysics and molecular biology* **1993**, 59(1), 23–56.
- [84] A. Barth, C. Zscherp, What vibrations tell about proteins, *Quarterly reviews of biophysics* **2002**, 35(04), 369–430.
- [85] L. Bellamy, *The Infrared Spectra of Complex Molecules: Volume Two Advances in Infrared Group Frequencies*, Springer Science & Business Media, **2012**.
- [86] J. Bandekar, Amide modes and protein conformation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1992**, 1120(2), 123–143.
- [87] E. Goormaghtigh, V. Cabiaux, J.-M. Ruyschaert, in *Physicochemical methods in the study of biomembranes*, Springer, **1994**, S. 329–362.
- [88] A. A. Michelson, E. W. Morley, On the Relative Motion of the Earth and of the Luminiferous Ether, *Sidereal Messenger*, vol. 6, pp. 306-310 **1887**, 6, 306–310.
- [89] E. Goormaghtigh, V. Raussens, J.-M. Ruyschaert, Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* **1999**, 1422(2), 105–185.
- [90] L. K. Tamm, S. A. Tatulian, Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers, *Quarterly reviews of biophysics* **1997**, 30(04), 365–429.
- [91] K. K. Chittur, FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces, *Biomaterials* **1998**, 19(4-5), 357–369.
- [92] D. Chandler-Horowitz, P. M. Amirtharaj, High-accuracy, midinfrared ($450\text{ cm}^{-1} \leq \omega \leq 4000\text{ cm}^{-1}$) refractive index values of silicon, *Journal of applied physics* **2005**, 97(12), 3526.
- [93] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **2005**, 1751(2), 119–139.
- [94] D. H. Corrêa, C. H. Ramos, The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function, *African Journal of Biochemistry Research* **2009**, 3(5), 164–173.
- [95] B. Ranjbar, P. Gill, Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses-A Review, *Chemical biology & drug design* **2009**, 74(2), 101–120.

- [96] Dichroweb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>), aufgerufen September 2013.
- [97] L. A. Compton, W. C. Johnson, Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication, *Analytical biochemistry* **1986**, 155(1), 155–167.
- [98] B. A. Wallace, R. W. Janes, *Modern techniques for circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy*, Bd. 1, Ios Press, **2009**.
- [99] G. von Büнау, T. Wolff, *Photochemie: Grundlagen, Methoden, Anwendungen*, VCH-Verlag-Ges., **1987**.
- [100] E. Abbe, Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung, *Archiv für mikroskopische Anatomie* **1873**, 9(1), 413–418.
- [101] M. Minsky, Memoir on inventing the confocal scanning microscope, *Scanning* **1988**, 10(4), 128–138.
- [102] L. Schermelleh, P. M. Carlton, S. Haase, L. Shao, L. Winoto, P. Kner, B. Burke, M. C. Cardoso, D. A. Agard, M. G. Gustafsson, et al., Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy, *Science* **2008**, 320(5881), 1332–1336.
- [103] S. Seiffert, W. Oppermann, Systematic evaluation of FRAP experiments performed in a confocal laser scanning microscope, *Journal of Microscopy* **2005**, 220(1), 20–30.
- [104] D. Axelrod, D. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, W. Webb, Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics, *Biophysical journal* **1976**, 16(9), 1055.
- [105] T. Heyduk, Measuring protein conformational changes by FRET/LRET, *Current opinion in biotechnology* **2002**, 13(4), 292–296.
- [106] E. Van Munster, G. Kremers, M. ADJOBO-HERMANS, T. W. Gadella, Fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement by gradual acceptor photobleaching, *Journal of microscopy* **2005**, 218(3), 253–262.
- [107] D. W. Piston, G.-J. Kremers, Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly, *Trends in biochemical sciences* **2007**, 32(9), 407–414.
- [108] D. Stepensky, FRETcalc plugin for calculation of FRET in non-continuous intracellular compartments, *Biochemical and biophysical research communications* **2007**, 359(3), 752–758.
- [109] SOAX (www.cse.lehigh.edu/~idealab/soax/).

- [110] T. Xu, D. Vavylonis, F.-C. Tsai, G. H. Koenderink, W. Nie, E. Yusuf, I.-J. Lee, J.-Q. Wu, X. Huang, SOAX: A software for quantification of 3D biopolymer networks, *Scientific reports* **2015**, 5.
- [111] T. Xu, H. Li, T. Shen, N. Ojkic, D. Vavylonis, X. Huang, in *Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2011 IEEE International Symposium on*, IEEE, S. 1334–1340.
- [112] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, Atomic force microscope, *Physical Review Letters* **1986**, 56(9), 930.
- [113] T. Ando, T. Uchihashi, S. Scheuring, Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy, *Chemical reviews* **2014**, 114(6), 3120–3188.
- [114] H.-J. Butt, B. Cappella, M. Kappl, Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications, *Surface Science Reports* **2005**, 59(1), 1–152.
- [115] S. Gould, B. Drake, C. Prater, A. Weisenhorn, S. Manne, G. Kelderman, H.-J. Butt, H. Hansma, P. Hansma, S. Magonov, et al., The atomic force microscope: a tool for science and industry, *Ultramicroscopy* **1990**, 33(2), 93–98.
- [116] K. D. Jandt, Atomic force microscopy of biomaterials surfaces and interfaces, *Surface Science* **2001**, 491(3), 303–332.
- [117] I. Mey, M. Stephan, E. K. Schmitt, M. M. Mueller, M. Ben Amar, C. Steinem, A. Janshoff, Local membrane mechanics of pore-spanning bilayers, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131(20), 7031–7039.
- [118] B. Lorenz, I. Mey, S. Steltenkamp, T. Fine, C. Rommel, M. M. Mueller, A. Maiwald, J. Wegener, C. Steinem, A. Janshoff, Elasticity Mapping of Pore-Suspending Native Cell Membranes, *Small* **2009**, 5(7), 832–838.
- [119] B. Lorenz, L. Alvarez de Cienfuegos, M. Oelkers, E. Kriemen, C. Brand, M. Stephan, E. Sunnick, D. Yuksel, V. Kalsani, K. Kumar, et al., Model system for cell adhesion mediated by weak carbohydrate–carbohydrate interactions, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134(7), 3326–3329.
- [120] S. Steltenkamp, M. M. Müller, M. Deserno, C. Hennesthal, C. Steinem, A. Janshoff, Mechanical properties of pore-spanning lipid bilayers probed by atomic force microscopy, *Biophys. J.* **2006**, 91(1), 217–226.
- [121] J. Cleveland, S. Manne, D. Bocek, P. Hansma, A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy, *Review of Scientific Instruments* **1993**, 64(2), 403–405.

- [122] P. Hansma, J. Cleveland, M. Radmacher, D. Walters, P. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie, H. Hansma, C. Prater, et al., Tapping mode atomic force microscopy in liquids, *Applied Physics Letters* **1994**, 64(13), 1738–1740.
- [123] D. Morick, Dissertation, Georg-August Universität in Göttingen, **2012**.
- [124] M. Rasmussen, R. T. Alexander, B. V. Darborg, N. Møbjerg, E. K. Hoffmann, A. Kapus, S. F. Pedersen, Osmotic cell shrinkage activates ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins: activation mechanisms and physiological implications, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2008**, 294(1), 197–212.
- [125] R. Richter, A. Mukhopadhyay, A. Brisson, Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM-D and AFM study, *Biophysical journal* **2003**, 85(5), 3035–3047.
- [126] S. Mornet, O. Lambert, E. Duguet, A. Brisson, The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy, *Nano Letters* **2005**, 5(2), 281–285.
- [127] V. Kiessling, C. Wan, L. K. Tamm, Domain coupling in asymmetric lipid bilayers, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2009**, 1788(1), 64–71.
- [128] A. Janshoff, C. Steinem, Transport across artificial membranes—an analytical perspective, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2006**, 385(3), 433–451.
- [129] R. P. Richter, A. R. Brisson, Following the formation of supported lipid bilayers on mica: a study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry, *Biophysical journal* **2005**, 88(5), 3422–3433.
- [130] J. Jass, T. Tjärnhage, G. Puu, From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study, *Biophysical journal* **2000**, 79(6), 3153–3163.
- [131] Z. Leonenko, A. Carnini, D. Cramb, Supported planar bilayer formation by vesicle fusion: the interaction of phospholipid vesicles with surfaces and the effect of gramicidin on bilayer properties using atomic force microscopy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2000**, 1509(1), 131–147.
- [132] K. Dimitrievski, E. Reimhult, B. Kasemo, V. P. Zhdanov, Simulations of temperature dependence of the formation of a supported lipid bilayer via vesicle adsorption, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2004**, 39(1), 77–86.
- [133] E. Reimhult, F. Höök, B. Kasemo, Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure, *Langmuir* **2003**, 19(5), 1681–1691.

- [134] I. Larson, P. Attard, Surface charge of silver iodide and several metal oxides. Are all surfaces Nernstian?, *Journal of colloid and interface science* **2000**, 227(1), 152–163.
- [135] H. Binder, O. Zschörnig, The effect of metal cations on the phase behavior and hydration characteristics of phospholipid membranes, *Chemistry and physics of lipids* **2002**, 115(1), 39–61.
- [136] I. Reviakine, A. Brisson, Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy, *Langmuir* **2000**, 16(4), 1806–1815.
- [137] M. Beneš, D. Billy, A. Benda, H. Speijer, M. Hof, W. T. Hermens, Surface-dependent transitions during self-assembly of phospholipid membranes on mica, silica, and glass, *Langmuir* **2004**, 20(23), 10129–10137.
- [138] M. Eisenberg, T. Gresalfi, T. Riccio, S. McLaughlin, Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids, *Biochemistry* **1979**, 18(23), 5213–5223.
- [139] I. Levental, A. Cebers, P. A. Janmey, Combined electrostatics and hydrogen bonding determine intermolecular interactions between polyphosphoinositides, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130(28), 9025–9030.
- [140] P. S. Cremer, S. G. Boxer, Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports, *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103(13), 2554–2559.
- [141] A. Mashaghi, M. Swann, J. Popplewell, M. Textor, E. Reimhult, Optical anisotropy of supported lipid structures probed by waveguide spectroscopy and its application to study of supported lipid bilayer formation kinetics, *Analytical chemistry* **2008**, 80(10), 3666–3676.
- [142] N. Kučerka, M.-P. Nieh, J. Katsaras, Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2011**, 1808(11), 2761–2771.
- [143] D. Lupyan, M. Mezei, D. E. Logothetis, R. Osman, A molecular dynamics investigation of lipid bilayer perturbation by PIP2, *Biophysical journal* **2010**, 98(2), 240–247.
- [144] G. Cox, *Optical imaging techniques in cell biology*, CRC Press, **2012**.
- [145] P. Jönsson, M. P. Jonsson, J. O. Tegenfeldt, F. Höök, A method improving the accuracy of fluorescence recovery after photobleaching analysis, *Biophysical journal* **2008**, 95(11), 5334–5348.
- [146] D. N. Chambers, A. Bretscher, Ezrin mutants affecting dimerization and activation, *Biochemistry* **2005**, 44(10), 3926–3932.

