

Wechselwirkung von Ezrin mit PIP₂-haltigen artifiziellen Membransystemen und mit F-Aktin

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie –
der Universität Regensburg



vorgelegt von
Wolfgang Alexander Herrig
aus Trier

2007

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 2003 bis März 2006 unter der Leitung von Prof. Dr. C. Steinem am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie – der Universität Regensburg und in der Zeit von April 2007 bis Mai 2007 am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht im Juni 2007.

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2007

- | | |
|-----------------------|-------------------------|
| 1. Prüfer: | Prof. Dr. C. Steinem |
| 2. Prüfer: | Prof. Dr. A. Göpferich |
| 3. Prüfer: | Prof. Dr. R. Sterner |
| Prüfungsvorsitzender: | Prof. Dr. M. Liefländer |

Meinen Eltern

Abstract. The aim of this study was to characterize and quantify the adsorption process and the lateral organisation of ezrin on phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) containing solid-supported membranes by means of quartz crystal microbalance (QCM) and scanning force microscopy (SFM). An increase in the PIP_2 content in 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) bilayers resulted in an increased amount of bound ezrin showing the specificity of ezrin for PIP_2 . No ezrin adsorption to membranes composed of pure POPC was detected. QCM-measurements revealed that the majority of the protein binds irreversibly to PIP_2 -doped membranes, which might be a result of lateral interactions between ezrin molecules. Time-elapsed SFM images show the two-dimensional growth of protein domains starting from a few nucleation sites, stressing the idea of a cooperative adsorption of ezrin on membranes doped with PIP_2 . Taking lateral interactions into account, it was possible to simulate adsorption and desorption kinetics obtained from time-resolved QCM readouts by employing a model developed by Allen P. Minton. In addition, on the basis of the kinetic analysis it was possible to reconstruct the adsorption isotherm with a binding constant $K_{\text{Ads}} = 10^8 \text{ M}^{-1}$.

The second aim of this study was to investigate the activation process of ezrin resulting in the unmasking of the actin-binding site in the C-terminal domain. One possible activation pathway is discussed to be based on the interaction of ezrin with S100P in a Ca^{2+} -dependent manner. The results of this study however, do not indicate any specific interaction between the two proteins.

By means of fluorescence microscopy it was shown, for the first time that ezrin is activated only through binding to PIP_2 . The capability of ezrin to bind fluorescently-labeled actin filaments was investigated after adsorption of the protein to PIP_2 and Ni-1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-([N(5-amino-1-carboxypentyl)iminodi acetic acid]succinyl) containing membranes. Respectively, fluorescently-labeled F-actin structures were only detected in the case of adsorption of ezrin to PIP_2 containing membranes, indicating the conformational change from the dormant to the active state. By means of pixel analysis the coverage of actin filaments was determined to $(24 \pm 18)\%$ for an ezrin saturated POPC / PIP_2 (9:1) membrane and to $(0,3 \pm 0,2)\%$ for an ezrin saturated DOPC / Ni-NTA-DOGS (9:1) membrane.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	13
1.1	Ezrin und die ERM-Proteinfamilie	13
1.1.1	Struktur und Aufbau von Ezrin.....	14
1.1.2	Aktivierung von Ezrin	16
1.2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP ₂)	18
1.2.1	Vorkommen und Funktionen von PIP ₂	18
1.2.2	Wechselwirkung von Ezrin mit PIP ₂	20
1.3	Zytoskelett	22
1.3.1	Mikrotubuli	22
1.3.2	Intermediärfilamente.....	23
1.3.3	Aktinfilamente	23
2	Zielsetzung.....	29
3	Materialien und Methoden.....	31
3.1	Proteinisolierung.....	31
3.1.1	Genexpression in <i>E. coli</i> Bakterien.....	31
3.1.2	Aufreinigung der 6 × His fusionierten Proteine Ezrin und N-ERMAD aus <i>E. coli</i>	31
3.1.3	Aufreinigung der GST fusionierten Proteine Ezrin T567D, Ezrin T567A und N-ERMAD aus <i>E. coli</i>	32
3.1.4	Aufreinigung des 6 × His fusionierten Proteins S100P aus <i>E. coli</i> ...	33
3.2	Präparative Methoden	35
3.2.1	Proteolytische Abspaltung des GST-Tags	35
3.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
3.2.3	Western Blot Analyse	37
3.2.4	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	38
3.2.5	Polymerisierung von Aktin.....	39
3.2.6	Herstellung multilamellarer und unilamellarer Vesikel.....	39
3.2.7	Vesikelbindungsstudien	40
3.2.8	Präparation festkörperunterstützter, artifizieller Membransysteme...	41
3.3	Biophysikalische Methoden.....	44

3.3.1	Impedanzspektroskopie	44
3.3.2	Quarzmikrowaage.....	48
3.3.3	Ellipsometrie.....	56
3.3.4	Fluoreszenzmikroskopie	61
4	Ergebnisse.....	65
4.1	Proteinisolierung.....	65
4.1.1	Expression und Aufreinigung der 6 × His-fusionierten Proteine Ezrin und N-ERMAD	65
4.1.2	Expression und Aufreinigung der GST fusionierten Proteine Ezrin T567D, Ezrin T567A und N-ERMAD	69
4.1.3	Expression und Aufreinigung des 6 × His-fusionierten Proteins S100P.....	72
4.2	Modell zur Auswertung der kooperativen Adsorption von Teilchen an Oberflächen	74
4.3	Impedanzspektroskopische Charakterisierung der festkörperunterstützten Membranen	84
4.4	Untersuchung der Membranbindungseigenschaften von Ezrin.....	86
4.4.1	Wechselwirkung von N-ERMAD mit PIP ₂ -haltigen Membranen	86
4.4.2	Wechselwirkung von Ezrin mit PIP ₂ -haltigen Membranen	91
4.5	Interaktion von Ezrin mit S100P	102
4.5.1	Wechselwirkung von N-ERMAD mit S100P.....	102
4.5.2	Wechselwirkung von Ezrin mit S100P.....	109
4.6	Interaktion von Ezrin mit Aktin	114
4.6.1	Untersuchung der Interaktion von Ezrin mit Aktin mittels Ellipsometrie.....	114
4.6.2	Mikrogravimetrische Untersuchung der Interaktion von Ezrin mit F-Aktin	120
4.6.3	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Ezrin – F-Aktin-Interaktion.....	125
5	Diskussion	135
5.1	Diskussion der Proteinisolierungen	135
5.1.1	Isolierung der 6 × His-fusionierten Proteine N-ERMAD und Ezrin	135

5.1.2	Isolierung der GST-fusionierten Protein EzrinT567D, EzrinT567A und N-ERMAD.....	136
5.1.3	Isolierung von 6 × His-fusionierten S100P.....	137
5.2	Diskussion der Membranbindungseigenschaften von Ezrin.....	139
5.3	Diskussion der Ezrinaktivierung.....	147
5.3.1	Aktivierung von Ezrin über S100P	147
5.3.2	Aktivierung von Ezrin über PIP ₂	149
6	Zusammenfassung	161
7	Literaturverzeichnis	163
8	Anhang.....	173
8.1	Chemikalien und Reagenzien	173
8.2	Materialien	174
8.3	Geräte	175
8.4	Abkürzungsverzeichnis.....	176
8.5	Symbolverzeichnis.....	177

1 EINLEITUNG

1.1 Ezrin und die ERM-Proteinfamilie

Ezrin vermittelt die Bindung zwischen der Plasmamembran und dem Zytoskelett der Zelle und reguliert so Zellgestalt, Zellbewegung, Endo- und Exocytoseprozesse und die Signaltransduktion¹⁻⁵. Obwohl eine enorme Anzahl von Proteinen bekannt ist, die den Auf-, Um-, und Abbau von Aktinfilamenten modulieren und regulieren, sind Proteine, die eine direkte Verknüpfung der Membran mit Zytoskelettelementen bewerkstelligen, noch relativ wenig erforscht. Die dabei wohl am besten untersuchte Klasse ist die weit verbreitete Ezrin-Radixin-Moesin-Proteinfamilie (ERM), deren Mitglieder vor allem an aktinreichen Strukturen von (Epithel)zellen lokalisiert sind. So ist Ezrin erstmals in Mikrovilli⁶ und als Substrat für spezifische Tyrosinkinasen⁷ identifiziert worden. Radixin wurde als aktinbindendes Protein in Leber-Gürteldesmosomen⁸ und Moesin als Bindungspartner von Heparin entdeckt⁹. Kennzeichnend für die ERM-Proteine ist die etwa 300 Aminosäuren umfassende FERM-Domäne (*four-point one protein, ezrin, radixin, moesin*), deren Ursprung auf das Protein 4.1 zurückzuführen ist, das als Prototyp dieser Proteinsuperfamilie fungiert¹⁰. Die Aminosäuresequenz der FERM-Domäne zeigt eine Übereinstimmung von etwa 85 % innerhalb der Vertebraten. Die am meisten divergierenden ERM-Proteine sind in Bandwürmern gefunden worden, die verglichen mit den Aminosäuresequenzen der Proteine aus Vertebraten nur noch eine Gleichheit von 44-58 % aufweisen³. Durch den hohen Grad an Homologie ist es oft schwer, den einzelnen Mitgliedern der ERM-Proteinfamilie eine eindeutige und abgegrenzte Funktion *in vivo* zuzuordnen, da sie oft ähnliche oder überlappende Aufgaben erfüllen. Beispielsweise unterscheiden sich Moesin-*knock-out*-Mäusen phänotypisch nicht von normalen Mäusen¹¹. Zwar wurde durch den Einsatz von *antisense*-Oligonukleotiden in Zellkulturen gezeigt, dass ERM-Proteine für die Ausbildung von Mikrovilli notwendig sind, aber auch bestätigt, dass sie zumindest teilweise überlappende Funktionen besitzen¹². Durch kürzlich erschienene Studien konnten Ezrin zum Teil definiertere Funktionen zugewiesen werden¹³. Während der Entwicklung und Morphogenese von Darmepithelien von Mäusen wird ausschließlich Ezrin exprimiert. Durch Einsatz von Ezrin-*knock-out*-Mäusen wurde der Einfluss von Ezrin auf die entsprechenden Prozesse untersucht. Dabei wurde

festgestellt, dass Ezrin sowohl bei der korrekten Ausbildung von Mikrovilli als auch bei der Modulierung der apikalen Membran sowie bei der Formation von Zellverknüpfungen eine entscheidende Rolle spielt¹⁴.

1.1.1 Struktur und Aufbau von Ezrin

Ezrin, auch als Cytovillin oder p81 bezeichnet, besteht aus 586 Aminosäuren (Abb. 1.1). Wie für die ERM-Proteinfamilie charakteristisch, ist Ezrin aus einer etwa 300 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Domäne sowie einer aus ca. 100 Aminosäuren bestehenden C-terminalen Domäne aufgebaut.

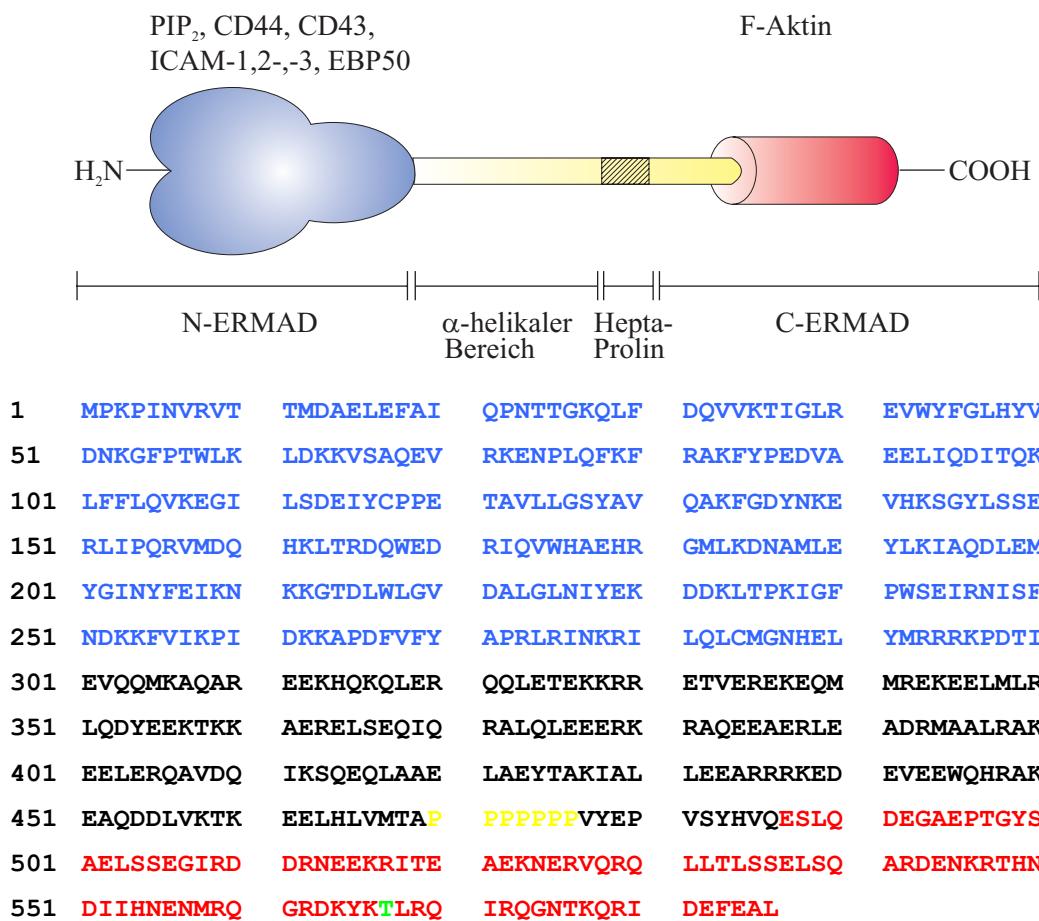


Abb. 1.1 Aminosäuresequenz und schematischer Aufbau von Ezrin. Über die globuläre, N-terminale Domäne (blau) wird die Membranbindung vermittelt, während die C-terminale Domäne (rot) eine Bindungsstelle für Aktinfilamente aufweist. Die beiden Domänen sind über einen α -helikalen Bereich, der eine Heptaproline-Sequenz enthält (gelb) miteinander verbunden. An Aminosäureposition 567 befindet sich ein Threoninrest (grün), der phosphoryliert werden kann.