- [147] K. L. Gould, A. Bretscher, F. S. Esch, T. Hunter, cDNA cloning and sequencing of the protein-tyrosine kinase substrate, ezrin, reveals homology to band 4.1, *The EMBO journal* **1989**, 8(13), 4133.
- [148] O. Turunen, R. Winqvist, R. Pakkanen, K. Grzeschik, T. Wahlström, A. Vaheri, Cytovillin, a microvillar Mr 75,000 protein. cDNA sequence, prokaryotic expression, and chromosomal localization, *Journal of Biological Chemistry* **1989**, 264(28), 16727–16732.
- [149] A. W. Herrig, Dissertation, Universität Regensburg, **2007**.
- [150] I. Langmuir, The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, *Journal of the American Chemical society* **1918**, 40(9), 1361–1403.
- [151] Z. Leonenko, E. Finot, H. Ma, T. Dahms, D. Cramb, Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy, *Biophysical journal* **2004**, 86(6), 3783–3793.
- [152] J. Nissen, S. Gritsch, G. Wiegand, J. Rädler, Wetting of phospholipid membranes on hydrophilic surfaces-Concepts towards self-healing membranes, *The European Physical Journal B-Condensed Matter and Complex Systems* **1999**, 10(2), 335–344.
- [153] L. K. Tamm, H. M. McConnell, Supported phospholipid bilayers, *Biophysical journal* **1985**, 47(1), 105.
- [154] B. Gerdes, Masterarbeit, Georg-August Universität Göttingen, **2013**.
- [155] M. Jurak, E. Chibowski, Wettability and topography of phospholipid DPPC multilayers deposited by spin-coating on glass, silicon, and mica slides, *Langmuir* **2007**, 23(20), 10156–10163.
- [156] F. Yarrow, B. Kuipers, AFM study of the thermotropic behaviour of supported DPPC bilayers with and without the model peptide WALP23, *Chemistry and physics of lipids* **2011**, 164(1), 9–15.
- [157] J. Mou, D. M. Czajkowsky, Z. Shao, Gramicidin A aggregation in supported gel state phosphatidylcholine bilayers, *Biochemistry* **1996**, 35(10), 3222–3226.
- [158] H. A. Rinia, R. A. Kik, R. A. Demel, M. M. Snel, J. A. Killian, J. P. van der Eerden, B. de Kruijff, Visualization of highly ordered striated domains induced by transmembrane peptides in supported phosphatidylcholine bilayers, *Biochemistry* **2000**, 39(19), 5852–5858.
- [159] J. A. Braunger, Dissertation, Georg-August Universität Göttingen, **2013**.

- [160] W. J. Smith, N. Nassar, A. Bretscher, R. A. Cerione, P. A. Karplus, Structure of the Active N-terminal Domain of Ezrin Conformational and Mobility Changes Identify Keystone Interactions, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278(7), 4949–4956.
- [161] RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1NI2>), aufgerufen März 2016.
- [162] L. Whitmore, B. A. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases, *Biopolymers* **2008**, 89(5), 392–400.
- [163] A. Dong, P. Huang, W. S. Caughey, Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra, *Biochemistry* **1990**, 29(13), 3303–3308.
- [164] P. Tooke, Fourier self-deconvolution in IR spectroscopy, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **1988**, 7(4), 130–136.
- [165] F. G. Haj, P. J. Verveer, A. Squire, B. G. Neel, P. I. Bastiaens, Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum, *Science* **2002**, 295(5560), 1708–1711.
- [166] E. L. Snapp, R. S. Hegde, Rational design and evaluation of FRET experiments to measure protein proximities in cells, *Current Protocols in Cell Biology* **2006**, 17.9.1–20.
- [167] J. Phang, S. Harrop, R. Davies, A. Duff, K. Wilk, P. Curmi, Crystal structure and small angle scattering analysis of ezrin from *E. coli*, **2015**, pDB ID: 4RM9.
- [168] B. P. Cormack, R. H. Valdivia, S. Falkow, FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), *Gene* **1996**, 173(1), 33–38.
- [169] J. Ginestet, Multifluor-fluorescence in situ hybridization (m-fish) imaging techniques using multiple multiband filters with image registration, **2001**, uS Patent 6,225,636.
- [170] P. Mangeat, C. Roy, M. Martin, ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics, *Trends in cell biology* **1999**, 9(5), 187–192.
- [171] L. Zhu, Y. Liu, J. G. Forte, Ezrin oligomers are the membrane-bound dormant form in gastric parietal cells, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2005**, 288(6), C1242–C1254.
- [172] X. Yao, A. Thibodeau, J. G. Forte, Ezrin-calpain I interactions in gastric parietal cells, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **1993**, 265(1), C36–C46.

- [173] V. Shabardina, C. Kramer, B. Gerdes, J. Braunger, A. Cordes, J. Schäfer, I. Mey, D. Grill, V. Gerke, C. Steinem, Mode of ezrin-membrane interaction as a function of PIP₂ binding and pseudophosphorylation, *Biophysical Journal* **2016**, *akzeptiert*.
- [174] B. Catimel, C. Schieber, M. Condron, H. Patsiouras, L. Connolly, J. Catimel, E. C. Nice, A. W. Burgess, A. B. Holmes, The PI (3, 5) P2 and PI (4, 5) P2 Interactomes, *Journal of proteome research* **2008**, 7(12), 5295–5313.
- [175] Y.-H. Wang, A. Collins, L. Guo, K. B. Smith-Dupont, F. Gai, T. Svitkina, P. A. Janmey, Divalent cation-induced cluster formation by polyphosphoinositides in model membranes, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134(7), 3387–3395.
- [176] J. van Rheenen, E. M. Achame, H. Janssen, J. Calafat, K. Jalink, PIP₂ signaling in lipid domains: A critical re-evaluation, *The EMBO journal* **2005**, 24(9), 1664–1673.
- [177] D. W. Hilgemann, Local PIP₂ signals: when, where, and how?, *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **2007**, 455(1), 55–67.
- [178] D. A. Redfern, A. Gericke, Domain formation in phosphatidylinositol monophosphate/phosphatidylcholine mixed vesicles, *Biophysical journal* **2004**, 86(5), 2980–2992.
- [179] L. J. Pike, J. M. Miller, Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273(35), 22298–22304.
- [180] P. A. Janmey, U. Lindberg, Cytoskeletal regulation: rich in lipids, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2004**, 5(8), 658–666.
- [181] A. Gambhir, G. Hangyás-Mihályné, I. Zaitseva, D. S. Cafiso, J. Wang, D. Murray, S. N. Pentyala, S. O. Smith, S. McLaughlin, Electrostatic sequestration of PIP₂ on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins, *Biophysical Journal* **2004**, 86(4), 2188–2207.
- [182] A. Kusumi, T. K. Fujiwara, R. Chadda, M. Xie, T. A. Tsunoyama, Z. Kalay, R. S. Kasai, K. G. Suzuki, Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson's fluid-mosaic model, *Annual review of cell and developmental biology* **2012**, 28, 215–250.
- [183] S. McLaughlin, D. Murray, Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics, *Nature* **2005**, 438(7068), 605–611.
- [184] W. Zhang, E. Crocker, S. McLaughlin, S. O. Smith, Binding of Peptides with Basic and Aromatic Residues to Bilayer Membranes Phenylalanine in the Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate Effector Domain Penetrates into the Hydrophobic Core of the Bilayer, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278(24), 21459–21466.

- [185] I. Levental, P. Janmey, A. Cēbers, Electrostatic contribution to the surface pressure of charged monolayers containing polyphosphoinositides, *Biophysical journal* **2008**, 95(3), 1199–1205.
- [186] Z. T. Graber, A. Gericke, E. E. Kooijman, Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate ionization in the presence of cholesterol, calcium or magnesium ions, *Chemistry and physics of lipids* **2014**, 182, 62–72.
- [187] K. Carvalho, L. Ramos, C. Roy, C. Picart, Giant unilamellar vesicles containing phosphatidylinositol (4, 5) bisphosphate: characterization and functionality, *Biophysical journal* **2008**, 95(9), 4348–4360.
- [188] M. J. Sarmiento, A. Coutinho, A. Fedorov, M. Prieto, F. Fernandes, Ca²⁺ induces PI (4,5) P₂ clusters on lipid bilayers at physiological PI (4,5) P₂ and Ca²⁺ concentrations, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2014**, 1838(3), 822–830.
- [189] G. Arena, S. Musumeci, R. Purrello, S. Sammartano, Calcium-and magnesium-EDTA complexes. Stability constants and their dependence on temperature and ionic strength, *Thermochimica Acta* **1983**, 61(1), 129–138.
- [190] I. Liepiņa, C. Czaplewski, P. Janmey, A. Liwo, Molecular dynamics study of a gelsolin-derived peptide binding to a lipid bilayer containing phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate, *Peptide Science* **2003**, 71(1), 49–70.
- [191] D. A. Redfern, A. Gericke, pH-dependent domain formation in phosphatidylinositol polyphosphate/phosphatidylcholine mixed vesicles, *Journal of lipid research* **2005**, 46(3), 504–515.
- [192] C. A. Helm, L. Laxhuber, M. Lösche, H. Möhwald, Electrostatic interactions in phospholipid membranes I: Influence of monovalent ions, *Colloid and Polymer Science* **1986**, 264(1), 46–55.
- [193] S. A. Pandit, M. L. Berkowitz, Molecular dynamics simulation of dipalmitoylphosphatidylserine bilayer with Na⁺ counterions, *Biophysical journal* **2002**, 82(4), 1818–1827.
- [194] M. Hirai, T. Takizawa, S. Yabuki, Y. Nakata, T. Hirai, K. Hayashi, Salt-dependent phase behaviour of the phosphatidylinositol 4, 5-diphosphate–water system, *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions* **1996**, 92(9), 1493–1498.
- [195] P. A. van Paridon, B. de Kruijff, R. Ouwerkerk, K. W. Wirtz, Polyphosphoinositides undergo charge neutralization in the physiological pH range: a ³¹P-NMR study, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **1986**, 877(1), 216–219.

- [196] M. Stephan, C. Kramer, C. Steinem, A. Janshoff, Binding assay for low molecular weight analytes based on reflectometry of absorbing molecules in porous substrates, *Analyst* **2014**, 139(8), 1987–1992.
- [197] C. Hänel, G. Gauglitz, Comparison of reflectometric interference spectroscopy with other instruments for label-free optical detection, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2002**, 372(1), 91–100.
- [198] G. Gauglitz, Direct optical detection in bioanalysis: an update, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2010**, 398(6), 2363–2372.
- [199] P. D. Gershon, S. Khilko, Stable chelating linkage for reversible immobilization of oligohistidine tagged proteins in the BIAcore surface plasmon resonance detector, *Journal of immunological methods* **1995**, 183(1), 65–76.
- [200] I. T. Dorn, K. R. Neumaier, R. Tampe, Molecular recognition of histidine-tagged molecules by metal-chelating lipids monitored by fluorescence energy transfer and correlation spectroscopy, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120(12), 2753–2763.
- [201] S. Lata, A. Reichel, R. Brock, R. Tampé, J. Piehler, High-affinity adaptors for switchable recognition of histidine-tagged proteins, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127(29), 10205–10215.
- [202] C. Barret, C. Roy, P. Montcourrier, P. Mangeat, V. Niggli, Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂) binding site in the NH₂-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution, *The Journal of cell biology* **2000**, 151(5), 1067–1080.
- [203] V. Niggli, Structural properties of lipid-binding sites in cytoskeletal proteins, *Trends in biochemical sciences* **2001**, 26(10), 604–611.
- [204] N. Kumar, P. Zhao, A. Tomar, C. A. Galea, S. Khurana, Association of villin with phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate regulates the actin cytoskeleton, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279(4), 3096–3110.
- [205] A. Herrig, M. Janke, J. Austermann, V. Gerke, A. Janshoff, C. Steinem, Cooperative adsorption of ezrin on PIP₂-containing membranes, *Biochemistry* **2006**, 45(43), 13025–13034.
- [206] M. Berryman, R. Gary, A. Bretscher, Ezrin oligomers are major cytoskeletal components of placental microvilli: a proposal for their involvement in cortical morphogenesis, *The Journal of cell biology* **1995**, 131(5), 1231–1242.
- [207] A. Bretscher, R. Gary, M. Berryman, Soluble ezrin purified from placenta exists as stable monomers and elongated dimers with masked C-terminal ezrin-radixin-moesin association domains, *Biochemistry* **1995**, 34(51), 16830–16837.