Dabei zeigt sich die N-terminale Domäne für die Wechselwirkung mit Membranproteinen, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) sowie verschiedenen Signalproteinen verantwortlich³, während über die C-terminale Domäne die Interaktion mit F-Aktin erfolgt^{15; 16}. Beide Domänen sind über eine α -helikale *coiled-coil* Region miteinander verbunden, welche typischerweise eine Heptaprolinsequenz enthält (Abb. 1.1).

Im cytosolischen, nicht-aktiven Protein sind die N-terminale und die C-terminale Proteindomäne intramolekular assoziiert und werden entsprechend als N-ERMAD (N-ERM association domain) und C-ERMAD bezeichnet. Dieser Status wird auch als *dormant state* bezeichnet, weil beide Domänen gegenseitig ihre Bindungsstellen für andere Moleküle maskieren. Um den Aktivierungsprozess der ERM-Proteine, sprich die Dissoziierung der beiden Domänen voneinander, zu verstehen, ist es wichtig einen genaueren Blick auf die strukturellen Besonderheiten dieser Proteinfamilie zu werfen. Bis dato ist es noch nicht gelungen die komplette Kristallstruktur von einem Mitglied der ERM-Proteinfamilie aufzuklären. Jedoch konnte jeweils die FERM-Domäne der entsprechenden Proteine kristallisiert werden¹⁷⁻¹⁹. Wie man anhand der kristallinen N-terminalen Domäne von Ezrin (Aminosäuren 1-297, PDB-Code: 1NI2) erkennt, resultiert eine globuläre, kleeblattartige Proteinstruktur, welche wie bereits erwähnt mit PIP_2 wechselwirken kann (Abb. 1.2).

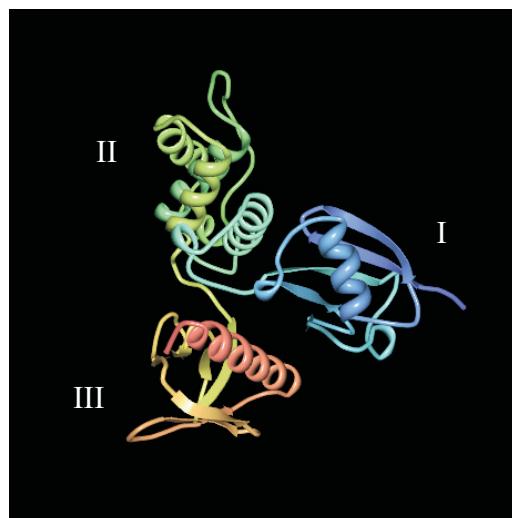


Abb. 1.2 Struktur der N-terminalen Domäne von Ezrin. Man erkennt deutlich den kleeblattartigen Aufbau mit den Subdomänen I, II und III. (PDB-Code: 1NI2, dargestellt durch ProteinWorkshop 1.50)¹⁷

Durch Mutationen in der N-terminalen Domäne konnte die Bindungsstelle für PIP₂ auf die Aminosäuren 12-115 und 233-310 lokalisiert werden²⁰. Beide Regionen enthalten ein in der ERM-Proteinfamilie konserviertes, aus basischen Aminosäuren bestehendes KK(X)_nK/RK-Bindungsmotiv. Durch den Austausch von Lysinresten durch Asparagin konnte die Wechselwirkung von Ezrin mit PIP₂ nahezu vollständig aufgehoben werden²⁰. Ein weiterer Schritt zu einem möglichst vollständigen Bild der Struktur und damit des Aktivierungsprozesses der ERM-Proteine, gelang Pearson et al.²¹ durch die 1:1-Kristallisierung der FERM-Domäne von Moesin und dessen C-terminalen Restes. Interessanterweise bildet die aus 90 Aminosäuren bestehende C-terminale Domäne keine globuläre Form aus, sondern nimmt eine gestreckt-gewundene Struktur an, die einen großen Teil der Oberfläche der FERM-Domäne (2700 Å) bedeckt. Neben Regionen, in welchen die Interaktion der beiden Domänen über Wassermoleküle vermittelt wird, treten 3 Kontaktstellen auf, an denen spezifische Aminosäuren in Bindungstaschen lokalisiert sind und über diese durch starke hydrophobe Wechselwirkungen ein enger Kontakt hergestellt wird. Zusätzlich bedingen elektrostatische Wechselwirkungen, die auf der Interaktion von negativ geladenen Aminosäuren auf der Oberfläche der FERM-Domäne mit positiv geladenen Resten der C-terminalen Domäne beruhen, eine enge Bindung der beiden Proteindomänen. In Übereinstimmung dazu ist der FERM/C-ERMAD-Komplex sehr stabil gegenüber Proteolyse, während der freie C-terminale Rest sehr sensiv auf proteolytischen Abbau reagiert.

1.1.2 Aktivierung von Ezrin

Zur Erfüllung seiner Funktion als Membran-Zytoskelett verknüpfendes Protein, ist eine Aktivierung von Ezrin nötig, da durch die intramolekulare Wechselwirkung von N-ERMAD mit C-ERMAD sowohl Bindungsstellen für Membranproteine als auch für F-Aktin maskiert sind. Eine Möglichkeit, die Dissoziation der beiden Domänen zu induzieren, besteht in der Phosphorylierung eines spezifischen Threoninrestes in der C-terminalen Domäne von Ezrin^{22; 23}. Auch konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Moesin zu einer konformativen Aktivierung führt, die durch sterische und elektrostatische Effekte der eingeführten Phosphatgruppe bedingt wird²¹.

Ein entscheidender Aspekt hierbei ist die Frage, durch welche Effektoren die Phosphorylierung *in vivo* initiiert wird. Die Regulierung des Aktivierungszustandes der ERM-Proteine und die damit einhergehende Ausbildung von aktinhaltigen Strukturen in der Zelle wird über Signalkaskaden, an denen eine Reihe von kleinen GTPasen (Rho, Rac, Cdc42) beteiligt sind, gesteuert²⁴. Durch spezifische extrazelluläre Signale werden die GTPasen aktiviert und organisieren so morphologische Änderungen der Zelle. Allerdings wird die exakte Beteiligung der einzelnen GTPasen bezüglich der Aktivierung der ERM-Proteine kontrovers diskutiert. Einige Studien schreiben Rho einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung zu²⁵⁻²⁷, während andere Untersuchungen Rac als spezifischen Faktor in der Signaltransduktion sehen²⁸.

Zusätzlich zu der Möglichkeit, die Aktivierung von Ezrin durch Phosphorylierung zu steuern, haben Koltzscher et al.²⁹ einen alternativen Aktivierungsmechanismus von Ezrin vorgeschlagen. Hierbei wurde ein Mitglied der S100-Proteinfamilie, S100P identifiziert, das in der Lage ist, maskiertes Ezrin Ca²⁺-abhängig zu binden. Kennzeichnend für die S100-Proteine ist das Vorhandensein zweier EF-Hand-Ca²⁺-Bindungsstellen. Neben der spezifischen Interaktion von Ezrin mit S100P, die zu einer möglichen Aktivierung von Ezrin und damit zur Befähigung des Proteins zur Bindung von Aktinfilamenten führt, ist eine Reihe weiterer S100-Proteine bekannt, die mit dem Zytoskelett in Verbindung gebracht werden. S100A1 und B assoziieren mit den aktinbindenden Proteinen Caldesmon und CapZ und regulieren so möglicherweise den Aufbau der Aktinfilamente, während S100A10 das Protein Annexin 2 an die Plasmamembran rekrutiert und so die Bindung zum kortikalen Zytoskelett vermittelt^{30; 31}.

Als eine dritte Möglichkeit der Aktivierung von ERM-Proteinen rückt in letzter Zeit immer mehr der Einfluss von PIP₂ in den Blickpunkt. Bevor jedoch auf die Fragestellung der Wechselwirkung von Ezrin mit PIP₂ eingegangen wird, soll zunächst ein kurzer Überblick über das Phospholipid PIP₂ und dessen Funktionen in der Zelle gegeben werden.

1.2 Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂)

1.2.1 Vorkommen und Funktionen von PIP₂

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, abgekürzt PIP₂, stellt das bei weitem häufigste Polyphosphatidylinositol in Säugetierzellen dar. Eine Besonderheit von PIP₂ im Vergleich zu anderen Phospholipiden ist dessen relativ große, unter physiologischen Bedingungen 3-fach negativ geladene Kopfgruppe. Trotz der Vielzahl von unterschiedlichen Funktionen, die PIP₂ erfüllt, beträgt der prozentuale Anteil des Lipids nur etwa 1 % in der Plasmamembran und ist asymmetrisch zwischen der cytoplasmatischen und der extrazellulären Seite verteilt³². Interessanterweise befinden sich etwa 20 % des gesamten PIP₂s in der extrazellulären Membranseite, wobei die genaue Funktion des Lipids noch nicht vollständig geklärt ist³³.

Bis vor etwa 25 Jahren war die Funktion von PIP₂ schnell erklärt und beschränkte sich hauptsächlich auf seine Rolle als Quelle der beiden *second-messenger* Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃), wobei IP₃ für die Ausschüttung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern verantwortlich ist^{34; 35}. Neben dieser wichtigen Aufgabe sind heute eine Reihe weiterer Funktionen bekannt, die durch PIP₂ vermittelt werden. So ist die Anheftung von Zytoskelettelementen an Membranen, die Beteiligung an Endo- und Exocytoseprozessen, die Membransortierung sowie die Aktivierung von Enzymen durch PIP₂ dokumentiert³⁶⁻³⁸. Im Rahmen dieser Arbeit stand insbesondere der Einfluss von PIP₂ auf die Ezrin-F-Aktin-Bindung im Fokus. Neben der Interaktion von Ezrin mit PIP₂ ist das Phospholipid jedoch auch in der Lage mit einer Reihe weiterer Proteine wechselzuwirken und so das Aktinzytoskelett der Zelle zu regulieren. Ein interessanter Artikel, der detailliert einen Überblick über die Regulierung des Aktinauf- und abbaus durch Phosphatidylinositole und Ca²⁺ beschreibt, findet sich bei Paul A. Janmey³⁹. Hier wird ein Modell vorgeschlagen, nach welchem Ca²⁺ und Phosphatidylinositole das Aktinzytoskelett in entgegengesetzter Weise regulieren. Während Ca²⁺ den Abbau bzw. die Abtrennung von Aktinfilamenten induziert, wird durch Neusynthese oder Umorganisation von Phosphatidylinositolen eine Reassemblierung des Aktinzytoskelettes erreicht. Ein weiteres Indiz dafür, dass PIP₂ eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Membran-Zytoskelettverknüpfung spielt, konnte durch Messung der Adhäsionsenergie zwischen der Plasmamembran und dem