- [208] S. Bosk, J. A. Braunger, V. Gerke, C. Steinem, Activation of F-actin binding capacity of ezrin: synergism of PIP2 interaction and phosphorylation, *Biophysical journal* **2011**, 100(7), 1708–1717.
- [209] H. Reiss, H. Frisch, J. Lebowitz, Statistical mechanics of rigid spheres, *The Journal of Chemical Physics* **1959**, 31(2), 369–380.
- [210] W. J. Ceyrolles, P. Viot, J. Talbot, Kinetics of heterogeneous adsorption: mean-field theory and simulations, *Langmuir* **2002**, 18(4), 1112–1118.
- [211] Q. Li, M. R. Nance, R. Kulikaukas, K. Nyberg, R. Fehon, P. A. Karplus, A. Bretscher, J. J. Tesmer, Self-masking in an intact ERM-merlin protein: an active role for the central α -helical domain, *Journal of molecular biology* **2007**, 365(5), 1446–1459.
- [212] K. Carvalho, N. Khalifat, O. Maniti, C. Nicolas, S. Arold, C. Picart, L. Ramos, Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate-induced conformational change of ezrin and formation of ezrin oligomers, *Biochemistry* **2010**, 49(43), 9318–9327.
- [213] J. J. Jayasundar, J. H. Ju, L. He, D. Liu, F. Meilleur, J. Zhao, D. J. Callaway, Z. Bu, Open conformation of ezrin bound to phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate and to F-actin revealed by neutron scattering, *Journal of Biological Chemistry* **2012**, 287(44), 37119–37133.
- [214] S. Rozovsky, M. B. Forstner, H. Sondermann, J. T. Groves, Single molecule kinetics of ENTH binding to lipid membranes, *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, 116(17), 5122–5131.
- [215] R. V. Stahelin, F. Long, B. J. Peter, D. Murray, P. De Camilli, H. T. McMahon, W. Cho, Contrasting membrane interaction mechanisms of AP180 N-terminal homology (ANTH) and epsin N-terminal homology (ENTH) domains, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278(31), 28993–28999.
- [216] G. Blin, E. Margeat, K. Carvalho, C. A. Royer, C. Roy, C. Picart, Quantitative analysis of the binding of ezrin to large unilamellar vesicles containing phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate, *Biophysical journal* **2008**, 94(3), 1021–1033.
- [217] O. Maniti, K. Carvalho, C. Picart, Model membranes to shed light on the biochemical and physical properties of ezrin/radixin/moesin, *Biochimie* **2013**, 95(1), 3–11.
- [218] T. Matsui, M. Maeda, Y. Doi, S. Yonemura, M. Amano, K. Kaibuchi, S. Tsukita, S. Tsukita, Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association, *The Journal of cell biology* **1998**, 140(3), 647–657.
- [219] S. D. Edwards, N. H. Keep, The 2.7 Å crystal structure of the activated FERM domain of moesin: an analysis of structural changes on activation, *Biochemistry* **2001**, 40(24), 7061–7068.

- [220] M. A. Pearson, D. Reczek, A. Bretscher, P. A. Karplus, Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain, *Cell* **2000**, 101(3), 259–270.
- [221] K. P. Hoefflich, S. Tsukita, L. Hicks, C. M. Kay, S. Tsukita, M. Ikura, Insights into a single rod-like helix in activated radixin required for membrane-cytoskeletal cross-linking, *Biochemistry* **2003**, 42(40), 11634–11641.
- [222] L. Zhu, R. Zhou, S. Mettler, T. Wu, A. Abbas, J. Delaney, J. G. Forte, High turnover of ezrin T567 phosphorylation: conformation, activity, and cellular function, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2007**, 293(3), C874–C884.
- [223] K. Ben-Aissa, G. Patino-Lopez, N. V. Belkina, O. Maniti, T. Rosales, J.-J. Hao, M. J. Kruhlak, J. R. Knutson, C. Picart, S. Shaw, Activation of moesin, a protein that links actin cytoskeleton to the plasma membrane, occurs by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP2) binding sequentially to two sites and releasing an autoinhibitory linker, *Journal of Biological Chemistry* **2012**, 287(20), 16311–16323.
- [224] A. Kapus, P. Janmey, Plasma membrane-cortical cytoskeleton interactions: a cell biology approach with biophysical considerations, *Comprehensive Physiology* **2013**, 3, 1231–1281.
- [225] E. S. Chhabra, H. N. Higgs, The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures, *Nature cell biology* **2007**, 9(10), 1110–1121.
- [226] O. Lieleg, M. M. Claessens, A. R. Bausch, Structure and dynamics of cross-linked actin networks, *Soft Matter* **2010**, 6(2), 218–225.
- [227] I. M. Herman, Actin isoforms, *Current Opinion in Cell Biology* **1993**, 5(1), 48–55.
- [228] G. C. Wong, A. Lin, J. X. Tang, Y. Li, P. A. Janmey, C. R. Safinya, Lamellar phase of stacked two-dimensional rafts of actin filaments, *Physical review letters* **2003**, 91(1), 018103.
- [229] O. Pelletier, E. Pokidysheva, L. S. Hirst, N. Boussein, Y. Li, C. R. Safinya, Structure of actin cross-linked with alpha-actinin: a network of bundles, *Physical Review Letters* **2003**, 91(14), 148102.
- [230] K. A. Taylor, D. W. Taylor, Formation of two-dimensional complexes of F-actin and crosslinking proteins on lipid monolayers: demonstration of unipolar alpha-actinin-F-actin crosslinking, *Biophysical Journal* **1994**, 67(5), 1976–1983.
- [231] B. Demé, D. Hess, M. Tristl, L.-T. Lee, E. Sackmann, Binding of actin filaments to charged lipid monolayers: Film balance experiments combined with neutron reflectivity, *The European Physical Journal E* **2000**, 2(2), 125–136.
- [232] W. Kabsch, J. Vandekerckhove, Structure and function of actin, *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **1992**, 21(1), 49–76.

- [233] R. S. Sedeh, A. A. Fedorov, E. V. Fedorov, S. Ono, F. Matsumura, S. C. Almo, M. Bathe, Structure, evolutionary conservation, and conformational dynamics of Homo sapiens fascin-1, an F-actin crosslinking protein, *Journal of molecular biology* **2010**, 400(3), 589–604.
- [234] V. Schaller, K. M. Schmoller, E. Karaköse, B. Hammerich, M. Maier, A. R. Bausch, Crosslinking proteins modulate the self-organization of driven systems, *Soft Matter* **2013**, 9(30), 7229–7233.
- [235] Y. Tseng, E. Fedorov, J. M. McCaffery, S. C. Almo, D. Wirtz, Micromechanics and ultrastructure of actin filament networks crosslinked by human fascin: a comparison with α -actinin, *Journal of molecular biology* **2001**, 310(2), 351–366.
- [236] R. J. Barfoot, K. H. Sheikh, B. R. Johnson, J. Colyer, R. E. Miles, L. J. Jeuken, R. J. Bushby, S. D. Evans, Minimal F-actin cytoskeletal system for planar supported phospholipid bilayers, *Langmuir* **2008**, 24(13), 6827–6836.
- [237] E. Helfer, S. Harlepp, L. Bourdieu, J. Robert, F. MacKintosh, D. Chatenay, Viscoelastic properties of actin-coated membranes, *Physical Review E* **2001**, 63(2), 021904.
- [238] F. Heinemann, S. K. Vogel, P. Schwille, Lateral Membrane Diffusion Modulated by a Minimal Actin Cortex, *Biophysical Journal* **2013**, 104(7), 1465–1475.
- [239] D. St-Onge, C. Gicquaud, Evidence of direct interaction between actin and membrane lipids, *Biochemistry and Cell Biology* **1989**, 67(6), 297–300.
- [240] L. Limozin, M. Bärmann, E. Sackmann, On the organization of self-assembled actin networks in giant vesicles, *The European Physical Journal E* **2003**, 10(4), 319–330.
- [241] R. Grimard, P. Tancrede, C. Gicquaud, Interaction of actin with positively charged phospholipids: a monolayer study, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1993**, 190(3), 1017–1022.
- [242] G. R. Heath, B. R. Johnson, P. D. Olmsted, S. D. Connell, S. D. Evans, Actin assembly at model-supported lipid bilayers, *Biophysical journal* **2013**, 105(10), 2355–2365.
- [243] G. Isenberg, Actin binding proteins-lipid interactions, *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **1991**, 12(2), 136–144.
- [244] S. Kaufmann, J. Käs, W. Goldmann, E. Sackmann, G. Isenberg, Talin anchors and nucleates actin filaments at lipid membranes A direct demonstration, *FEBS letters* **1992**, 314(2), 203–205.

- [245] A. Behrisch, C. Dietrich, A. A. Noegel, M. Schleicher, E. Sackmann, The actin-binding protein hisactophilin binds in vitro to partially charged membranes and mediates actin coupling to membranes, *Biochemistry* **1995**, 34(46), 15182–15190.
- [246] U. Aebi, R. Millonig, H. Salvo, A. Engel, The Three-Dimensional Structure of the Actin Filament Revisited, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1986**, 483(1), 100–119.
- [247] M. Fritz, M. Radmacher, J. P. Cleveland, M. W. Allersma, R. J. Stewart, R. Giesemann, P. Janmey, C. F. Schmidt, P. K. Hansma, Imaging globular and filamentous proteins in physiological buffer solutions with tapping mode atomic force microscopy, *Langmuir* **1995**, 11(9), 3529–3535.
- [248] E. Helfer, S. Harlepp, L. Bourdieu, J. Robert, F. MacKintosh, D. Chatenay, Buckling of actin-coated membranes under application of a local force, *Physical review letters* **2001**, 87(8), 088103.
- [249] A. Honigsmann, S. Sadeghi, J. Keller, S. W. Hell, C. Eggeling, R. Vink, A lipid bound actin meshwork organizes liquid phase separation in model membranes, *Elife* **2014**, 3, e01671.
- [250] Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode>).
- [251] N. M. Green, Avidin, *Advances in protein chemistry* **1975**, 29, 85–133.
- [252] H. L. Yin, P. A. Janmey, Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton, *Annual review of physiology* **2003**, 65(1), 761–789.
- [253] I. Saotome, M. Curto, A. I. McClatchey, Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine, *Developmental cell* **2004**, 6(6), 855–864.
- [254] O. Maniti, N. Khalifat, K. Goggia, F. Dalonneau, C. Guérin, L. Blanchoin, L. Ramos, C. Picart, Binding of moesin and ezrin to membranes containing phosphatidylinositol (4, 5) bisphosphate: A comparative study of the affinity constants and conformational changes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2012**, 1818(11), 2839–2849.
- [255] J. A. Braunger, B. R. Brückner, S. Nehls, A. Pietuch, V. Gerke, I. Mey, A. Janshoff, C. Steinem, Phosphatidylinositol 4, 5-Bisphosphate Alters the Number of Attachment Sites between Ezrin and Actin Filaments a Colloidal Probe Study, *Journal of Biological Chemistry* **2014**, 289(14), 9833–9843.
- [256] A. Bretscher, Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton, *Annual review of cell biology* **1991**, 7(1), 337–374.