Zytoskelett nachgewiesen werden. Hierbei wurde gezeigt, dass die Hydrolyse von PIP₂ zu einer Erniedrigung der Adhäsionsenergie führt und damit PIP₂ eine dynamische Rolle bei der Regulierung des cortikalen Aktinzytoskelettes spielt⁴⁰. Durch den Einsatz verschiedenster Methoden⁴¹ konnte eine Vielzahl von Proteinen identifiziert werden, die mit PIP₂ interagieren und an aktinreichen Zellstrukturen lokalisiert sind³⁶. Dadurch stellt sich die Frage, wie dieses komplexe Zusammenspiel von PIP₂, Proteinen und dem Zytoskelett *in vivo* reguliert wird. Um die zahlreichen Prozesse, an denen PIP₂ beteiligt ist, plausibel beschreiben zu können, wird vermutet, dass in der Zelle verschiedene Membranbereiche existieren, in welchen PIP₂ angereichert vorliegt. Solche PIP₂-reichen Membranareale könnten in der Zelle als Anheftungspunkte für den Aufbau des Aktinzytoskelettes dienen. Prinzipiell werden zwei Modelle für eine lokale Anreicherung von PIP₂ in der Plasmamembran diskutiert^{36; 37}. Zum einen könnte eine lokale Produktion von PIP₂ durch spezifische Kinasen die Verteilung des Lipids in der Membran bestimmen, zum anderen könnte die Reorganisierung von PIP₂ auf der Wechselwirkung mit bestimmten Proteinen oder anderen Lipiden beruhen. So ist eine Reihe von Enzymen, die für die Synthese von Phosphatidylinositolen verantwortlich sind, an aktin-reichen Membranbereichen gefunden worden und favorisieren das Modell einer lokalen Produktion von PIP₂. Ein Aspekt, der allerdings berücksichtigt werden muss, ist die relativ hohe Diffusionsgeschwindigkeit von Phosphatidylinositolen ($D \sim 0,5 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$), welche durch FRAP-Messungen bestimmt wurde⁴² und so eine lokale Anreicherung von PIP₂ in relativ kleinen, submikroskopischen Lipiddomänen ($\phi \sim 100 \text{ nm}$) unwahrscheinlich erscheinen lassen. Demzufolge kann die Bildung kleiner PIP₂-haltiger Domänen ausgeschlossen werden, es sei denn PIP₂ wird durch andere Lipide oder Proteine so stabilisiert, dass die Diffusion stark vermindert ist. Dies führt zu einem anderen möglichen Mechanismus, der zu einer lokalen Anreicherung von PIP₂ führen könnte. Dieses Modell beruht auf einer Wechselwirkung von PIP₂ mit spezifischen Proteinen, die als eine Art „Puffer“ wirken, PIP₂ binden und sich so innerhalb bestimmter Membranbereiche konzentrieren. Ein Molekül, das in dieser Weise fungieren könnte, ist MARCKS (*myristoylated alanine-rich C kinase substrate*), welches ebenfalls in aktinreichen Strukturen von Zellen gefunden wurde⁴³. MARCKS besitzt eine aus basischen Aminosäuren bestehende Domäne, die über nicht-spezifische elektrostatische Wechselwirkungen mit hoher Affinität mit PIP₂ interagiert⁴⁴ und in der Lage ist, PIP₂ in der Membran anzureichern⁴⁵. Letztlich

könnten die auf diese Weise mit PIP₂ angereicherten Membranbereiche als Ausgangspunkt für weitere Protein-PIP₂-Interaktionen dienen und so als Ankerpunkt für Aktinfilamente fungieren. Zusammenfassend betrachtet stellt die Regulierung an der Membran-Zytoskelett-Grenzfläche der Zelle ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Moleküle dar, in welchem PIP₂ als ein entscheidender Faktor beteiligt ist. Nach diesem kurzen Überblick über die vielfältigen Funktionen und Aufgaben von PIP₂, soll im Folgenden die Wechselwirkung von Ezrin mit PIP₂ betrachtet und dabei insbesondere die Aktivierung von Ezrin beleuchtet werden.

1.2.2 Wechselwirkung von Ezrin mit PIP₂

Die Bindung von PIP₂ wird über die N-terminale Domäne von Ezrin vermittelt und ermöglicht somit die Rekrutierung des Proteins an die Membran. Dabei handelt es sich nicht nur um eine rein elektrostatische Bindung, was daran deutlich wird, dass Ezrin in der Lage ist zwischen verschiedenen negativ geladenen Phospholipiden zu diskriminieren. So konnte durch Vesikelkoppelletierungsassays demonstriert werden, dass Ezrin nur an PIP₂ bindet, nicht jedoch an Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol-4-monophosphat oder Phosphatidylinositol⁴⁶. Die Bindung an PIP₂ erfolgt über spezifische Lysinreste in der kleeblattartigen N-terminalen Domäne von Ezrin, wobei die Lysinreste in verschiedenen Subdomänen lokalisiert sind. Dabei sind vor allem Lys63 und Lys64 in Subdomäne I und Lys253, Lys254, Lys262 und Lys263 in Subdomäne III entscheidend für die Wechselwirkung von Ezrin mit PIP₂. So konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Ezrin mit PIP₂ stark beeinträchtigt bzw. ganz aufgehoben wird, wenn diese Lysinreste durch Asparagin ausgetauscht werden. Die 4 Lysinreste der Subdomäne III bilden zusammen mit den beiden Lysinresten der Subdomäne I ein Dreieck, welches eine relativ planare Fläche umfasst²⁰. Da die Lysinreste der beiden Subdomänen relativ weit entfernt stehen, ist eine simultane Bindung von einem PIP₂-Molekül unwahrscheinlich. Vielmehr wird diskutiert, dass die Bindung von Ezrin an die Membran über mehrere PIP₂-Bindungsstellen vermittelt wird⁴⁷.

Unabhängig von der Art und Weise wie die Bindung zwischen Ezrin und PIP₂ zustande kommt, zeichnen sich in letzter Zeit immer mehr Indizien ab, dass, bedingt durch die PIP₂-Bindung, Ezrin aktiviert wird. Zwar konnte eine Aktivierung von Ezrin, d.h. die Befähigung des Proteins zur Bindung von Aktinfilamenten, die ausschließlich auf PIP₂ zurückzuführen ist, bis dato noch nicht nachgewiesen

werden, allerdings kristallisiert sich der entscheidende Einfluss von PIP₂ immer deutlicher heraus. So konnte durch Überexpression von PIP-Kinasen, die zur Bildung von PIP₂ führen, eine verstärkte Lokalisierung von Ezrin an Mikrovilli und Gürteldesmosomen, also an aktinreichen Strukturen der Zelle detektiert werden²⁸. In einer anderen Studie wurden Untersuchungen beschrieben, in denen die Bindung von PIP₂ an Ezrin eine Voraussetzung für eine nachfolgende Phosphorylierung des Proteins ist⁴⁸. Hier wurde eine Ezrinmutante verwendet, die nicht in der Lage ist an PIP₂ zu binden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das Protein ausschließlich im Zytoplasma und nicht an Mikrovilli lokalisiert ist. Durch Einsatz eines spezifischen Antikörpers, der gegen die Phosphorylierung an Position 567 von Ezrin gerichtet ist, wurde zudem gezeigt, dass die Ezrinmutante nicht phosphoryliert werden kann.

1.3 Zytoskelett

Das Zytoskelett der Zelle besteht aus Mikrotubuli, Aktinfilamenten und Intermediärfilamenten und ist an der Ausbildung der Zellstruktur sowie an nahezu allen zellulären Prozessen beteiligt, wie Zellbewegung, Zellteilung, Transportvorgängen und Endo- und Exocytoseprozessen. Anders als der Name „Skelett“ vermuten lässt, handelt es sich um äußerst dynamische Strukturelemente, die einem ständigen Auf-, Um- und Abbau unterworfen sind. In Abb. 1.3 ist schematisch die zelluläre Lokalisierung der einzelnen Zytoskelettelemente dargestellt, wobei diese je nach Zelltyp mehr oder weniger variabel ist. Im Folgenden sollen die drei Zytoskelettelemente beschrieben werden, wobei ein besonderer Augenmerk auf den Aktinfilamenten liegt.

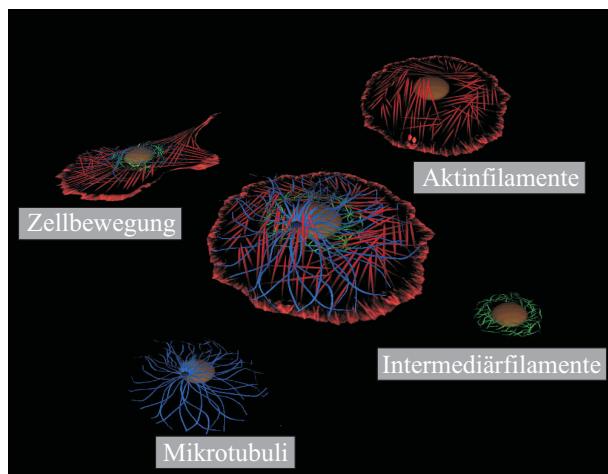


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Zytoskelettelemente innerhalb einer Zelle.⁴⁹

1.3.1 Mikrotubuli

Bei den Mikrotubuli handelt es sich um langgestreckte, polymere Proteine, die in Form eines Hohlzylinders vorliegen. Deren einzelner Baustein bildet ein Heterodimer aus α - und β -Tubulin. Verglichen mit den anderen beiden Zytoskelettkomponenten besitzen die Mikrotubuli den größten Durchmesser, welcher etwa 24 nm beträgt. In der Zelle erfüllen die Mikrotubuli eine Reihe von wichtigen Funktionen: Sie zeigen sich für den Cilienschlag verantwortlich, sind für den intrazellulären Transport von Vesikeln zuständig, lenken die Morphogenese von Axonen und spielen eine zentrale Rolle bei der Anordnung und Trennung der Chromosomen während der Mitose und Meiose. Ähnlich den Aktinfilamenten sind Mikrotubuli polare Strukturen, welche ein Plus- und ein Minusende aufweisen. An

den Mikrotubuliorganisationszentren (MTOC), zu denen z.B. Centrosomen und Basalkörper gehören, erfolgt die Bildung der Mikrotubuli, wobei die Minusenden meist zu den MTOCs orientiert sind. Die Neubildung sowie der Abbau der Mikrotubuli erfolgt bevorzugt am Plusende und wird durch die Temperatur und GTP reguliert. Zwei gut untersuchte Motorproteine der Mikrotubuli, die den intrazellulären Transport regulieren, sind Kinesin und Dynein. Hierbei vermittelt Kinesin den Transport von Membranvesikeln oder Lysosomen in Richtung Plusende, während Dynein typischerweise die Transportprozesse in Richtung des Minusendes der Mikrotubuli leitet⁵⁰⁻⁵².

1.3.2 Intermediärfilamente

Die Intermediärfilamente bilden eine relativ heterogene Gruppe von Proteinen, die in nahezu allen mehrzelligen Eukaryoten nachgewiesen wurden und die sich durch ihre α -helikale *coiled-coil* Struktur auszeichnen. Die Fibrillen weisen charakteristischerweise einen Durchmesser von 10 – 12 nm auf, woraus auch die Bezeichnung Intermediärfilamente resultiert. Im Allgemeinen handelt es sich bei den Intermediärfilamenten um relativ stabile Proteinfibrillen, die im Unterschied zu den Mikrotubuli und den Aktinfilamenten keine Nukleotide binden. Zu den bekanntesten Vertretern der Intermediärfilamente gehören Keratine und Desmine. Hauptsächlich erfüllen Intermediärfilamente strukturelle Aufgaben wie Verstärkung von Zellen und deren Verbindung zu Gewebeverbänden und sind der Hauptbestandteil in Nägeln und Haaren⁵³⁻⁵⁵.