- [257] C. B. Shuster, I. M. Herman, Indirect association of ezrin with F-actin: isoform specificity and calcium sensitivity, *The Journal of cell biology* **1995**, 128(5), 837–848.
- [258] X. Yao, L. Cheng, J. G. Forte, Biochemical characterization of ezrin-actin interaction, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271(12), 7224–7229.
- [259] C. Roy, M. Martin, P. Mangeat, A dual involvement of the amino-terminal domain of ezrin in F- and G-actin binding, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272(32), 20088–20095.
- [260] H. Larsson, U. Lindberg, The effect of divalent cations on the interaction between calf spleen profilin and different actins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1988**, 953, 95–105.
- [261] A. Weber, V. Nachmias, C. Pennise, M. Pring, D. Safer, Interaction of thymosin. beta. 4 with muscle and platelet actin: implications for actin sequestration in resting platelets, *Biochemistry* **1992**, 31(27), 6179–6185.
- [262] L. Rioux, C. Gicquaud, Actin paracrystalline sheets formed at the surface of positively charged liposomes, *Journal of ultrastructure research* **1985**, 93(1-2), 42–49.
- [263] A. Laliberte, C. Gicquaud, Polymerization of actin by positively charged liposomes, *The Journal of cell biology* **1988**, 106(4), 1221–1227.
- [264] G. Salbreux, G. Charras, E. Paluch, Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis, *Trends in cell biology* **2012**, 22(10), 536–545.
- [265] T. D. Pollard, W. C. Earnshaw, J. Lippincott-Schwartz, *Cell biology*, Elsevier Health Sciences, **2007**.
- [266] D. Vignjevic, S.-i. Kojima, Y. Aratyn, O. Danciu, T. Svitkina, G. G. Borisy, Role of fascin in filopodial protrusion, *The Journal of cell biology* **2006**, 174(6), 863–875.
- [267] T. C. Baradet, J. C. Haselgrove, J. W. Weisel, Three-dimensional reconstruction of fibrin clot networks from stereoscopic intermediate voltage electron microscope images and analysis of branching, *Biophysical journal* **1995**, 68(4), 1551.
- [268] J. Wu, B. Rajwa, D. Filmer, C. Hoffmann, B. Yuan, C. Chiang, J. Sturgis, J. Robinson, Automated quantification and reconstruction of collagen matrix from 3D confocal datasets, *Journal of microscopy* **2003**, 210(2), 158–165.
- [269] G. Herberich, A. Ivanescu, I. Gamper, A. Sechi, T. Aach, in *Pattern Recognition*, Springer, **2010**, S. 182–191.
- [270] M. Rusu, Z. Starosolski, M. Wahle, A. Rigort, W. Wriggers, Automated tracing of filaments in 3D electron tomography reconstructions using Sculptor and Situs, *Journal of structural biology* **2012**, 178(2), 121–128.

- [271] C. Winkler, M. Vinzenz, J. V. Small, C. Schmeiser, Actin filament tracking in electron tomograms of negatively stained lamellipodia using the localized radon transform, *Journal of structural biology* **2012**, 178(1), 19–28.
- [272] M. B. Smith, H. Li, T. Shen, X. Huang, E. Yusuf, D. Vavylonis, Segmentation and tracking of cytoskeletal filaments using open active contours, *Cytoskeleton* **2010**, 67(11), 693–705.
- [273] A. Rigort, D. Günther, R. Hegerl, D. Baum, B. Weber, S. Prohaska, O. Medalia, W. Baumeister, H.-C. Hege, Automated segmentation of electron tomograms for a quantitative description of actin filament networks, *Journal of structural biology* **2012**, 177(1), 135–144.
- [274] M. Molteni, D. Magatti, B. Cardinali, M. Rocco, F. Ferri, Fast two-dimensional bubble analysis of biopolymer filamentous networks pore size from confocal microscopy thin data stacks, *Biophysical journal* **2013**, 104(5), 1160–1169.
- [275] F. Amblard, A. C. Maggs, B. Yurke, A. N. Pargellis, S. Leibler, Subdiffusion and anomalous local viscoelasticity in actin networks, *Physical review letters* **1996**, 77(21), 4470.
- [276] C. F. Schmidt, M. Baermann, G. Isenberg, E. Sackmann, Chain dynamics, mesh size, and diffusive transport in networks of polymerized actin: a quasielastic light scattering and microfluorescence study, *Macromolecules* **1989**, 22(9), 3638–3649.
- [277] J. Liu, M. Gardel, K. Kroy, E. Frey, B. D. Hoffman, J. C. Crocker, A. Bausch, D. Weitz, Microrheology probes length scale dependent rheology, *Physical review letters* **2006**, 96(11), 118104.
- [278] A. Ott, M. Magnasco, A. Simon, A. Libchaber, Measurement of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy, *Physical Review E* **1993**, 48(3), 1642.
- [279] H. Isambert, P. Venier, A. C. Maggs, A. Fattoum, R. Kassab, D. Pantaloni, M.-F. Carlier, Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270(19), 11437–11444.
- [280] J. L. Podolski, T. L. Steck, Length distribution of F-actin in Dictyostelium discoideum., *Journal of Biological Chemistry* **1990**, 265(3), 1312–1318.
- [281] J. H. Hartwig, P. Shevlin, The architecture of actin filaments and the ultrastructural location of actin-binding protein in the periphery of lung macrophages., *The Journal of cell biology* **1986**, 103(3), 1007–1020.
- [282] S. Rubino, J. Small, The cytoskeleton of spreading Dictyostelium amoebae, *Protoplasma* **1987**, 136(1), 63–69.

- [283] M. Gardel, F. Nakamura, J. Hartwig, J. Crocker, T. Stossel, D. Weitz, Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103(6), 1762–1767.
- [284] O. Medalia, I. Weber, A. S. Frangakis, D. Nicastro, G. Gerisch, W. Baumeister, Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography, *Science* **2002**, 298(5596), 1209–1213.
- [285] T. T. Falzone, M. Lenz, D. R. Kovar, M. L. Gardel, Assembly kinetics determine the architecture of α -actinin crosslinked F-actin networks, *Nature communications* **2012**, 3, 861.
- [286] G. Bao, S. Suresh, Cell and molecular mechanics of biological materials, *Nature Materials* **2003**, 2(11), 715–725.
- [287] M. Kocun, T. D. Lazzara, C. Steinem, A. Janshoff, Preparation of Solvent-Free, Pore-Spanning Lipid Bilayers: Modeling the Low Tension of Plasma Membranes, *Langmuir* **2011**, 27(12), 7672–7680.
- [288] F. Heinemann, P. Schwille, Preparation of Micrometer-Sized Free-Standing Membranes, *Chemical Physics* **2011**, 12(14), 2568–2571.
- [289] A. Simon, A. Girard-Egrot, F. Sauter, C. Pudda, N. Picollet D'Hahan, L. Blum, F. Chatelain, A. Fuchs, Formation and stability of a suspended biomimetic lipid bilayer on silicon submicrometer-sized pores, *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, 308(2), 337–343.
- [290] G. P. Acuna, M. Bucher, I. H. Stein, C. Steinhauer, A. Kuzyk, P. Holzmeister, R. Schreiber, A. Moroz, F. D. Stefani, T. Liedl, et al., Distance dependence of single-fluorophore quenching by gold nanoparticles studied on DNA origami, *ACS nano* **2012**, 6(4), 3189–3195.
- [291] W. Redwood, F. Pfeiffer, J. Weisbach, T. Thompson, Physical properties of bilayer membranes formed from a synthetic saturated phospholipid in n-decane, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1971**, 233(1), 1–6.
- [292] L. L. G. Schwenen, Dissertation, Georg-August Universität in Göttingen, **2015**.
- [293] Student, The probable error of a mean, *Biometrika* **1908**, 1–25.
- [294] M. Radmacher, M. Fritz, C. M. Kacher, J. P. Cleveland, P. K. Hansma, Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope, *Biophysical journal* **1996**, 70(1), 556–567.
- [295] M. L. Gee, P. M. McGuiggan, J. N. Israelachvili, A. M. Homola, Liquid to solidlike transitions of molecularly thin films under shear, *The Journal of Chemical Physics* **1990**, 93(3), 1895–1906.

- [296] J. H. Hoh, A. Engel, Friction effects on force measurements with an atomic force microscope, *Langmuir* **1993**, 9(11), 3310–3312.
- [297] I. Mey, C. Steinem, A. Janshoff, Biomimetic functionalization of porous substrates: towards model systems for cellular membranes, *Journal of Materials Chemistry* **2012**, 22(37), 19348–19356.
- [298] E. L. Batchelder, G. Hollopeter, C. Campillo, X. Mezanges, E. M. Jorgensen, P. Nassoy, P. Sens, J. Plastino, Membrane tension regulates motility by controlling lamellipodium organization, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, 108(28), 11429–11434.
- [299] M. Gardel, J. Shin, F. MacKintosh, L. Mahadevan, P. Matsudaira, D. Weitz, Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks, *Science* **2004**, 304(5675), 1301–1305.
- [300] B. Wagner, R. Tharmann, I. Haase, M. Fischer, A. Bausch, Cytoskeletal polymer networks: the molecular structure of cross-linkers determines macroscopic properties, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **2006**, 103(38), 13974–13978.
- [301] H. Lee, J. M. Ferrer, M. J. Lang, R. D. Kamm, Molecular origin of strain softening in cross-linked F-actin networks, *Physical Review E* **2010**, 82(1), 011919.
- [302] M. Murrell, L.-L. Pontani, K. Guevorkian, D. Cuvelier, P. Nassoy, C. Sykes, Spreading dynamics of biomimetic actin cortices, *Biophysical journal* **2011**, 100(6), 1400–1409.
- [303] T. Luo, V. Srivastava, Y. Ren, D. N. Robinson, Mimicking the mechanical properties of the cell cortex by the self-assembly of an actin cortex in vesicles, *Applied physics letters* **2014**, 104(15), 153701.
- [304] J. Shin, M. Gardel, L. Mahadevan, P. Matsudaira, D. Weitz, Relating microstructure to rheology of a bundled and cross-linked F-actin network in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101(26), 9636–9641.
- [305] N. Y. Yao, C. P. Broedersz, M. Depken, D. J. Becker, M. R. Pollak, F. C. MacKintosh, D. A. Weitz, Stress-enhanced gelation: A dynamic nonlinearity of elasticity, *Physical review letters* **2013**, 110(1), 018103.
- [306] C.-H. Huang, P.-Y. Hsiao, F.-G. Tseng, S.-K. Fan, C.-C. Fu, R.-L. Pan, Pore-Spanning Lipid Membrane under Indentation by a Probe Tip: A Molecular Dynamics Simulation Study, *Langmuir* **2011**, 27(19), 11930–11942.
- [307] D. Norouzi, M. M. Müller, M. Deserno, How to determine local elastic properties of lipid bilayer membranes from atomic-force-microscope measurements: A theoretical analysis, *Physical Review E* **2006**, 74(6), 061914.

- [308] D. Needham, R. S. Nunn, Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol, *Biophysical journal* **1990**, 58(4), 997.
- [309] J. W. Kuhlmann, I. P. Mey, C. Steinem, Modulating the Lateral Tension of Solvent-Free Pore-Spanning Membranes, *Langmuir* **2014**, 30(27), 8186–8192.
- [310] N. M. Bhatia, W. Nachbar, Finite indentation of an elastic membrane by a spherical indenter, *International Journal of Non-Linear Mechanics* **1968**, 3(3), 307–324.
- [311] M. P. Sheetz, J. Dai, Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension, *Trends in cell biology* **1996**, 6(3), 85–89.
- [312] S. M. Gruner, Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1985**, 82(11), 3665–3669.
- [313] S. M. Gruner, M. Tate, G. Kirk, P. So, D. Turner, D. Keane, C. Tilcock, P. Cullis, X-ray diffraction study of the polymorphic behavior of N-methylated dioleoylphosphatidylethanolamine, *Biochemistry* **1988**, 27(8), 2853–2866.
- [314] M. Esplandiu, H. Hagenström, D. Kolb, Functionalized self-assembled alkanethiol monolayers on Au (111) electrodes: 1. Surface structure and electrochemistry, *Langmuir* **2001**, 17(3), 828–838.
- [315] T. Fine, I. Mey, C. Rommel, J. Wegener, C. Steinem, A. Janshoff, Elasticity mapping of apical cell membranes, *Soft Matter* **2009**, 5(17), 3262–3265.
- [316] A. Kusumi, C. Nakada, K. Ritchie, K. Murase, K. Suzuki, H. Murakoshi, R. S. Kasai, J. Kondo, T. Fujiwara, Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2005**, 34, 351–378.
- [317] P. Saffman, M. Delbrück, Brownian motion in biological membranes, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1975**, 72(8), 3111–3113.
- [318] R. Peters, R. J. Cherry, Lateral and rotational diffusion of bacteriorhodopsin in lipid bilayers: experimental test of the Saffman-Delbrück equations, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1982**, 79(14), 4317–4321.
- [319] K. Ritchie, X.-Y. Shan, J. Kondo, K. Iwasawa, T. Fujiwara, A. Kusumi, Detection of non-Brownian diffusion in the cell membrane in single molecule tracking, *Biophysical journal* **2005**, 88(3), 2266–2277.
- [320] J. Larsen, N. S. Hatzakis, D. Stamou, Observation of inhomogeneity in the lipid composition of individual nanoscale liposomes, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133(28), 10685–10687.

- [321] C. Gicquaud, Actin conformation is drastically altered by direct interaction with membrane lipids: a differential scanning calorimetry study, *Biochemistry* **1993**, 32(44), 11873–11877.
- [322] M. Jocelyn, A. Chahinian, S. K. Maciver, A. Fattoum, N. Bettache, Y. Benyamin, C. Roustan, Gelsolin binds to polyphosphoinositide-free lipid vesicles and simultaneously to actin microfilaments, *Biochemical Journal* **2005**, 386(1), 47–56.

9 Anhang

9.1 Blindexperimente

Bezugnehmend auf Abschnitt 5.2.3 wurden weiterführende Blindexperimente durchgeführt. Im Rahmen der F-Aktinbindungsstudien konnte festgestellt werden, dass ein abnehmender Rezeptorlipidgehalt mit der Entstehung und Anzahl kleiner Defekte in der Lipidmembran korrelierte. Lipidmembranen mit einem Rezeptorlipidgehalt ab 1 mol% PIP₂ wiesen viele Defekte auf und häufig waren Filamente hier lokalisiert. Eine spezifische Bindung F-Aktins über EzrinT567D an PIP₂-haltige SLBs war in diesen Fällen nicht mehr gegeben, beziehungsweise wurde überlagert durch unspezifische Wechselwirkungen zwischen F-Aktin und Membran/Substrat.

Hieran anknüpfend wurden Blindexperimente in zwei voneinander unabhängigen Experimenten an reinen POPC-Lipidmembranen durchgeführt.

Abbildung 9.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer festkörperunterstützten Lipidmembran bestehend aus POPC/TxR (99.8:0.2) nach *in situ* Polymerisation von Aktin. **A:** Roter Kanal, TexasRed®-DHPE(TxR)-Fluoreszenz der Lipidmembran. **B:** Grüner Kanal, AlexaFluor®488-Phalloidin fluoreszenzmarkiertes F-Aktin. In Abwesenheit des Linkerproteins Ezrin und des Lipids PIP₂ bindet F-Aktin (**B**) unspezifisch an die POPC-Lipidmembran (**A**). Maßstabsbalken: 10 µm.

Wie vermutet zeigten sich auch hier viele, kleine Defekte in der POPC-Lipidmembran in Verbindung mit einer deutlich sichtbaren F-Aktinfluoreszenz. Somit scheint ein nicht vorhandener oder geringer PIP₂-Gehalt der Lipidmembran eine unspezifische Wechselwirkung zwischen F-Aktin und Membran/Substrat zu begünstigen.

Auffällig war, dass „normale“, größere Membrandefekte keine Kollokalisierung mit F-Aktin zeigen (vgl. Abb. 6.1), kleinere Lipidmembrandefekte hingegen schon. Eine unspezifische Wechselwirkung zwischen F-Aktin und Substrat (SiO₂-Si-Wafer) erscheint somit unwahrscheinlich. Eine mögliche Erklärung sollte die Rolle von PIP₂ in den Fokus stellen. PIP₂ ist unter physiologischen Bedingungen ungefähr vierfach negativ geladen.³¹ Auch F-Aktin trägt pro Monomer vier negative Ladungen.²³¹ Somit wird die Verknüpfung beider nur über das Linkerprotein Ezrin ermöglicht.

Da die Blindexperimente in Abwesenheit des Linkerproteins durchgeführt wurden, sollte eine repulsive Wechselwirkung zwischen F-Aktin und PIP₂ vorherrschen. Bei sinkenden PIP₂-Gehalt scheinen diese repulsiven Wechselwirkungen nicht mehr auszureichen, um eine unspezifische Interaktion mit dem Matrixlipid POPC zu verhindern. Die Literatur bestätigt, dass F-Aktin (im Gegensatz zu G-Aktin) mit zwitterionischen Lipiden, in Gegenwart von zweiwertigen Kationen im millimolaren Konzentrationsbereich (1-2 mM), wechselwirken kann.^{239,240,321,322} Somit ist die F-Aktinbindung an eine reine POPC-Lipidmembran verständlich. Die Entstehung vieler, kleiner Defekte scheint auch hieraus zu folgen und kann als Indikator der unspezifischen Wechselwirkung gewertet werden. Worin das Auftreten der kleinen Defekte begründet liegt, bleibt ungewiss. Offenbar ist F-Aktin in der Lage Lipidmaterial aus Membranen herauszulösen. Eine ähnliche Beobachtung machten HEATH *et al.* bei der Polymerisation von Aktin an positiv geladenen Gelphasen-Lipidmembranen.²⁴² Aufbauend auf dieser Interpretation wurden zwei weitere, voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Wenn die unspezifische Wechselwirkung F-Aktins mit der Lipidmembran durch eine negative Überschussladung verhindert werden kann, so sollte die Verwendung des negativ geladenen Lipids POPS (1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serin) den gleichen Effekt erzielen. Daher wurden Lipidmembranen bestehend aus POPC/POPS/TxR (89.8:10:0.2) präpariert. Nach anschließender *in situ* Polymerisation mit nicht-muskulärem Aktin, zeigt sich weder eine F-Aktinanbindung noch kleine Defekte in der Lipidmembran.

Abbildung 9.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer festkörperunterstützten Lipidmembran bestehend aus POPC/POPS/TxR (89.8:10:0.2) nach Inkubation mit F-Aktin. **A:** Roter Kanal, TexasRed®-DHPE(TxR)-Fluoreszenz der Lipidmembran. **B:** Grüner Kanal, AlexaFluor®488-Phalloidin fluoreszenzmarkiertes F-Aktin, zeigt keine Fluoreszenz. In Abwesenheit des Linkerproteins Ezrin und des Lipids PIP₂ bindet F-Aktin (**B**) nicht an eine POPC/POPS-Lipidmembran (**A**). Maßstabsbalken: 10 µm.

Für zukünftige Experimente mit niedrigem PIP₂-Gehalt lässt sich ableiten, dass die zusätzliche Verwendung von POPS unbedingt zu empfehlen ist, um eine unspezifische Wechselwirkung zwischen F-Aktin und dem Matrixlipid zu vermeiden. Nur so kann eine aussagekräftige Charakterisierung der spezifischen Bindung zwischen PIP₂ und F-Aktin über Ezrin durchgeführt werden.

9.2 Aminosäuresequenz

9.2.1 Ezrin wt

10	20	30	40	50	60		
MGSS	HHHHHH	SSGLVPRGSH	MASMTGGQOM	GRGSEF	MPKP	INVRVTTMDA	ELEFAIQPNT
70	80	90	100	110	120		
TGKQLFDQVV	KTIGLREVWY	FGLHYVDNKG	FPTWLKLDKK	VSAQEVKRN	PLQFKFRAKF		
130	140	150	160	170	180		
YPEDVAEELI	QDITQKLFFL	QVKEGILSDE	IYCPPETAVL	LGSYAVQAKF	GDYNKEVHKS		
190	200	210	220	230	240		
GYLSSERLIP	QRVMDQHKLT	RDQWEDRIQV	WHAHRGMLK	DNAMLEYLKI	AQDLEMYGIN		
250	260	270	280	290	300		
YFEIKNKKGT	DLWLGVDAIG	LNIYEKDDKL	TPKIGFPWSE	IRNISFNDKK	FVIKPIDKKA		
310	320	330	340	350	360		
PDFVIFYAPRL	RINKRILQLC	MGNHELYMRR	RKPDITIEVQQ	MKAQAREEKH	QKQLERQQLE		
370	380	390	400	410	420		
TEKKRRETVE	REKEQMMREK	EELMLRLQDY	EETKKAERE	LSEIQIRALQ	LEEERKRAQE		
430	440	450	460	470	480		
EAERLEADRM	AALRAKEELE	RQAVDQIKSQ	EQLAAELAAY	TAKIALLEEA	RRRKEDEVVE		
490	500	510	520	530	540		
WQHRAKEAQD	DLVKTKEELH	LVMTA	PPPPP	PPVYEPVSYH	VQESLQDEGA	EPTGYSAELS	
550	560	570	580	590	600		
SEGIRDDRNE	EKRITAEKN	ERVQRQLLTL	SSELSQARDE	NKRTHNDIIH	NENMRQGRDK		
610	620						
YKTLRQIRQG	NTKQRIDEFE	AL					

Abbildung 9.3: Aminosäuresequenz von Ezrin. Rot markiert ist einerseits der His₆-Tag, das Start-codon repräsentierende Methionin und andererseits der Threoninrest 567.