1.3.3 Aktinfilamente

Aktin ist das in einer eukaryotischen Zelle am häufigsten vorhandene Protein und liegt je nach Zelltyp in Konzentrationen bis zu mehreren hundert Mikromolar vor⁵⁶; ⁵⁷. Die Entdeckung von Aktin geht auf Straub zurück, der 1942 das Protein aus Muskelgewebe isolierte⁵⁸. Bei monomerem, globulärem Aktin (G-Aktin) handelt es sich um ein Nukleotid-bindendes, aus 375 Aminosäuren bestehendes, hoch konserviertes Protein mit einer molekularen Masse von etwa 42 kDa. Unter physiologischen Bedingungen liegt Aktin als negativ geladenes Protein vor ($pI \sim 5,4$). Neben 4 Isoformen von α -Aktin, welche nur in Muskelzellen auftreten, existieren noch zwei weitere Isoformen, β - und γ -Aktin, die in Nichtmuskelzellen lokalisiert sind. Dabei handelt es sich bei den cytoplasmatischen Aktinen um evolutionär ältere

Formen, die auch in allen Zellen von niederen Eukaryoten, Invertebraten und in den Nichtmuskelzellen von Vertebraten vorliegen. Da monomeres Aktin zur Polymerisation neigt, ist es bis dato noch nicht gelungen, reines G-Aktin zu kristallisieren. Durch bestimmte Proteine oder Verbindungen, die an G-Aktin binden und eine Polymerisierung unmöglich machen, ist es gelungen, Aktinhybride zu kristallisieren und somit eine Strukturaufklärung zu ermöglichen. Ein bekanntes Beispiel einer Kokristallisation ist von Kabsch et al.⁵⁹ beschrieben. Hier konnte durch einen 1:1-Komplex von G-Aktin mit DNase I die Struktur mit einer Auflösung von 2,8 Å aufgeklärt werden. Eine Auflösung von 1,35 Å erzielten kürzlich Rizvi et al.⁶⁰, die G-Aktin mit Bistramid A, einem Naturprodukt aus *Lissoclinum bistratum*, kokristallisierten (PDB-Code: 2FXU). In Abb. 1.4 ist diese Struktur abgebildet. Dabei nimmt das Aktinmolekül eine Fläche von etwa 55 Å × 55 Å ein und besitzt eine Höhe von 35 Å. Man erkennt den typischen Aufbau von G-Aktin, bestehend aus zwei Domänen, die aus historischen Gründen große und kleine Domäne genannt werden, in deren Spalt ATP und ein Ca²⁺- oder Mg²⁺-Ion gebunden sind. Im Falle von Ca²⁺ erfolgt der Nukleotidaustausch relativ langsam, während in Gegenwart von Mg²⁺ das gebundene Nukleotid schneller dissoziiert. Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus befinden sich in der kleinen Domäne. Beide Proteindomänen werden nochmals in zwei Subdomänen unterteilt, wobei die kleine Domäne aus den Subdomänen I und II, die große Domäne aus den Subdomänen III und IV zusammengesetzt ist.

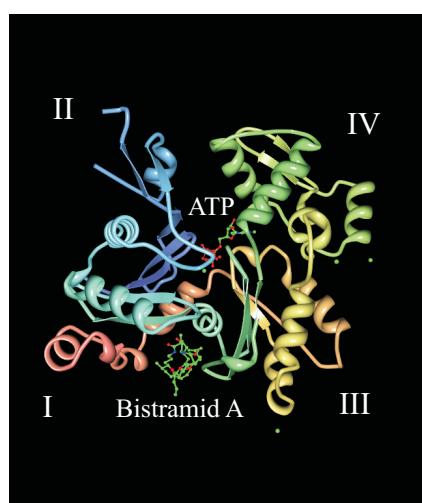


Abb. 1.4 Struktur von G-Aktin mit gebundenem ATP und Bistramid A. Das ATP befindet sich in einer Spalte, die von der kleinen Domäne (Subdomänen I und II) und der großen Domäne (Subdomänen III und IV) umschlossen wird. (PDB-Code: 2FXU, dargestellt durch ProteinWorkshop 1.50)⁶⁰

Durch eine Erhöhung der Salzkonzentration wird die Polymerisation von Aktin induziert, welche zur Bildung von filamentösem Aktin (F-Aktin) führt. Hierbei stellt die anfängliche Bildung von Aktindimeren bzw. -trimeren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Polymerisation dar. Dieser Vorgang wird unter physiologischen Bedingungen durch eine mikromolare Ca^{2+} -Konzentration inhibiert und durch Mg^{2+} beschleunigt. Im Zuge der Polymerisation hydrolysiert das vom Monomer gebundene ATP zu ADP⁶¹. Bis heute ist es noch nicht gelungen, F-Aktin zu kristallisieren. Allerdings konnte die Struktur von F-Aktin elektronenmikroskopisch dargestellt werden⁶². Hierbei stellt sich F-Aktin als zwei Helices dar, welche sich gegenseitig umwinden, sodass eine Kreuzung beider Helices nach 13 Monomeruntereinheiten erfolgt. Basierend auf diesen Ergebnissen und den kristallographischen Daten von G-Aktin, konnte ein Modell von F-Aktin konstruiert werden^{63; 64}. In Abb. 1.5 ist dieses Modell (A)) im Vergleich zu einer schematischen Darstellung (B)) abgebildet. Dabei beträgt der maximale Durchmesser des Filaments 90-95 Å.

Das Aktin der Zelle übt eine Reihe von Funktionen aus, von denen die Ausbildung des Aktinzytoskelettes die prominenteste und bei weitem wichtigste darstellt. Aufgrund der Fähigkeit von Aktin filamentöse Strukturen auf- und abzubauen, erfüllt es sowohl eine dynamische als auch strukturelle Rolle in der Zelle. In Kombination mit den anderen Komponenten des Zytoskeletts bestimmt Aktin die Zellgestalt und organisiert diverse zelluläre Prozesse wie etwa Endo- und Exocytose oder die Lokalisierung von Zellorganellen. Aber auch an Bewegungsvorgängen ist Aktin maßgeblich beteiligt. Zusammen mit Myosin ist Aktin für die Muskelkontraktion verantwortlich. Bei der durch Filopodien vermittelten Zellmigration oder bei amöboiden Bewegungen spielt Aktin ebenfalls eine zentrale Rolle⁵⁷.

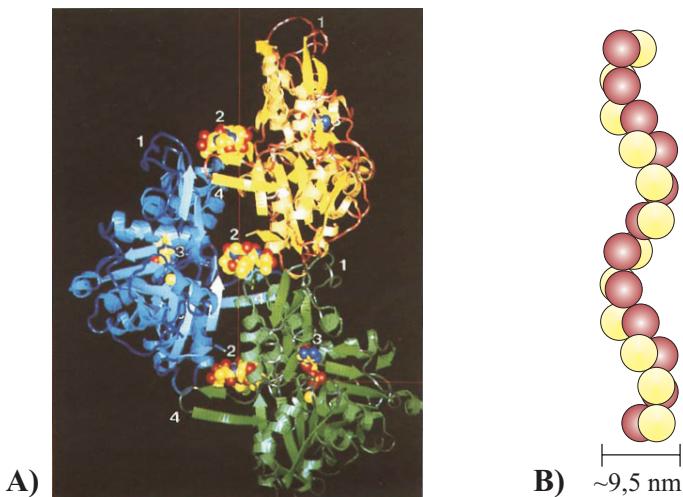


Abb. 1.5 A) F-Aktin-Modell, bestehend aus 3 Aktinmonomeren⁶³. 1: DNase-Bindungsstelle. 2: Phalloidin. 3: ADP. 4: Hydrophober Loop. **B)** Schema eines Aktinfilaments.

Ähnlich den Mikrotubuli besitzen Aktinfilamente ein Plus- und ein Minusende, an denen die Assoziation und Dissoziation mit unterschiedlichen Raten erfolgt. Die Dissoziationskonstante K_D für das Plusende, an welchem sowohl die Addition als auch der Abbau der Monomere schneller erfolgt, ist $0,12 \mu\text{M}$, für das Minusende $0,62 \mu\text{M}$ ⁵⁶. Ausgehend von den Polymerisationsbedingungen, welche *in vitro* beschrieben wurden^{61; 65}, müsste nahezu das gesamte Aktin der Zelle in Form von F-Aktin vorliegen, insbesondere wenn man sich vor Augen führt, dass die Aktinkonzentration in der Zelle einige hundert Mikromolar betragen kann. Dennoch liegt teilweise ein hoher Anteil an monomerem Aktin in der Zelle vor. Dies ist insbesondere bei pflanzlichen Zellen zu beobachten. Beispielsweise kommen in Mais etwa 5-10 % und in Tabak nur 1-2 % des Aktins als Filamente vor⁶⁶. Das bedeutet, dass monomeres Aktin Komplexe mit anderen Proteinen eingehen muss, die als eine Art zellulärer Puffer fungieren und so die Polymerisation reversibel inhibieren. Von diesen sog. Aktin-bindenden Proteinen, welche die Aktinpolymerisation regulieren, stellen Thymosin-β4 und Profilin die bekanntesten Vertreter dar. Thymosin-β4, ein 43 Aminosäuren umfassendes Peptid, liegt in relativ hohen Konzentrationen (20-550 μM) in der Zelle vor, bindet Aktinmonomere mit hoher Affinität ($K_D = 1,2\text{-}1,6 \mu\text{M}$) und verhindert so die Polymerisation von Aktin. Profilin, ein $\sim 15 \text{ kDa}$ Protein, bildet einen 1:1-Komplex mit Aktinmonomeren, inhibiert so die Polymerisationsrate und minimiert zusätzlich die ATPase Aktivität von Aktin. Durch Wechselwirkung mit Phosphatidylinositol-4-monophosphat oder PIP₂ kann der gebildete Aktin-Profilin-Komplex dissoziiert werden. Neben den genannten

Beispielen existieren eine Reihe weiterer sog. „capping“-Proteine, die sich selektiv an die Enden von Aktinfilamenten anlagern und so einen Einbau von Aktinmonomeren bzw. den Abbau der Filamente regulieren^{57; 61; 67}.

Zusätzlich zu der Vielzahl von Aktin-bindenden-Proteinen sind eine Reihe von Toxinen bekannt, die den Filamentauf- und abbau beeinflussen. Das Pilzalkaloid Cytochalasin bindet an das Plusende von Aktinfilamenten, inhibiert so die Addition von Aktinmonomeren und führt letztlich zur Depolymerisation des Aktinzytoskeletts. Ein entgegengesetztes Verhalten zeigt Phalloidin, das Gift des Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), welches selektiv und hoch affin an Aktinfilamente bindet, diese stabilisiert und dadurch den Abbau der Filamente unterbindet. Die Bindung von Phalloidin an Aktinfilamente erfolgt mit einer Stöchiometrie von 1:1-2 und führt zu einer drastischen Reduktion der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation an beiden Enden der Filamente. Bisher ist kein Aktin-bindendes Protein bekannt, das Aktinfilamente in einer ähnlichen Weise zu stabilisieren vermag^{68; 69}.

2 ZIELSETZUNG

Ezrin, ein Mitglied der Ezrin-Radixin-Moesin-Proteinfamilie (ERM), fungiert als ein Mediator zwischen der Plasmamembran und dem Aktinzytoskelett der Zelle. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt in der Quantifizierung der Ezrinadsorption an artifizielle, festkörperunterstützte Membransysteme. Da bekannt ist, dass Ezrin über seine N-terminale Domäne Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) bindet, soll die Interaktion von Ezrin und N-ERMAD (*N-terminal-ERM association domain*) mit PIP_2 untersucht werden. Dabei soll ein besonderes Augenmerk auf die Reversibilität des Prozesses und die laterale Organisation des Proteins auf der Oberfläche gelegt werden, um Erkenntnisse über die Dynamik der Ezrin-Membran-Wechselwirkung zu gewinnen.

Durch die intramolekulare Assoziiierung der N-terminalen und der C-terminalen Domäne von Ezrin ist die Bindungsstelle für Aktinfilamente maskiert, welche erst nach einer Aktivierung des Proteins exponiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit sollen zwei mögliche Wege untersucht werden, die zu einer Aktivierung von Ezrin führen. In einem ersten Ansatz ist es von Interesse, die Ca^{2+} -abhängige Interaktion von Ezrin mit S100P, einem Mitglied der S100-Proteinfamilie, zu untersuchen. Hierbei soll zuerst die Bindung der beiden Proteine charakterisiert werden, durch die eine mögliche Aktivierung von Ezrin resultiert.

Zusätzlich zu dieser Protein-Protein-Wechselwirkung soll in einem zweiten Ansatz untersucht werden, inwieweit eine Dissoziation von N-ERMAD und C-ERMAD (*C-terminal-ERM association domain*) durch die Bindung von Ezrin an PIP_2 hervorgerufen wird. Der Aktivierungszustand von Ezrin wird dabei über die Bindung von Aktinfilamenten kontrolliert. Ziel ist es, den Aktivierungsprozess von Ezrin besser zu verstehen, um weitere Erkenntnisse über die Funktion von Ezrin an der Membran-Zytoskelett-Grenzfläche zu erlangen.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Proteinisolierung

3.1.1 Genexpression in *E. coli* Bakterien

Ausgehend von einem Glycerolstock wurde ein Vereinzelungsausstrich der Bakterien auf LB-Agar-Platten durchgeführt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Um die Selektivität des Mediums zu gewährleisten, enthielten die Agar-Platten sowie die Medien 60 µg / mL Kanamycin für die 6 × His-fusionierten Konstrukte bzw. 50 µg / mL Ampicillin für die GST-fusionierten Konstrukte. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde eine Einzelkolonie gepickt und in 10 mL LB-Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert. 250 mL LB-Medium (Hauptkultur) wurden 1:50 mit der Vorkultur okultiert und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 herangezogen. Die Genexpression wurde durch Zusatz von 1 mM IPTG induziert. Die Bakteriensuspension wurde weitere drei bis vier Stunden bei 37 °C geschüttelt, danach zehn Minuten auf Eis gestellt und anschließend die Bakterien durch Zentrifugation (4 000 × g, 10 min, 4 °C) geerntet.