9.2.2 N-ERMAD

```

      10      20      30      40      50      60
MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASMTGGQQM GRGSEFMMPKP INVRVTTMDA ELEFAIQPNT

      70      80      90     100     110     120
TGKQLFDQVV KTIGLREVWY FGLHYVDNKG FPTWLKLDKK VSAQEVVRKEN PLQFKFRAKF

     130     140     150     160     170     180
YPEDVAEELI QDITQKLFFL QVKEGILSDE IYCPPETAVL LGSYAVQAKF GDYNKEVHKS

     190     200     210     220     230     240
GYLSSERLIP QRVMDQHKLT RDQWEDRIQV WHAEHRGMLK DNAMLEYLKI AQDLEMYGIN

     250     260     270     280     290     300
YFEIKNKKGT DLWLGVDALG LNIYEKDDKL TPKIGFPWSE IRNISFNDKK FVIKPIDKKA

     310     320     330
PDFVIFYAPRL RINKRILQLC MGNHELYMRR RKP

```

Abbildung 9.4: Aminosäuresequenz von N-ERMAD. Rot markiert ist einerseits der His₆-Tag und andererseits das Startcodon repräsentierende Methionin.

9.3 Abbildungsverzeichnis

1.1	Die Kristallstruktur von G-Aktin mit gebundenem ADP.	2
1.2	Schematische Darstellung verschiedener spezifischer Aktinnetzwerkstrukturen in Zellen.	3
1.3	Schematische Darstellung der sequentiellen Übereinstimmungen der Proteine der ERM-Proteinfamilie (Ezrin, Radixin, Moesin).	4
1.4	Schematische Darstellung des zweistufigen Aktivierungsprozesses der ERM-Proteine anhand von Ezrin.	6
3.1	Schematische Darstellung der Wechselwirkung des Ni-NTA Säulenmaterials	18
3.2	Strukturformel von AlexaFluor®488 C ₅ -Maleimid.	23
3.3	Strukturformel von AlexaFluor®488 Phalloidin	25
3.4	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von porösen Siliciumnitridsubstraten.	29
3.5	Schematische Darstellung einer porenüberspannenden Lipidmembran (rechts) auf einem poröse goldbedampften und funktionalisierten Substrat (links).	30

3.6	Prinzip des SNELLIUSSCHEN Brechungsgesetzes.	32
3.7	Strahlengang bei der reflektometrischen Interferenzspektroskopie.	33
3.8	Ermittlung des Reflektivitätsspektrums.	35
3.9	Schematischer Aufbau der RIfS-Messzelle.	37
3.10	Schematischer Aufbau der RIfS-Apparatur.	37
3.11	Schematische Darstellung der C=O Streckschwingung einer Peptidbindung.	40
3.12	Schematischer Aufbau eines MICHELSON-Interferometers.	42
3.13	ATR-FTIR-Differenzabsorptionsspektrum vor (grau) und nach (blau) Proteinzugabe von Ezrin T567D.	45
3.14	Schematisch dargestelltes Prinzip eines CD-Spektrometers.	48
3.15	Jablonski-Diagramm.	51
3.16	Schematischer Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops.	52
3.17	Schematischer Aufbau eines Konfokalmikroskops	53
3.18	Parameter für Segmentlängenauswertung mittels SOAX.	60
3.19	Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops.	61
3.20	Schematische Darstellung einer Kraft-Abstandskurve.	63
3.21	Schematische Darstellung einer AFM-Messung im periodischen Kontakt- modus.	64
3.22	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines MLCT Cantilevers.	65
3.23	<i>Force Volume Map</i> und Kraft-Abstandskurven einer porenüberspannen- den Lipidmembran.	67
3.24	Auswertung der Proteinhöhe einer rasterkraftmikroskopischen Aufnahme einer DPPC-Lipidmembran nach Inkubation mit N-ERMAD.	69
3.25	Auswertung der Proteinhöhe einer rasterkraftmikroskopischen Aufnahme einer DPPC-Lipidmembran nach Inkubation mit N-ERMAD.	70
4.1	Zeitaufgelöste Änderung der optischen Schichtdicke <i>OT</i> eines hydrophili- sierten SiO ₂ -Siliciumwafers in Gegenwart divalenter Kationen, detektiert mittels RIfS.	77
4.2	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer festkörperunterstützten Li- pidmembran in Gegenwart von Calciumionen.	79
4.3	Zeitaufgelöste Änderung der optischen Schichtdicke <i>OT</i> eines hydrophi- lisierten SiO ₂ -Siliciumwafers unter Hochsalzbedingungen, detektiert mit- tels RIfS.	81
4.4	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer festkörperunterstützten Li- pidmembran in Gegenwart von Natriumionen.	82

4.5	Zeitaufgelöste Änderung der optischen Schichtdicke <i>OT</i> eines hydrophilisierten SiO ₂ -Siliciumwafers unter Niedrig-pH-Bedingungen, detektiert mittels RIfS.	84
4.6	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer festkörperunterstützten Lipidmembran unter Niedrig-pH-Bedingungen.	85
4.7	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen festkörperunterstützter Lipidmembranen, Darstellung der PIP ₂ -Verteilung.	87
4.8	Zeitreihe eines FRAP-Experiments.	89
4.9	Säulendiagramm, welches die laterale PIP ₂ -Mobilität in POPC/PIP ₂ /BODIPY®TMR-PIP ₂ /Perylen (91:7.5:0.5:1) Lipidmembranen darstellt.	89
4.10	Das SDS-Gel der affinitätschromatographischen Aufreinigung von Ezrin T567D und N-ERMAD.	92
4.11	Zeitaufgelöste Änderung der optischen Schichtdicke <i>OT</i> einer festkörperunterstützten Lipidmembran bei schrittweiser Erhöhung der Ezrinkonzentration, detektiert mittels RIfS.	94
4.12	Adsorptionsisothermen der Bindung von Ezrin wt, Ezrin T567D und Ezrin T567A an festkörperunterstützte Lipidmembranen.	96
4.13	Vergleich der mittels RIfS detektierten maximalen optischen Schichtdickenänderungen nach Bindung von Ezrin an festkörperunterstützte Lipidmembranen.	97
4.14	Zeitaufgelöste Änderung der optischen Schichtdicke <i>OT</i> eines hydrophilisierten SiO ₂ -Siliciumwafers nach Spreiten von Vesikeln, detektiert mittels RIfS.	100
4.15	Zeitaufgelöste Änderung der optischen Schichtdicke <i>OT</i> durch Adsorption des Proteins Ezrin an eine SLB, detektiert mittels RIfS.	102
4.16	Zeitaufgelöste Änderung der optischen Schichtdicke <i>OT</i> eines hydrophilisierten Siliciumwafers funktionalisiert mit einer reinen POPC-Lipidmembran nach Ezrin T567D Zugabe.	103
4.17	Vergleich der mittels RIfS detektierten optischen Schichtdickenänderungen nach Bindung von Ezrin an SLBs mit einem Rezeptorlipidgehalt von 2 mol% beziehungsweise 4 mol%.	104
4.18	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen festkörperunterstützter DPPC-Lipidmembranen.	105

4.19	Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen einer DPPC-Lipidmembran mit einem Rezeptorlipidgehalt von 3 mol%.	107
4.20	Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von DPPC/PIP ₂ /TxR (96.8:3:0.2)-Lipidmembranen nach Inkubation mit Ezrin.	109
4.21	Schematische Gegenüberstellung der Höhenanalyse von AFM-Aufnahmen.	110
4.22	Ergebnisse aus der angepassten Höhenanalyse.	111
4.23	Histogramme, welche die gesamten Proteinhöhenwerte für Ezrin wt und Ezrin T567D an PIP ₂ darstellen.	112
4.24	Histogramme, welche die gesamten Proteinhöhenwerte für Ezrin wt und Ezrin T567D an DOGS-Ni-NTA darstellen.	112
4.25	Histogramme, welche die gesamten Proteinhöhenwerte für N-ERMAD darstellen.	113
4.26	Säulendiagramm, welches die mittels AFM detektierten Proteinhöhen nach Bindung von Ezrin wt, Ezrin T567D und N-ERMAD an SLBs gegenüberstellt.	114
4.27	Gegenüberstellung der ATR-FTIR- und CD-spektroskopischen Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse von N-ERMAD mit der Sekundärstrukturverteilung der Kristallstruktur.	117
4.28	Gegenüberstellung beispielhafter ATR-FTIR-Absorptionsspektren im Bereich von 1710 cm ⁻¹ bis 1600 cm ⁻¹ von Ezrin wt und Ezrin T567D.	119
4.29	Beispiele für die Anpassung der Amid I-Bande von Ezrin wt und Ezrin T567D durch fünf GAUSS-LORENTZ-Kurven.	120
4.30	Beispielhafte CD-Spektren im Bereich von 190 nm bis 260 nm von Ezrin wt und Ezrin T567D.	122
4.31	Gegenüberstellung der ATR-FTIR- und CD-spektroskopisch ermittelten Sekundärstrukturverteilungen von Ezrin wt und Ezrin T567D.	124
4.32	Schematische Darstellung der verwendeten Ezrin wt- und Ezrin T567D-Konstrukte.	126
4.33	Fluoreszenzspektren der Ezrin wt- und Ezrin T567D-Konstrukte.	127
4.34	Akzeptor-Photobleichen von Cy3-Ezrin wt-eGFP gebunden an eine festkörperunterstützte Lipidmembran.	129
4.35	Boxplots, welche die Ergebnisse der FRET-Effizienzanalyse von Lipidmembran-gebundenem Ezrin wt und Ezrin T567D darstellen.	130

4.36	Zusammengefasste Ergebnisse der ermittelten maximalen physikalischen Schichtdicken durch Anbindung von Ezrin wt, Ezrin T567D und Ezrin T567A an festkörperunterstützte Lipidmembranen.	140
4.37	Kristallographische Maße von N-ERMAD bestehend aus drei Untereinheiten.	145
4.38	Schematische Darstellung der unterschiedlichen Bindungsszenarien für Ezrin und N-ERMAD an festkörperunterstützten Lipidmembranen. . . .	148
5.1	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken auf PIP ₂ -haltigen Lipidmembranen.	153
5.2	Der Zusammenhang zwischen F-Aktinnetzwerkdichte und Maschengröße sowie Segmentlänge.	155
5.3	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken auf festkörperunterstützten Lipidmembranen in Abhängigkeit der PIP ₂ -Konzentration und die dazugehörigen ausgewerteten Aufnahmen. . . .	156
5.4	Boxplots, welche die Verteilung der Kreisradien in Abhängigkeit des PIP ₂ -Gehaltes der Lipidmembran darstellen.	157
5.5	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken auf festkörperunterstützten Lipidmembranen in Abhängigkeit der PIP ₂ -Konzentration und die dazugehörigen mittels SOAX ausgewerteten Aufnahmen.	159
5.6	Boxplots, welche die Segmentlängen der F-Aktinfilamente in Abhängigkeit des PIP ₂ -Gehalts der Lipidmembran darstellen.	160
5.7	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer festkörperunterstützten Lipidmembran bestehend aus POPC/PIP ₂ /TxR (97.8:2:0.2) nach Inkubation mit F-Aktin.	161
5.8	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken auf SLBs nach Inkubation mit Calciumionen und die dazugehörigen ausgewerteten Aufnahmen, welche die erkannten Aktinfilamente und Maschengrößen-beschreibenden Kreise zeigen.	163
5.9	Boxplots, welche die Verteilung der Kreisradien, in Abhängigkeit des PIP ₂ -Gehaltes der Lipidmembran in Gegenwart von Calciumionen, darstellen.	164