LB-Medium:	1 % (w / v) Trypton, 0,5 % (w / v) Hefeextrakt, 1 % (w / v) NaCl, 60 µg / mL Kanamycin (6 × His-fusionierte Konstrukte) bzw. 50 µg / mL Ampicillin (GST-fusionierte Konstrukte)
LB-Agar:	1 % (w / v) Trypton, 0,5 % (w / v) Hefeextrakt, 1 % (w / v) NaCl, 1,5 % (w / v) Agar, 60 µg / mL Kanamycin (6 × His-fusionierte Konstrukte) bzw. 50 µg / mL Ampicillin (GST-fusionierte Konstrukte)

Die Antibiotika wurden erst nach dem Autoklavieren (20 min, 121 °C) bei ca. 50 °C zugesetzt.

3.1.2 Aufreinigung der 6 × His fusionierten Proteine Ezrin und N-ERMAD aus *E. coli*

Rekombinantes Wild-Typ Ezrin und N-ERMAD (Aminosäuren 1-323) (Bakterienstamm BL21, Expressionsvektor pET 28a+), N-terminal fusioniert mit

6 × His, wurden aus *E. coli* nach einer Vorschrift von Koltzscher et al.²⁹ gereinigt. Das geerntete Bakterienpellet wurde in 25 mL Lysispuffer resuspendiert, im Eisbad sonifiziert (Branson Sonifier, Amplitude 50 %, Pulsiermodus 5, 4 × 30 Sekunden) und im Anschluss zentrifugiert (80 000 × g, 60 min, 4 °C). Der resultierende Überstand wurde auf eine mit Äquilibrierungspuffer behandelte Ni-NTA-Agarose-Säule (Bettvolumen 2,5 mL) aufgetragen. Nach Waschen des Säulenmaterials mit 30 mL Waschpuffer I und mit 10 mL Waschpuffer II wurden mit 10 mL Elutionspuffer jeweils 1 mL Protein-Faktionen eluiert und die aliquotierten Proteinlösungen bei 4 °C gelagert. Der Verlauf der affinitätschromatographischen Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und/oder Western Blot Analyse kontrolliert.

Lysispuffer: 40 mM HEPES, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM β-Mercaptoethanol, Roche® complete mini EDTA-free (1 Tablette / 10 mL), pH 7,4 (NaOH)

Äquilibrierungspuffer: 40 mM HEPES, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl, pH 7,4 (NaOH)

Waschpuffer I: 40 mM HEPES, 25 mM Imidazol, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,4 (NaOH)

Waschpuffer II: 40 mM HEPES, 35 mM Imidazol, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,4 (NaOH)

Elutionspuffer: 250 mM Imidazol/HCl, pH 7,4

3.1.3 Aufreinigung der GST fusionierten Proteine Ezrin T567D, Ezrin T567A und N-ERMAD aus *E. coli*

Rekombinantes Ezrin T567D, Ezrin T567A und N-ERMAD (Aminosäuren 1-323) (Bakterienstamm BL21, Expressionsvektor pGEX 4T1), N-terminal fusioniert mit Glutathion-S-Transferase (GST), wurden aus *E. coli* gereinigt. Das geerntete Bakterienpellet wurde in 25 mL Lysispuffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Nach dreimaliger Wiederholung des Vorgangs wurde das Bakterienlysat im Eisbad sonifiziert (Branson Sonifier, Amplitude 50 %, Pulsiermodus 5, 4 × 30 Sekunden) und im Anschluss zentrifugiert (80 000 × g,

60 min, 4 °C). Der resultierende Überstand wurde mit einer mit PBS äquilibrierten Glutathion-Sepharose Suspension (Bettvolumen 670 µL) 30 Minuten bei 4 °C geschüttelt. Der Ansatz wurde auf eine Säule appliziert (Länge: 30 cm, Ø 1,2 cm), die Matrix sedimentiert und anschließend mit 50 mL PBS gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit 5 mL Elutionspuffer in Fraktionen à 500 µL eluiert und die aliquotierten Proteinlösungen bei 4 °C gelagert. Der Verlauf der affinitätschromatographischen Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und/oder Western Blot Analyse kontrolliert.

Lysispuffer:	40 mM HEPES, 300 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, Roche® complete mini EDTA-free (1 Tablette / 10 mL), pH 7,2
PBS:	80 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM NaH ₂ PO ₄ , 100 mM NaCl, pH 7,5
Elutionspuffer:	100 mM Glutathion, 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0

3.1.4 Aufreinigung des 6 × His fusionierten Proteins S100P aus *E. coli*

Rekombinantes Wild-Typ S100P (Bakterienstamm BL21, Expressionsvektor pET 28a+), N-terminal fusioniert mit 6 × His, wurde aus *E. coli* nach einer Vorschrift von Koltzscher et al.²⁹ gereinigt. Das geerntete Bakterienpellet wurde in 12,5 mL Lysispuffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Nach dreimaliger Wiederholung des Vorgangs wurde das Bakterienlysat im Eisbad sonifiziert (Branson Sonifier, Amplitude 50 %, Pulsiermodus 5, 4 × 30 Sekunden) und im Anschluss zentrifugiert (100 000 × g, 60 min, 4 °C). Der resultierende Überstand wurde auf 5 mM CaCl₂ eingestellt und auf eine mit Waschpuffer äquilierte Phenyl-Sepharose Säule (Bettvolumen: 4 mL, Länge: 30 cm, Ø 1,2 cm) appliziert. Nach Waschen der Säulenmatrix mit 40 mL Waschpuffer wurde mit 10 mL Elutionspuffer I eluiert. Die erhaltene Proteinlösung wurde drei Stunden und im Anschluss über Nacht bei 4 °C gegen je 1 L Dialysepuffer dialysiert (MWCO 4-6 kDa). Das Dialysat wurde auf eine mit Dialysepuffer äquilierte Ni-NTA-Agarose Säule (Bettvolumen: 2,5 mL, Länge: 30 cm, Ø 1,2 cm) aufgetragen, mit 25 mL Dialysepuffer gewaschen und mit 10 mL Elutionspuffer II in Fraktionen à 1 mL eluiert. Die aliquotierten Proteinlösungen wurden bei 4 °C gelagert. Der

Verlauf der affinitätschromatographischen Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und/oder Western Blot Analyse kontrolliert.

Lysispuffer:	50 mM Tris/HCl, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 10 μ M Leupeptin, pH 7,5
Waschpuffer:	50 mM Tris/HCl, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 0,5 mM CaCl ₂ , 10 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 10 μ M Leupeptin, pH 7,5
Elutionspuffer I:	50 mM Tris/HCl, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 10 μ M Leupeptin, pH 7,5
Dialysepuffer:	20 mM Imidazol, 150 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, pH 7,5
Elutionspuffer II:	250 mM Imidazol, 150 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, pH 7,5

3.2 Präparative Methoden

3.2.1 Proteolytische Abspaltung des GST-*Tags*

Die proteolytische Abspaltung des GST-*Tags* von N-ERMAD erfolgte mit Thrombin. Dazu wurde die Proteinlösung zuerst drei Stunden, dann über Nacht gegen Dialysepuffer dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Dialysepuffer auf 3 µg / mL eingestellt. Pro mg Protein wurden 0,6 *units* Thrombin zugesetzt und drei Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach erfolgtem Thrombinverdau wurde eine weitere Proteolyse durch Zusatz von 1,5 mM PMSF gestoppt. Die Proteinlösung wurde zu einer, mit Dialysepuffer äquilibrierten Glutathion-Sepharose-Matrix pipettiert und 15 Minuten bei 4 °C geschüttelt. Zur Abtrennung der Matrix wurde die Lösung zentrifugiert (10 000 × g, 10 min, 4 °C) und der resultierende Überstand bei 4 °C gelagert. Der Verlauf der proteolytischen GST-Abspaltung wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert.

Dialysepuffer: 40 mM HEPES, 300 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,2

3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Biologische Moleküle wie Proteine und Nukleinsäuren lassen sich aufgrund ihrer Ladung elektrophoretisch auftrennen. Polyacrylamid-Gele entstehen durch Polymerisation von Acrylamid und Quervernetzung durch *N,N'*-Methylenbisacrylamid. Die radikalische Polymerisation wird durch Ammoniumperoxodisulfat (APS) initiiert, wobei *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator fungiert. Durch Zugabe des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) wird die globuläre Struktur des Proteins weitgehend denaturiert und erhält durch Anlagerung der SDS Moleküle eine negative Gesamtladung, welche der Masse des Proteins in etwa proportional ist. Die Disulfid-Brücken des Proteins werden durch Zugabe von Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol (DTT) reduziert.

Die Trenneigenschaften werden weiter verbessert durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Trennsystems, welches aus einem oberen Sammel- und einem unteren Trenngel besteht. Die eigentliche Trennung nach Größe erfolgt im

engporigen Trenngel, während die Probe im vergleichsweise schmalen, großporigen Sammelgel aufkonzentriert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, je nach Proteingröße, 12,5 %ige und 17 %ige Polyacrylamid-Gele (10 cm × 10 cm) nach Laemmeli⁷⁰ verwendet, welche mit einer 30 %igen (v / v) Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1 (w / v)) polymerisiert wurden. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 15 mA durchgeführt, welche auf 20 mA erhöht wurde, nachdem die Proben in das Trenngel eingewandert waren. Nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt und im Anschluss der Hintergrund wieder entfärbt. Zur Konservierung der Polyacrylamid-Gele wurden diese für 30 Minuten mit einer Trocknungslösung inkubiert, anschließend zwischen zwei Cellophan-Papiere gelegt, in einen Trocknungsrahmen eingespannt und zwei Tage bei Raumtemperatur getrocknet.

Sammelgel (5 %):	1,4 mL H ₂ O, 0,25 mL 1 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,33 mL Acrylamid-Bisacrylamid (30 %), 20 µL 10 % (w / v) SDS, 20 µL 10 % (w / v) APS, 2 µL TEMED
Trenngel (12,5 %):	1,6 mL H ₂ O, 1,3 mL 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 2,1 mL Acrylamid-Bisacrylamid (30 %), 50 µL 10 % (w / v) SDS, 50 µL 10 % (w / v) APS, 2 µL TEMED
Trenngel (17 %):	0,81 mL H ₂ O, 1,3 mL 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 2,89 mL Acrylamid-Bisacrylamid (30 %), 50 µL 10 % (w / v) SDS, 50 µL 10 % (w / v) APS, 2 µL TEMED
Laufpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w / v) SDS
Probenpuffer (6×):	175 mM Tris/HCl (pH 6,8), 5 % (w / v) SDS, 15 % (v / v) Glycerin, 0,06 g / L Bromphenolblau, 0,3 M DTT
Färbelösung:	0,5 % (w / v) Coomassie Brilliant Blue R250, 45 % (v / v) Methanol, 18,5 % (v / v) Eisessig
Entfärbelösung:	5 % (v / v) Methanol, 7,5 % (v / v) Eisessig
Trocknungslösung:	20 % (v / v) Ethanol, 10 % (v / v) Glycerin

3.2.3 Western Blot Analyse

Die Western Blot Technik ist eine sensitive Methode zur Detektion von Proteinen, bei welcher man sich die spezifische Bindung von Antikörpern an das zu untersuchende Protein zu Nutze macht.

Analog zu Abschnitt 3.2.2 wurden die zu untersuchenden Proteinproben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Statt einer Anfärbung nach der elektrophoretischen Auf trennung wurde das Gel 30 Minuten in Blotpuffer inkubiert. Anschließend wurden die Proteine nach dem *semi-dry* Verfahren in einem elektrischen Feld bei 15 V 20 Minuten auf eine ebenfalls in Blotpuffer äquilibrierte Nitrozellulose-Membran transferiert. Die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran wurde durch eine Färbung der Proteinbanden mit einer Ponceau-S-Lösung kontrolliert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurde die Membran entweder eine Stunde bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4 °C in 5 %iger Magermilchlösung inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran kurz mit TBS-T gewaschen, 30 Minuten in TBS-T geschüttelt und im Folgenden eine Stunde mit dem ersten Antikörper (Verdünnung 1 : 10 000 bis 1 : 20 000 in Magermilchlösung) inkubiert. Die Membran wurde dreimal je 15 Minuten in TBS-T gewaschen und danach mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (Verdünnung 1 : 5 000 in Magermilchlösung) eine Stunde geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T (je 20 min) wurden die markierten Proteine mittels der *enhanced chemiluminescence* (ECL™) Reaktion detektiert. Dazu wurde die Membran für eine Minute mit einer Lumineszenz-Lösung (ECL™ Advance Lösung A und ECL™ Advance Lösung B, 1 : 1, Amersham) inkubiert. Mittels Photopapier wurden die lumineszierenden Banden in definierten Belichtungszeiten detektiert. Im Anschluss wurde der Film entwickelt und fixiert.

Blotpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v / v) Methanol, pH 8,3

Ponceau-S-Lösung: 0,1 % (w / v) Ponceau S, 5 % (v / v) Eisessig

TBS-T: 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % (v / v) Tween™ 20,
pH 7,6

Magermilchlösung: 5 % (w / v) Magermilch in TBS-T

Primäre Antikörper: Hexa-His Antikörper, Maus (Geschenk Prof. Gerke, Münster)
Penta-His Antikörper, Maus (Qiagen)

Sekundäre Antikörper: Peroxidase-gekoppelter anti-Maus Antikörper (Geschenk Prof. Gerke, Münster)

3.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

3.2.4.1 UV-VIS-Spektroskopie

Die Konzentration von N-ERMAD und Ezrin wurde neben dem unter 3.2.4.2 beschriebenen Bradford-Test auch mittels UV-VIS-Spektroskopie bestimmt. Man macht sich hierbei die Absorption von aromatischen Aminosäuren in Proteinen bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$ zu Nutze. Als Grundlage dient das Lambert-Beersche-Gesetz:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d , \quad \text{Gleichung 1}$$

wobei E die Extinktion, ε der Extinktionskoeffizient, c die Proteinkonzentration und d die Schichtdicke der Küvette ist.

Tab. 3.1: Für die UV-Spektroskopie verwendete Extinktionskoeffizienten ε und Molekularmassen M .

Protein	$\varepsilon / \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$M / \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$
N-ERMAD	52 400 ⁷¹	38 200
Ezrin	66 900 ⁷¹	69 400

3.2.4.2 Bradford-Test

Die Konzentrationsbestimmung der in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurde nach Bradford⁷² durchgeführt. Das Prinzip des Tests beruht auf der Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie Brillant Blue G-250 und der damit einhergehenden Verschiebung des Absorptionsmaximums von $\lambda = 465 \text{ nm}$ zu $\lambda = 595 \text{ nm}$. Als Referenzsubstanz für die Erstellung der Eichgeraden wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Ausgehend von einer BSA-Stammlösung ($c = 10 \text{ mg / mL}$) wurde eine Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich 0,1 bis 0,8 mg / mL erstellt. Für die Konzentrationsbestimmung wurden je 1 mL Bradford-Reagenz vorgelegt, mit 20 µL der BSA-Lösungen bzw. der zu untersuchenden

Proteinlösungen versetzt, durchmischt, 5 Minuten inkubiert und im Anschluss die Extinktion bei $\lambda = 595$ nm bestimmt. Mit Hilfe der Eichgerade konnte dann die Konzentration der Proteinproben ermittelt werden.

Bradford-Lösung: 0,5 mg / mL Coomassie Brilliant Blue G-250
 25 % (v / v) Ethanol

 50 % (v / v) Phosphorsäure (85 %)

Bradford-Reagenz: 20 % (v / v) Bradford-Lösung

3.2.5 Polymerisierung von Aktin

Zur Untersuchung der Ezrin-Aktin Interaktion wurde ausschließlich nicht-muskuläres, aus menschlichen Thrombozyten gewonnenes Aktin (Cytoskeleton, Denver, USA) verwendet, welches eine Isoformverteilung von 85 % β -Aktin zu 15 % γ -Aktin aufweist. Das als Monomer vorliegende Aktin wurde zu einer Konzentration von 10 mg / mL gelöst (5 mM Tris/HCl, 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM ATP, 5 % Saccharose, 1 % Dextran, pH 8,0), aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Für die Experimente, in denen monomeres, globuläres Aktin (G-Aktin) benötigt wurde, wurde die G-Aktin-Lösung mit G-Puffer (5 mM Tris/HCl, 0,2 mM CaCl₂, pH 8,0) auf die entsprechende Konzentration eingestellt. Die Polymerisierung von G-Aktin zu polymerem, filamentösem Aktin (F-Aktin) wurde durch die Zugabe von F-Puffer (20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM ATP, pH 7,4) initiiert. Zur Stabilisierung bzw. Visualisierung der Filamente wurde zusätzlich 0,60 μ M Phalloidin (QCM- und Ellipsometrie-Messungen) bzw. 0,05 μ M fluoreszenzmarkiertes Alexa Fluor® 488 Phalloidin (Fluoreszenzmikroskopie) zugesetzt. Die Polymerisierung vollzog sich entweder über Nacht bei 4 °C, oder zwei Stunden bei Raumtemperatur.

3.2.6 Herstellung multilamellarer und unilamellarer Vesikel

Zur Herstellung der Lipidfilme wurden die entsprechenden Mengen der Lipide separat eingewogen und in Chloroform gelöst, sodass die Konzentration der Lösungen 10 mg / mL bei POPC, DOPC und Ni-NTA-DOGS betrug. PIP₂ wurde in

einem Lösungsmittelgemisch von Chloroform : Methanol : Wasser = 8 : 2 : 1 in einer Konzentration von 1 mg / mL verwendet. Die jeweiligen Lipidlösungen wurden anschließend im gewünschten Molverhältnis vereinigt. Das Lösungsmittel wurde im Wasserbad bei 40 °C in einem Stickstoffstrom verdampft, bis sich ein dünner Lipidfilm am Boden des Reagenzglases gebildet hatte. Zur Entfernung verbliebener Lösungsmittelreste wurden die resultierenden Lipidfilme im Vakuum bei 40 °C drei Stunden getrocknet, mit Parafilm verschlossen und zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Ausgehend von den Lipidfilmen wurden multilamellare Vesikel (MLV) für die Vesikelbindungsstudien, sowie unilamellare Vesikel (LUV, *large unilamellar vesicle*) für die Präparation festkörperunterstützter Membranen hergestellt. Dazu wurde der verwendete Lipidfilm oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur des höchstschmelzenden Lipids in einem entsprechenden Puffer 30 Minuten gequollen. Um MLV zu erhalten, wurde im Anschluss der hydratisierte Lipidfilm eine halbe Minute lang geschüttelt und fünf Minuten stehen gelassen. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Die Konzentration der Vesikelsuspension lag, je nach Experiment, zwischen 0,5 mg / mL und 2 mg / mL. Zur Überführung in LUV mit einem mittleren Porendurchmesser von 100 nm wurden die MLV im Folgenden mit Hilfe eines Miniextruders (LiposoFast™, Avestin, Ottawa, Canada) 31 Mal durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 100 nm gedrückt.

3.2.7 Vesikelbindungsstudien

Zur Untersuchung von Protein-Lipid-Wechselwirkungen wurden Vesikelbindungstests durchgeführt. Bei allen Vesikelbindungsstudien wurde mit einem Gesamtvolumen von 200 µL gearbeitet (20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4), wobei die Konzentration der Vesikellösung 0,5 mg / mL, die der Proteinlösung 0,1 mg / mL betrug. Zunächst wurden MLV-Lösungen verschiedener Lipidkompositionen mit dem jeweils zu untersuchenden Protein 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde zentrifugiert (15 000 × g, 20 min, 4 °C), eine Probe für die SDS-PAGE entnommen und der Rest des Überstandes verworfen. Um unspezifisch an die Vesikel gebundenes Protein zu entfernen, wurde das Pellet in 200 µL Puffer resuspendiert und nochmals

zentrifugiert ($15\,000 \times g$, 20 min, 4 °C). Für die nachfolgende SDS-PAGE-Analyse wurde sowohl vom Überstand, als auch vom Pellet eine Probe entnommen.

Für die Untersuchung der Ezrin-S100P Interaktion wurde der Vesikelbindungstest in ähnlicher Weise wie oben beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass nach dem ersten Waschvorgang ein Wechsel zu einem Ca^{2+} -haltigen Puffer (20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 50 µM CaCl_2 , 1 mM NaN_3 , pH 7,4) stattfand und anschließend die Inkubation mit S100P erfolgte.

3.2.8 Präparation festkörperunterstützter, artifizieller Membransysteme

3.2.8.1 Vorbereitung der Schwingquarze

Beschichtung der Quarzscheiben mit Goldelektroden

Hochpolierte 5 MHz AT-cut Quarzscheiben mit einem Durchmesser von 14 mm und einer Dicke von 0,33 mm wurden zunächst in einer 0,5 %igen (v / v) Mucasol-Lösung im Ultraschallbad gereinigt (15 min, 90 °C). Im Anschluss wurden die Quarze intensiv mit Reinstwasser gespült, zur vollständigen Entfernung von Mucasolresten noch zweimal in Reinstwasser im Ultraschallbad (15 min, 90 °C) beschallt und im Stickstoffstrom getrocknet. Im Folgenden wurden die Quarze für fünf Minuten im Argonplasma gereinigt. Die Bedampfung der Quarze mit den Elektroden erfolgte in einer Aufdampfanlage vom Typ BAE 250 der Firma Balzers. Dazu wurde nach Anlegen eines Hochvakuums von 10^{-8} bis 10^{-9} bar durch thermische Verdampfung erst 20 nm Chrom als Haftvermittler und dann 100 nm Gold auf 18, in eine rotierende Schablone eingespannte Quarze gedampft. Die bedampfte Elektrodenfläche betrug $0,26\text{ cm}^2$. Die Schichtdicke der Elektroden wurde durch einen, in die Apparatur eingebauten Schwingquarz gemessen. Anschließend erfolgte die Wiederholung des Aufdampfvorgangs für die Rückseite der Quarze.

Reinigung der Quarze

Die Reinigung der gebrauchten Quarze erfolgte mit einer etwa 70 °C heißen Piranha-Lösung (konz. Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid (30 %) im Verhältnis 3 : 1 (v / v)), wobei die Inkubationszeit zwei Minuten betrug. Im Anschluss wurden die Quarze mit Reinstwasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Somit konnten die Quarze bis zu dreimal regeneriert werden.

Ablösung der Chrom- und Goldelektroden

Die Ablösung der Goldschicht erfolgte in einer 0,25 M I₂ / 0,5 M KI-Lösung. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten war das Gold vollständig entfernt und die Quarze wurden in Reinstwasser gespült. Zur Entfernung der Chromschicht wurde eine basische, NaOH-gesättigte Kaliumhexacyanoferrat(III) (K₃[Fe(CN)₆]) – Lösung verwendet. Nachdem das Chrom zehn Minuten lang dieser Lösung ausgesetzt war, wurden die Quarze in Reinstwasser gewaschen und konnten so wieder mit Chrom und Gold bedampft werden.

3.2.8.2 Präparation von Doppelschichten auf Goldelektroden

Bei einem beidseitig mit Chrom und Gold bedampften 5-MHz-Schwingquarz wurde die zu beschichtende Elektrode durch Silberleitkleber mit ihrem Kontaktstück auf der Unterseite leitend verbunden. Nachdem der Quarz fünf Minuten im Argonplasma gereinigt worden war, wurde dieser unverzüglich in die Messkammer eingebaut und sofort mit 200 µL einer 2 mM ethanolischen Oktanthiol-Lösung überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 60-90 Minuten wurde die Oktanthiol-Lösung vollständig abgezogen und die Messkammer fünfmal mit Ethanol und anschließend fünfmal mit Puffer-Lösung gespült. Zur Kontrolle der chemisorbierten Oktanthiol-Schicht wurde ein Impedanzspektrum aufgenommen. Lagen die ermittelten Kapazitätswerte zwischen 1,8 - 2,3 µF·cm⁻² wurde mit der Präparation fortgefahrene. Nach Entfernung der Puffer-Lösung wurden 200 µL frisch präparierte unilamellare Vesikel auf die Quarzoberfläche appliziert, sodass eine Lipidkonzentration von 0,5 mg·ml⁻¹ resultierte. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurde wiederum ein Impedanzspektrum aufgezeichnet, um die Vollständigkeit des Membranaufbaus zu prüfen. Lagen die Kapazitätswerte zwischen 0,8 - 1,3 µF·cm⁻² wurde die Kammer zur Entfernung überschüssiger Lipidvesikel zehnmal mit Puffer-Lösung gespült. Um eine Zerstörung der Membran zu verhindern, musste immer darauf geachtet werden, dass eine dünne Flüssigkeitsschicht über dieser vorhanden war.

3.2.8.3 Präparation von Doppelschichten auf Siliziumträgern

Polierte, 0,7 mm dicke Siliziumträger wurden zuerst in $1,8 \times 1,2$ cm große Stücke geschnitten, wobei für die Fluoreszenzmessungen ausschließlich Siliziumträger mit einer 100 nm dicken SiO_2 -Schicht verwendet wurden, um der Fluoreszenzlösung von elementarem Silizium entgegenzuwirken. Die einzelnen Träger wurden mit Isopropanol und Reinstwasser gespült und im Anschluss für 15 Minuten in einer $70\text{ }^\circ\text{C}$ heißen ammoniakalischen Wasserstoffperoxidlösung (14 % (v / v) NH_4OH (25 %), 14 % (v / v) H_2O_2 (30 %)) inkubiert, um eine hydrophile SiO_2 -Oberfläche zu erzeugen. Danach wurden die so erzeugten SiO_2 -beschichteten Siliziumplättchen mit Reinstwasser gespült und unter Reinstwasser bis zu einer Woche gelagert. Bevor die Membranpräparation erfolgte, wurden die Siliziumträger im Stickstoffstrom getrocknet und zur Reinigung und weiteren Erhöhung der Hydrophilität zuerst drei Minuten im Argonplasma, dann zwei Minuten im Sauerstoffplasma behandelt. Für die Ellipsometriemessungen wurde das Siliziumplättchen senkrecht in eine Teflonmesszelle eingebaut, die LUV-Lösung in einer Konzentration von 0,35 mg / mL appliziert und der Spreitvorgang mittels des Ellipsometers verfolgt. Für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen wurde das Siliziumplättchen waagerecht in einen Teflontrog eingebaut und die LUV-Lösung in einer Konzentration von 0,5 mg / mL appliziert. Um den Spreitvorgang der Vesikel zu initiieren, wurde bei beiden Präparationen der jeweiligen Pufferlösung 1 mM CaCl_2 zugesetzt. Nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde wurde zur Entfernung überschüssiger Lipidvesikel intensiv mit Pufferlösung gespült.

3.3 Biophysikalische Methoden

3.3.1 Impedanzspektroskopie

3.3.1.1 Theoretische Grundlagen

Bei der Impedanzspektroskopie handelt es sich um ein elektrochemisches Messverfahren, bei dem innerhalb eines bestimmten, variierbaren Frequenzbereichs eine sinusförmige Wechselspannung kleiner Amplitude an das zu untersuchende System angelegt und die resultierende Stromantwort gemessen wird. Durch die Ermittlung des frequenzabhängigen Wechselstromwiderstands, welcher auch als Impedanz bezeichnet wird, können Informationen über die elektrischen Eigenschaften der Probe gewonnen werden^{73; 74}.

Um ein Impedanzspektrum sinnvoll interpretieren zu können, ist es oft zweckmäßig, ein Ersatzschaltbild, welches aus klassischen Bauteilen der Elektronik (ohmscher Widerstand, Kondensator, Induktivität) besteht, theoretisch zu konstruieren. Das Ersatzschaltbild sollte dieselbe frequenzabhängige Impedanz zeigen wie das reale System. Dabei wirken sich ohmsche Widerstände nur auf die Amplitude der Stromantwort aus, dessen Impedanz frequenzunabhängig ist, also folglich auch keine Phasenverschiebung zwischen Strom und Spannung aufweist. Bei kapazitiven und induktiven Elementen tritt sowohl eine Frequenzabhängigkeit als auch eine Phasenverschiebung auf.

Spannung, Strom und Impedanz können als komplexe Größen dargestellt werden. Dabei gilt für die angelegte Wechselspannung:

$$U(t, \omega) = U_0 e^{i\omega t}$$

Gleichung 2

$U(t, \omega)$: Momentanwert der Spannung

U_0 : Spannungsamplitude

ω : Kreisfrequenz $2\pi f$

t : Zeit

i : $\sqrt{-1}$

und für den resultierenden Strom:

$$I(t, \omega) = I_0(\omega) e^{i(\omega t - \varphi(\omega))}.$$

Gleichung 3

$I(t, \omega)$: Momentanwert des Stroms

$I_0(\omega)$: Stromamplitude

$\varphi(\omega)$: Phasenverschiebung zwischen Spannung $U(t)$ und Strom $I(t)$

Nach dem Ohmschen Gesetz definiert sich die Impedanz als Quotient aus Spannung und Stromstärke:

$$Z(\omega) = \frac{U(t, \omega)}{I(t, \omega)} = \frac{U_0}{I_0(\omega)} e^{i\varphi(\omega)} = |Z|(\omega) e^{i\varphi(\omega)}.$$

Gleichung 4

Die komplexe Impedanz $Z(\omega)$ kann in einen Realteil Z^{re} (Wirkwiderstand) und einen Imaginärteil Z^{im} (Blindwiderstand) aufgeteilt werden:

$$Z(\omega) = Z^{\text{re}}(\omega) + iZ^{\text{im}}(\omega).$$

Gleichung 5

Dabei ist der Betrag der Impedanz:

$$|Z| = \sqrt{(Z^{\text{re}})^2 + (Z^{\text{im}})^2}$$

Gleichung 6

und die Phasenverschiebung:

$$\varphi = \arctan\left(\frac{Z^{\text{im}}}{Z^{\text{re}}}\right).$$

Gleichung 7

Tabelle 3.2 gibt Aufschluss über das Impedanz- und Phasenverhalten verschiedener Bauelemente, die in den Ersatzschaltbildern Verwendung finden.

Tab. 3.2: Impedanz und Phasenverschiebung einiger idealer elektrischer Bauelemente.

Impedanzelement	Impedanz	Phasenverschiebung
Ohmscher Widerstand R	R	0
Kondensator C	$(i\omega C)^{-1}$	$-\pi/2$
Induktivität L	$i\omega L$	$+\pi/2$

Gemäß der Kirchhoffschen Gesetze kann die Gesamtimpedanz eines Systems berechnet werden. Demnach summieren sich in einer Serienschaltung die Einzelimpedanzen, während sich in einer Parallelschaltung die reziproken Impedanzen (Admittanzen) addieren.

Um die Impedanz graphisch übersichtlich darzustellen, wurde in dieser Arbeit ausschließlich das Bodediagramm verwendet, in welchem der Betrag der Impedanz $|Z|$ und der Phasenwinkel φ in Abhängigkeit der Frequenz dargestellt werden.

3.3.1.2 Elektrisches Modell einer festkörperunterstützten Membran

Eine Lipiddoppelschicht wird durch eine Membrankapazität C_m und einen dazu parallel geschalteten Membranwiderstand R_m elektrisch beschrieben (Abb. 3.1). Die Kapazität einer Membran kann in Analogie zu einem Plattenkondensator wie folgt dargestellt werden:

$$C_m = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{d} \quad \text{Gleichung 8}$$

- A : Fläche der Membran
- d : Dicke der Membran
- ϵ_0 : elektrische Feldkonstante
- ϵ_r : Dielektrizitätskonstante

Dabei enthält die Dielektrizitätskonstante die Kapazitäten der Lipidkopfgruppen sowie die der Fettsäureketten. Zur vollständigen Beschreibung der auf einer Goldelektrode fixierten Membran müssen jedoch noch weitere Bauelemente in das Ersatzschaltbild einfließen. Neben dem Widerstand R_m und der Kapazität C_m , welche die Membran beschreiben, muss zudem der Elektrolytwiderstand R_{el} und die Kapazität C_{el} , die sich aus der elektrochemischen Doppelschicht an der Grenzfläche ergibt, berücksichtigt werden [Abb. 3.1 B)]. Allerdings lassen sich, aufgrund der

hohen spezifischen Membranwiderstände von mehr als $1 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$, die beiden Kapazitäten C_{el} und C_m im verwendeten Frequenzbereich von 10^{-1} bis 10^6 Hz nicht mehr unterscheiden, wodurch das Ersatzschaltbild zu einer Serienschaltung aus einer Kapazität $C_{\text{el+m}}$ und dem Widerstand R_{el} vereinfacht werden kann [Abb. 3.1 C)].

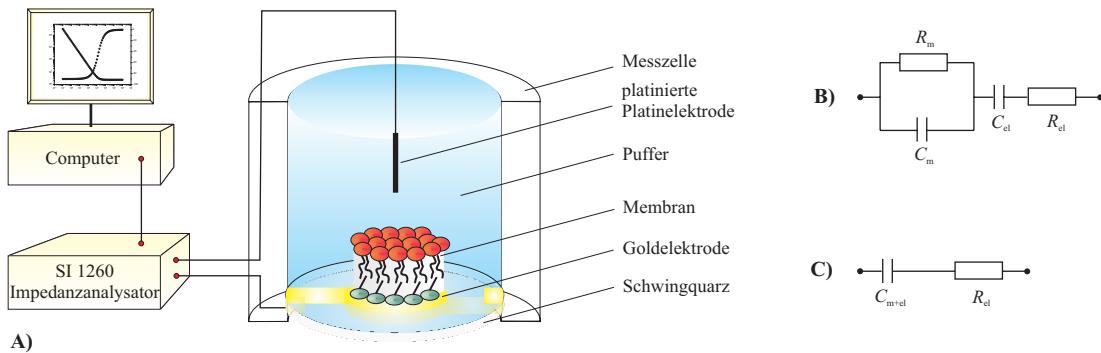


Abb. 3.1 A) Schematischer Messaufbau des Impedanzspektrometers. Die der Pufferlösung exponierte Goldelektrode des Schwingquarzes dient als Arbeitselektrode, während ein in die Pufferlösung tauchender platinierter Platindraht als Gegenelektrode fungiert. **B)** Elektrisches Ersatzschaltbild zur Repräsentation einer festkörperunterstützten Membran, wobei C_m und R_m die Kapazität und den Widerstand der Membran, C_{el} die elektrochemische Doppelschicht an der Grenzfläche und R_{el} den Elektrolytwiderstand symbolisieren. **C)** Vereinfachtes elektrisches Ersatzschaltbild zur Beschreibung einer festkörperunterstützten Membran. Aufgrund der hohen Membranwiderstände im verwendeten Frequenzbereich sind C_{el} und C_m nicht unterscheidbar und als $C_{\text{el+m}}$ zusammengefasst. R_{el} symbolisiert den Elektrolytwiderstand.

3.3.1.3 Messaufbau und Messbedingungen

Sämtliche Untersuchungen an festkörperunterstützten Mono- und Doppelschichten wurden mit dem Impedanzspektrometer SI 1260 der Firma Solartron (Berkshire, UK) im *continuous-wave*-Modus mit einer maximalen Spannungsamplitude von 30 mV in einem Frequenzbereich von 10^{-1} bis 10^6 Hz durchgeführt. Die Goldelektrode wurde als Arbeitselektrode und ein platinierter Platindraht als Gegenelektrode verwendet [Abb. 3.1 A)]. Das Impedanzspektrum besteht aus 71, in äquidistanten Abständen auf einer logarithmischen Skala, aufgenommenen Messpunkten. Die Kapazität $C_{\text{el+m}}$ und der Widerstand R_{el} wurden mit Hilfe einer nicht-linearen Kurvenanpassung nach Gleichung 9 bestimmt:

$$|Z| = \sqrt{R_{\text{el}}^2 + \left(\frac{1}{\omega C_{\text{el+m}}} \right)^2} \quad \text{Gleichung 9}$$

3.3.2 Quarzmikrowaage

3.3.2.1 Quarz als piezoelektrischer Resonator

Die Quarzmikrowaagentechnik erlaubt eine sensitive und sondenfreie Untersuchung von Adsorptionsprozessen. Die 1959 von Günter Sauerbrey⁷⁵ entdeckte Linearität zwischen Resonanzfrequenzänderung und Massenabscheidung ermöglichte den Einsatz von Schwingquarzen für die Bestimmung dünner Schichtdicken im Vakuum bzw. an Luft. Der Einsatz von Schwingquarzen für die Untersuchung biophysikalischer Phänomene blieb jedoch aufgrund der im wässrigen Milieu auftretenden starken Dämpfung der Quarzschwingung verwehrt. Erst in den 80er Jahren standen sowohl leistungsfähige Oszillatorschaltkreise, als auch theoretische Modelle zur Beschreibung der Quarzschwingung unter Flüssigkeiten zur Verfügung, welche der Quarzmikrowaage den Weg als Bio- bzw. Chemosensor ebneten^{76; 77}.

Das Messprinzip der Quarzmikrowaage (QCM, *quartz crystal microbalance*) beruht auf der Verwendung von Schwingquarzen, bei denen man sich den inversen piezoelektrischen Effekt zu Nutze macht. Eine Voraussetzung für das Auftreten von Piezoelektrizität ist das Fehlen eines Punktsymmetriezentrums im Kristallgitter, wie z.B. im Quarz. Der inverse piezoelektrische Effekt besteht darin, dass durch Anlegen eines elektrischen Feldes an die Kristalloberflächen eine spezifische Deformation des Kristalls hervorgerufen wird.