5.10	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken auf festkörperunterstützten Lipidmembranen in Abhängigkeit der PIP_2 -Konzentration in Gegenwart von Calciumionen und die dazugehörigen mittels SOAX ausgewerteten Aufnahmen.	166
5.11	Boxplots, welche die Segmentlängen der F-Aktinfilamente in Abhängigkeit des PIP_2 -Gehalts der Lipidmembran in Gegenwart von Calciumionen darstellen.	167
5.12	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer festkörperunterstützten DOEPC-haltigen Lipidmembran.	169
5.13	Zeitaufgelöste Änderung der optischen Schichtdicke OT eines hydrophilisierten SiO_2 -Siliciumwafers, detektiert mittels RfS.	170
5.14	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken auf DOEPC-haltigen Lipidmembranen.	172
5.15	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken in Abwesenheit und Gegenwart von Aktin-bindenden Proteinen und die dazugehörigen ausgewerteten Aufnahmen.	173
5.16	Boxplots, welche die Verteilung der Kreisradien auf DOEPC-haltigen SLBs in Abwesenheit und Gegenwart von Aktin-bindenden Proteinen darstellen.	175
5.17	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von F-Aktinnetzwerken auf festkörperunterstützten DOEPC-haltigen Lipidmembranen in An- und Abwesenheit von Aktin-bindenden Proteinen und die dazugehörigen mittels SOAX ausgewerteten Aufnahmen.	176
5.18	Boxplots, welche die Segmentlängen der F-Aktinfilamente in Abhängigkeit des Einflusses von Aktin-bindenden Proteinen darstellen.	177
5.19	Biotin-Streptavidin-Aktin Modellsystem, welches fluoreszenzmikroskopisch eine positive Korrelation zwischen der Aktinnetzwerkdichte und dem biotinylierten Lipid zeigt.	181
6.1	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer festkörperunterstützten Lipidmembran nach Inkubation mit Ezrin T567D und F-Aktin.	195
6.2	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von porenüberspannenden Lipidmembranen bestehend aus POPC/ PIP_2 /Perylen.	197
6.3	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von porenüberspannenden Lipidmembranen bestehend aus POPC/POPE/ PIP_2 /Chol/TxR.	198

6.4	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der gleichen porenüberspannenden, PIP ₂ -haltigen Lipidmembran vor und nach Inkubation mit Ezrin T567D.	199
6.5	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer porenüberspannenden, PIP ₂ -haltigen Lipidmembran nach der Inkubation mit Ezrin T567D und nicht-muskulärem F-Aktin.	200
6.6	Beispielhafte Kraft-Abstandskurve einer porenüberspannenden PIP ₂ -haltigen Membran.	202
6.7	Histogramme, welche die Häufigkeiten der apparenten Federkonstanten für eine PIP ₂ -haltige PSLB vor und nach Anbindung von Ezrin T567D zeigen.	202
6.8	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen DOEPC-haltiger PSLBs nach Inkubation mit muskulärem F-Aktin.	205
6.9	Typische Kraft-Abstandskurven eines Indentationsexperiments einer porenüberspannenden DOEPC-haltigen Lipidmembran.	206
6.10	Histogramme, welche die Häufigkeiten der apparenten Federkonstanten für eine DOEPC-haltige PSLBs vor und nach Anbindung von muskulärem F-Aktin zeigen.	207
6.11	Modell für die Beschreibung der Indentation einer freistehenden Lipidmembran mit einer parabolischen Spitze.	211
6.12	Histogramme, welche die Häufigkeiten der Lipidmembranspannungen für eine PIP ₂ -haltige PSLB vor und nach Anbindung von Ezrin T567D zeigen.	212
6.13	Histogramme, welche die Häufigkeiten der Lipidmembranspannungen für eine DOEPC-haltige PSLBs vor und nach Anbindung von muskulärem F-Aktin zeigen.	212
9.1	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Blindexperiments an einer reinen POPC-Lipidmembran.	249
9.2	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Blindexperiments an einer POPC/POPS-Lipidmembran.	251
9.3	Aminosäuresequenz von Ezrin wt.	252
9.4	Aminosäuresequenz von N-ERMAD.	253

9.4 Tabellenverzeichnis

3.1	Übersicht der eingesetzten Matrixlipide mit dazugehöriger Strukturformel und molarer Masse.	11
3.2	Übersicht der eingesetzten Rezeptorlipide mit dazugehöriger Strukturformel und molarer Masse.	12
3.3	Charakteristische IR-Banden der Peptidbindung.	40
3.4	Zuordnung der Sekundärstrukturelemente zur Amid I-Bandenposition in $^1\text{H}_2\text{O}$	41
3.5	Startparameter für die beiden Auswertemethoden mittels PEAKFIT. . . .	47
3.6	Messparameter der CD-spektroskopischen Messung im fernen UV-Bereich. .	50
3.7	Übersicht der eingesetzten Lipidmembran-gekoppelten Fluorophore mit dazugehöriger Strukturformel und molarer Masse.	56
4.1	Zusammenfassung der den unterschiedlichen Spreitprotokollen entsprechenden Pufferzusammensetzungen.	76
4.2	Zusammenfassung der Ergebnisse der Adsorptionsisothermen nach Anpassung der LANGMUIR-Funktion. Aufgelistet sind die maximalen optischen Schichtdickenänderungen ΔOT_{max} und die Dissoziationskonstante K_D mit den aus der Anpassung resultierenden Fehlern für Ezrin wt, Ezrin T567D und Ezrin T567A an POPC/PIP ₂ - und DOPC/DOGS-Ni-NTA-haltigen Lipidmembranen.	97
4.3	Sekundärstrukturverteilung von N-ERMAD basierend auf der Kristallstruktur des Proteins	116
4.4	ATR-FTIR-spektroskopische Sekundärstrukturverteilung von N-ERMAD basierend auf den aus der Anpassung der Amid I-Bande resultierenden Peakpositionen und -flächenanteilen mit entsprechender Standardabweichung σ	116
4.5	CD-spektroskopische Sekundärstrukturverteilung von N-ERMAD in Lösung. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von DICHROWEB nach dem Algorithmus CDSSTR und dem Referenzdatensatz 4.	117
4.6	ATR-FTIR-spektroskopisch ermittelte Sekundärstrukturverteilung von Ezrin wt und Ezrin T567D basierend auf den aus der Anpassung der Amid I-Bande resultierenden Flächenanteilen der GAUSS-LORENTZ-Kurven mit entsprechender Standardabweichung σ	121

4.7	CD-spektroskopisch ermittelte Sekundärstrukturverteilung von Ezrin wt und Ezrin T567D in An- und Abwesenheit von PIP ₂ basierend auf der Auswertung mittels DICHROWEB nach dem CDSSTR Algorithmus und dem Referenzdatensatz 4 mit entsprechender Standardabweichung σ	123
4.8	Ergebnisse der Dissoziationskonstanten K_D der Bindung der Proteine Ezrin wt, Ezrin T567D und Ezrin T567A an POPC/PIP ₂ - und DOPC/DOGS-Ni-NTA-haltige Lipidmembranen aus RfS- (diese Arbeit) und QCM-Messungen (BOSK) nach LANGMUIR-Anpassung.	142
5.1	Zusammenfassung der ermittelten F-Aktinoberflächenbelegung Θ der Lipidmembran in Abhängigkeit des Ezrin-Proteintyps und der Aktinisoform.	153
5.2	Zusammenfassung der ermittelten F-Aktinoberflächenbelegung Θ in Abhängigkeit des PIP ₂ -Gehaltes und Ezrinoberflächenbelegung der Lipidmembran.	158
5.3	Zusammenfassung der ermittelten F-Aktinoberflächenbelegung Θ in Abhängigkeit des PIP ₂ -Gehaltes der Lipidmembran in Gegenwart von Calciumionen.	165
5.4	Zusammenfassung der ermittelten F-Aktinoberflächenbelegung Θ DOEPC-haltiger Lipidmembranen in An- und Abwesenheit Aktinbindender Proteine.	174

9.5 Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
A	Absorbanz
Abb.	Abbildung
ABP	Aktin-bindendes Protein
Abs.	Abschnitt
AFM	<i>Atomic force microscopy</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion (<i>attenuated total reflectance</i>)
a.u.	<i>Arbitrary units</i>
α	Einfallswinkel

β -BODIPY [®]	2-(4,4-Difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-
500/510 C ₁₂ -HPC	dodecanoyl)-1-hexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
C	Celsius
<i>c</i>	Konzentration
CCD	<i>Charged coupled device</i>
CD	<i>Circular dichroism</i>
C-ERMAD	<i>C-terminal ERM association domain</i>
CLSM	Konfokale Laserrastermikroskopie
<i>c</i>	Zenti-
Cy [®] 3	Cyanin [®] 3
<i>d</i>	Physikalische Schichtdicke
<i>d_p</i>	Eindringtiefe
<i>D</i>	Diffusionskonstante
DAG	Diacylglycerol
DOEPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-ethylphosphocholin
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOGS Ni-NTA	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-([N-(5-amino-1-carboxypentyl)- iminodiessigsäure]-succinyl)Ni-Salz
DTT	Dithiothreitol
δ	Phasenverschiebung
Δ	Änderung
<i>E</i>	Extinktion, Amplitude
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Etylenglycoltetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
ϵ	Extinktionskoeffizient
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
F	filamentös
<i>F</i>	Kraft
FERM	Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin
<i>F_m</i>	Immobilierter Anteil

FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
FRET	FÖRSTER-Resonanzenergietransfer
FTIR	FOURIER-Transform-Infrarot
FWHM	Halbwertsbreite (<i>Full width at half maximum</i>)
G	globulär
GUV	<i>Giant unilamellar vesicle</i>
h	Stunde
<i>h</i>	Höhe
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His ₆	sechs Histidinreste
<i>I</i>	(Fluoreszenz-)Intensität
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
IRE	Inneres Reflexionselement
ITO	<i>Indium tin oxide</i>
K	Kelvin
<i>k</i>	Kraftkonstante, Federkonstante
<i>k</i> _{app}	apparente Federkonstante
<i>k</i> _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	<i>Lysogeny broth</i>
λ	Wellenlänge
LUV	<i>Large unilamellar vesicle</i>
<i>M</i>	Molare Masse
M	Molar
m	Milli-, Meter
MARCKS	Myristoylated, alanine-rich C-kinase substrate
min	Minute
μ	Mikro-
n	Nano-
<i>n</i>	Brechungsindex, Anzahl, Messhäufigkeit
N-ERMAD	<i>N-terminal ERM association domain</i>

OD	Optische Dichte
OT	Optische Schichtdicke
p	Druck
p	Piko-
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PH	<i>Pleckstrin-Homology</i>
PIP ₂	L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPS	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoserin
PP	Polyprolin
PSLB	Porenüberspannende Lipidmembran (<i>pore spanning lipid bilayer</i>)
QCM	Quartz crystal microbalance
R	Reflektivität
r	Fresnel Koeffizient, Kreisradius
r_1	Ionenradius
RIfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
ROI	Region of interest
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
s	Strecke, Weglänge
σ	Membranspannung, Standardabweichung
SAM	<i>Self assembled monolayer</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SiO ₂	Siliciumdioxid
SLB	festkörperunterstützte Lipidmembran (<i>supported lipid bilayer</i>)
SUV	<i>Small unilamellar vesicle</i>
t	Zeit
T	Temperatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Θ	Oberflächenbelegung, Elliptizität
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
Vis	Sichtbar (<i>visible</i>)
wt	Wildtyp
ζ	Maschengröße

9.6 Chemikalien

Agar	Merck, Darmstadt
APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Chloroform abs.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Complete mini, EDTA-free	Roche, Grenzach-Whylen
Coomassie Brilliant Blue R-250	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DOEPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
DOPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
DOGS Ni-NTA	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eisessig	Fisher Scientific, Nidderau
Ethanol abs.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hellmanex	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
H ₂ O ₂ , 30 % in Wasser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Imidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IPTG	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
KCl	Carl Roth, Karlsruhe
KOH	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol abs.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Mucosal [®]	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	VWR International, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt

NH ₃ , 25 % in Wasser	VWR International, Darmstadt
PIP ₂	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
POPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Salzsäure, konz.	Merck, Darmstadt
SDS	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

9.7 Materialien

Cantilever MSCT/MSNL-10	Bruker AFM Probes, Camarillo (USA)
Cantilever MLCT	Bruker AFM Probes, Camarillo (USA)
Dialyseschläuche VISKING	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Parafilm	American National Can, Chicago (USA)
Pumpschläuche, Tygon	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Quarzküvette 105-QS/110-QS	Hellma GmbH, Müllheim
Reagenzgläser	VWR International, Darmstadt
Siliciumwafer	CrysTec GmbH, Berlin
poröse Si ₃ N ₄ Substrate	fluXXion, Eindhoven (Niederlande)

9.8 Geräte- und Softwareverzeichnis

Reflektometrische Interferenzspektroskopie

LS-1 Wolfram Halogenlampe	Ocean Optics Germany GmbH, Ostfildern
gegabelte, optische Faser, UV-Vis	Ocean Optics Germany GmbH, Ostfildern
ADC1000-USB, A/D Konverter	Ocean Optics Germany GmbH, Ostfildern
SD2000, fiberoptisches Miniaturspektrometer	Ocean Optics Germany GmbH, Ostfildern

Epifluoreszenzmikroskopie

Olympus BX51	Olympus, Hamburg
--------------	------------------

Konfokale Laserrastermikroskopie

LSM 710 Examiner	Carl Zeiss, Jena
Objektiv WPlan APOChromat 63x/1.0	Carl Zeiss, Jena

Rasterkraftmikroskopie

MFP-3D	Asylum Research, Santa Barbara (USA)
Nano Wizard 3	JPK Instruments, Berlin

Spektrometer

Jasco 810	Jasco Corporation, Tokio (Japan)
Jasco V-650	Jasco Corporation, Tokio (Japan)
Varian Cary Scan 50	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Vertex 70	Bruker Corporation, Billerica (USA)

Zentrifugen

Allegra™ X-22R, Rotor SX4250	Beckman Coulter, Krefeld
Galaxy mini	VWR, Darmstadt
Heraeus Fresco 17	Thermo, Waltham (USA)
Optima™ L-90K, Rotor SW28	Beckman Coulter, Krefeld

Sonstige Geräte

Feinwaage OHAUS Adventurer	OHAUS, Pine Brook (USA)
Feinwaage Sartorius CP225D	Sartorius, Göttingen
Gelelektrophoreseapparatur PerfectBlue	Peqlab, Erlangen
Perimax 16/2, Peristaltikpumpe	Spetec GmbH, Erding
pH-Meter Calimatic 766	Knick, Berlin
Plasmacleaner Plasma Cleaner PDC 32 G-2	Harrick Plasma, Ithaca (USA)
Reinstwasseranlage MilliQ Gradient A10	Millipore, Billerica (USA)
Schüttelinkubator SM 30	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tip-Sonifier Sonoplus HD2070	Bandelin, Berlin
Ultraschallbad Sonorex RK 255 H	Bandelin, Berlin
Vakuumtrockenschrank VD 23	Binder, Tuttlingen
Vortexer	Heidolph, Schwabach

Software

ImageJ (Fiji)

<http://www.fiji.sc/>

Gwyddion 2.34

<http://gwyddion.net/>

MatLab R2008-2014

MathWorks, Natick (USA)

PeakFit 4.12

Seasolve, San Jose (USA)

Spectra Suite

Ocean Optics Germany GmbH, Ostfildern

Origin Pro 8.5G

OriginLab Corporation, Northhampton

ZEN 2012

Carl Zeiss, Jena

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Claudia Steinem für die Bereitstellung des interessanten Themas und der wissenschaftlichen Betreuung während der Promotionszeit bedanken. Ihre unkomplizierte und nette Hilfestellung bei auftretenden Problemen, sowie wertvolle Anregungen haben zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Sarah Köster für die bereitwillige Übernahme des Korreferats, für die interessanten Diskussionen über den Fortschritt meiner Arbeit und die unkomplizierte, elektronische Kommunikation.

Dr. Ingo Mey bin ich sehr dankbar für die tatkräftige Unterstützung der MATLAB-basierten Datenanalysen. Seine Hilfestellung bei Problemen jeder Art war stets sehr wertvoll.

Besonders Jutta Gerber-Nolte, aber auch Michaela Klingebiel bin ich für die Unterstützung bei den vielen auch größeren Kleinigkeiten rund um den Laboralltag dankbar.

Vielen Dank auch an die drei Damen aus dem Sekretariat: Marianne Wagener, Melanie Sorhage und Dana Sachs. Bei Fragen rund um Formalitäten und organisatorische Dinge ist man hier stets gut aufgehoben.

Auch der tatkräftigen studentischen Unterstützung meiner Arbeit bin ich zu Dank verpflichtet. Vielen Dank an Oli, Andrea, Jonas, Lars und Jannik.

Das Korrekturlesen ist nicht immer eine Freude und darum danke ich Benni, Ole, Jonas, Markus, Johannes, Oli, Miri und Jan umso mehr für wichtige Hinweise und entdeckte grobe Unstimmigkeiten.

Martin möchte ich danken, da Motivation und Mitgefühl während der Schreibphase essentielle Dinge sind und als Leidensgenosse versteht man das einfach besser.

Vielen Dank an den gesamten Arbeitskreis für die schöne gemeinsame Zeit. Die Zusammenarbeit hat mir immer wieder aufs neue Spaß bereitet und ihr wart maßgeblich daran beteiligt, dass ich auch die Tiefpunkte der Promotion ertragen konnte. Nicht zu vergessen sind an dieser Stelle die großartigen, gemeinsamen Messzeiten.

Marcus und Lutz, euch möchte ich aus tiefstem Herzen danken, ihr seid die zwei wichtigsten Männer in meinem Leben. Ich bin dankbar für jeden gemeinsamen Augenblick und für eure Unterstützung besonders während der Endphase meiner Promotion. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft.

Auch meinen Chemikern möchte ich danken. Ihr habt mir den Uni-Alltag stets versüßt. Besonders Benni und Arne haben mich zum Ende sehr unterstützt, indem sie mich motiviert und mir den Rücken freigehalten haben. Nicht zu vergessen sei Gela, die als Nicht-Chemikerin beim Rücken freihalten auch ganz vorn mitgemischt hat. Danke.

Abschließend möchte ich noch meiner gesamten Familie und insbesondere meinen Eltern von ganzem Herzen danken. Danke, dass ihr die Zeit hier in Göttingen mit ermöglicht habt und dass ich immer auf euch zählen kann.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Corinna Kramer
Geburtsdatum: 06.09.1985
Geburtsort: Haltern, Deutschland
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: liiert, einen Sohn (Lutz Reiner mann, *08.05.2015)

Ausbildung

2012-2016 **Promotion** Georg-August-Universität, Göttingen, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie (Prof. Dr. C. Steinem), Titel der Doktorarbeit: *Verknüpfung zwischen Plasmamembran und Zytoskelett: Charakterisierung der Organisation von Ezrin und F-Aktin an artifiziellen Lipidmembranen*

2010-2012 **Masterstudium** in Chemie, Georg-August-Universität, Göttingen, Titel der Masterarbeit: *Charakterisierung von Ezrin an festkörperunterstützten Membranen mittels reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIFS): Zusammenhang zwischen Aktivierung und Konformation*

2007-2010 **Bachelorstudium** in Chemie, Georg-August-Universität, Göttingen, Titel der Bachelorarbeit: *Untersuchung der Wechselwirkung von N-ERMAD mit PIP₂-haltigen Modellmembranen mittels Quarzmikrowaagetechnik*

2006-2007 **Bachelorstudium** in Chemie, Ruhr-Universität, Bochum

2005-2006 **Ausbildung** Gesundheits- und Krankenpflegerin, Clemenshospital, Münster

1996-2005 **Allgemeine Hochschulreife** am Clemens-Brentano Gymnasium, Dülmen

Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

2016 V. Shabardina and C. Kramer, B. Gerdes, J. Braunger, A. Cordes, J. Schäfer, I. Mey, D. Grill, V. Gerke, C. Steinem, Mode of ezrin-membrane interaction as a function of PIP₂ binding and pseudophosphorylation, *Biophysical Journal* **2016**, accepted.

- 2014 Biophysical Society 58th Annual Meeting, San Francisco, *Posterpräsentation*, Titel: Mechanics of F-Aktin–Membrane Composites Investigated by Atomic Force Microscopy.
- 2014 M. Stephan, C. Kramer, C. Steinem, A. Janshoff, Binding assay for low molecular weight analytes based on reflectometry of absorbing molecules in porous substrates, *Analyst* **2014**, 139, 1987–1992.
- 2013 J. A. Braunger and C. Kramer, D. Morick, C. Steinem, Solid Supported Membranes Doped with PIP₂: Influence of Ionic Strength and pH on Bilayer Formation and Membrane Organization, *Langmuir* **2013**, 29, 14202–14213.
- 2013 9th European Biophysics Congress – EBSA, Lissabon, *Posterpräsentation*, Titel: Cytoskeletal interaction forces characterized by means of atomic force microscopy. Auszeichnung: Posterpreis.
- 2012 Forschungsforum Sartorius, Göttingen, *Posterpräsentation*, Titel: Activated ezrin links F-actin to artificial membranes: mechanical properties of the actin cytoskeletal network.
- 2012 Annual Meeting of the German Biophysical Society, Göttingen, *Posterpräsentation*, Titel: Investigation of the activation process of the membrane cytoskeleton linking protein ezrin.