Je nach gewählter Schnittebene bezüglich der Kristallachsen im Quarzkristall [Abb. 3.2 A)] ergeben sich verschiedene Schwingungsformen und Frequenzbereiche [Abb. 3.2 B)]. Um die Temperaturabhängigkeit der Resonanzfrequenz zu minimieren und um Überlagerungen anderer Wellen zu unterbinden, werden in der QCM vor allem AT-cut-Quarze verwendet, die in einem Winkel von $35^\circ 10'$ zur kristallographischen z-Achse aus dem Quarzkristall geschnitten wurden. Die in dieser Arbeit eingesetzten *Thickness-shear-mode* (TSM)- bzw. *Bulk-acoustic-wave* (BAW)-Resonatoren [Abb. 3.2 C)] zeichnen sich dadurch aus, dass sie durch Anlegen eines elektrischen Feldes zu einer resonanten Dickenscherschwingung angeregt werden können [Abb. 3.2 D)]. Die dabei zwischen den beiden überlappenden Elektroden auftretende, stehende Welle ergibt sich aus der Überlagerung einer halben Welle mit ihrer Reflektion. Dabei erfolgt die Teilchenauslenkung parallel zur Quarzoberfläche, während sich die resultierende Transversalwelle entlang der z-Richtung ausbreitet. Die Dickenscherschwingung besitzt bei $z = 0$ eine Knotenebene und an den beiden

Oberflächen bei $z = \pm d_q / 2$ einen Schwingungsbauch. Damit entspricht die Dicke des Quarzes d_q exakt einer halben Wellenlänge der Schwingung. Unter Berücksichtigung dieser konstruktiven Interferenz ($d_q = n\lambda / 2$) und unter der Annahme, dass die laterale Ausdehnung der Quarzscheibe sehr viel größer als die Dicke des Quarzes ist ($r \gg d_q$), lässt sich die Eigenfrequenz f_0 der Dickenscherschwingung wie folgt definieren:

$$f_0 = \frac{nK_R}{d_q}.$$

Gleichung 10

Dabei steht n für die ungerade Obertonordnung und K_R symbolisiert die Frequenzkonstante des Quarzes. Eine Erhöhung der Resonanzfrequenz erhält man demnach durch eine Reduzierung der Dicke des Quarzplättchens oder über eine Anregung zu Oberschwingungen⁷⁸⁻⁸⁰.

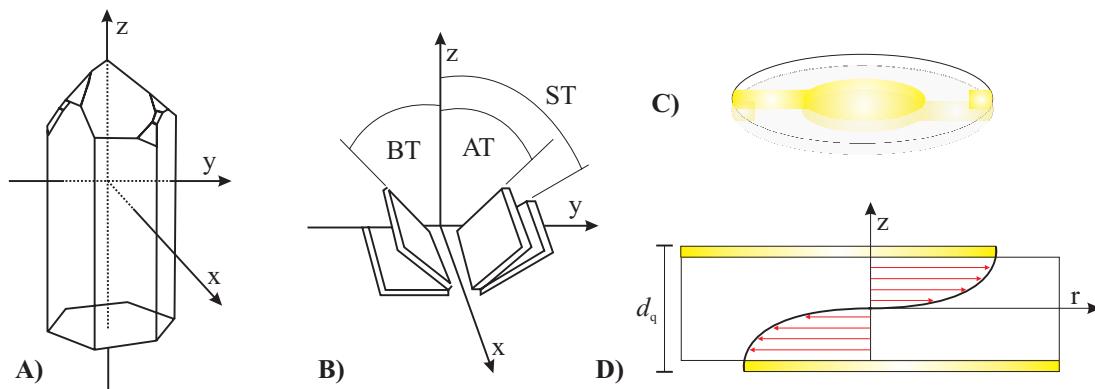


Abb. 3.2 **A)** Schematische Darstellung eines Quarzes mit den kristallographischen Achsen. **B)** Verschiedene Schnittebenen im Quarz: Im Rahmen dieser Arbeit wurden AT-cut Quarze verwendet, die in einem Winkel von $35^\circ 10'$ zur kristallographischen z-Achse aus dem α -Quarz geschnitten wurden. **C)** Beidseitig mit Goldelektroden bedampfter AT-cut Quarz. Um beide Elektroden von der gleichen Seite zu kontaktieren, kann die Elektrode über den Quarzrand mittels Silberleitkleber mit einem kleinen Elektrodengegenstück leitend verbunden werden. **D)** Grundschwingung eines Dickenscherschwingers. Die Teilchenauslenkung (rote Pfeile) erfolgt parallel zur Oberfläche, die Wellenfortpflanzung senkrecht dazu.

3.3.2.2 Beladung des Quarzes mit Fremdmasse

Ein linearer Zusammenhang zwischen der Frequenzänderung Δf und der Massenänderung Δm , wie man ihn sich in der QCM zu Nutze macht, wurde erstmals 1959 von Sauerbrey⁷⁵ aufgestellt:

$$\Delta f = -f_0 \frac{\Delta d}{d_q} = -\frac{2f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\mu_q \rho_q}} = -S_f \Delta m . \quad \text{Gleichung 11}$$

- A : Elektrodenfläche
 μ_q : Schermodul des Quarzes
 ρ_q : Dichte des Quarzes

Allerdings besitzt die Beziehung nur Gültigkeit, wenn davon ausgegangen werden kann, dass es sich um eine starre Fremdmasse handelt, die nicht mehr als ca. 0,5 % der ursprünglichen Quarzmasse beträgt, sich gleichmäßig auf der Quarzoberfläche verteilt und nahezu dieselbe Dichte wie der Quarz besitzt. Zudem gilt der lineare Zusammenhang zwischen Frequenzänderung und Massenbeladung nur an Luft bzw. in Vakuum. Aus Gleichung 11 geht ebenfalls hervor, dass die integrale Schichtwägeempfindlichkeit oder Sauerbreykonstante S_f quadratisch von der Resonanzfrequenz abhängt. Eine Erhöhung der Schichtwägeempfindlichkeit ließe sich demnach durch den Einsatz dünnerer Quarze erreichen. Aufgrund der mechanischen Stabilität werden jedoch meist Quarze in einem Frequenzbereich von 5–15 MHz eingesetzt. Eine ortsaufgelöste Betrachtung der Schichtwägeempfindlichkeit eines Quarzes führt zu der Erkenntnis, dass diese in der Mitte des Quarzes am größten ist und zu den Elektrodenrändern hin absinkt. Die radiale Verteilung der Schwingungsamplitude gehorcht einer Besselfunktion, kann aber angenähert durch eine glockenförmige Gaussverteilung beschrieben werden. Ein großes Problem in der QCM-Technik stellte die Beschränktheit der Messung auf das Medium Luft dar. Somit konnte ein Durchbruch dieser Technik erst erfolgen, als es möglich wurde, Quarze auch in Flüssigkeiten zu betreiben. Durch die Beschichtung einer Quarzseite mit einer viskosen Flüssigkeit kommt es zu einer Fortsetzung der Scherwelle in die Flüssigkeit hinein, welche dann in Abhängigkeit von der Dichte und der Viskosität der Flüssigkeit unterschiedlich stark gedämpft wird. Die gedämpfte Scherwelle pflanzt sich senkrecht zur Quarzoberfläche in das Medium fort. In Wasser beträgt die Abklinglänge eines 5 MHz Quarzes 250 nm. Für einen, von einer viskosen Flüssigkeit überschichteten Quarz, haben Kanazawa und Gordon⁷⁷ 1985 erstmals ein Modell vorgeschlagen:

$$\Delta f = -f_0^{\frac{3}{2}} \sqrt{\frac{\eta_L \rho_L}{\pi \mu_q \rho_q}}.$$
Gleichung 12

η_L : Viskosität der Flüssigkeit

ρ_L : Dichte der Flüssigkeit

Allerdings berücksichtigten Kanazawa und Gordon in ihrem Ansatz nicht die auftretende Dämpfung durch das viskose Medium und die damit auftretenden Energieverluste der Welle.

3.3.2.3 Beschreibung der Quarzoszillation

Bei geringer Belastung und Dämpfung kann der Quarz in der Nähe der Resonanzfrequenz durch ein elektrisches Ersatzschaltbild, bestehend aus diskreten elektrischen Bauelementen, beschrieben werden. Hierbei handelt es sich um das Butterworth-van-Dyke-Schaltbild (BVD) [Abb. 3.3 A)]. Dabei wird der serielle Zweig, der auch als Bewegungszweig (*motional branch*) bezeichnet wird, durch folgende Bewegungsgleichung:

$$L_q \frac{d^2 q}{dt^2} + R_q \frac{dq}{dt} + \frac{1}{C_q} q = 0$$
Gleichung 13

mit der resultierenden Lösung für die serielle Resonanzfrequenz:

$$f_{s0} = \frac{1}{2\pi\sqrt{L_q C_q}}$$
Gleichung 14

beschrieben.

q repräsentiert die Ladung, die Kapazität C_q die mechanische Elastizität des Quarzes, die Induktivität L_q die schwingende Masse und der Widerstand R_q die auftretenden Energieverluste. Das zwischen den beiden Goldelektroden lokalisierte Quarzmaterial verhält sich wie ein Dielektrikum in einem Plattenkondensator und ruft die parallele, statische Kapazität C_0 hervor. Durch diese Kapazität wird eine zweite, dicht benachbarte, parallele Resonanzfrequenz:

$$f_{p0} = \frac{1}{2\pi \sqrt{L_q \frac{C_q C_0}{C_q + C_0}}}$$

Gleichung 15

bedingt. Je nach Art der Oszillatorschaltung wird eine der beiden Resonanzfrequenzen bei der QCM angeregt.

Abb. 3.3 B) zeigt ein simuliertes Impedanzspektrum des BVD-Schaltbildes unter der Annahme, dass keine Dämpfung ($R_q = 0$) auftritt. Man erkennt, dass das Maximum und das Minimum des Betrages der Impedanz mit einem Phasennulldurchgang zusammenfallen.

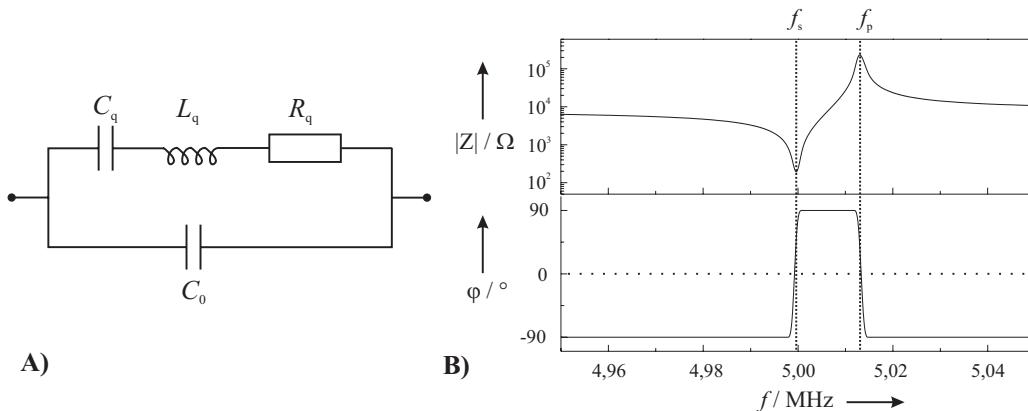


Abb. 3.3 A) Butterworth-van-Dyke-Schaltbild. Dabei repräsentiert C_q die mechanische Elastizität des Quarzes, L_q die schwingende Masse, R_q die Dämpfung und C_0 beschreibt die Admittanz entfernt von der Resonanz. **B)** Simuliertes Impedanzspektrum auf Basis des BVD-Schaltbildes unter Ausschluss von Energieverlusten mit den Parametern: $C_q = 21,7 \text{ fF}$, $L_q = 46,7 \text{ mH}$, $R_q = 0 \Omega$ und $C_0 = 4 \text{ pF}$.

Bei nicht vernachlässigbarer Dämpfung ($R_q > 0$) fallen die Phasennulldurchgänge nicht mehr mit dem maximalen bzw. minimalen Betrag der Impedanz zusammen (Abb. 3.4). In diesem Fall können vier verschiedene Resonanzfrequenzen unterschieden werden: f_s ist die Resonanzfrequenz des ersten Nulldurchgangs der Phase, $f_{Z\min}$ die Resonanzfrequenz bei minimalem Betrag der Impedanz, f_p die Resonanzfrequenz des zweiten Nulldurchgangs der Phase und $f_{Z\max}$ die Resonanzfrequenz bei maximalem Betrag der Impedanz.

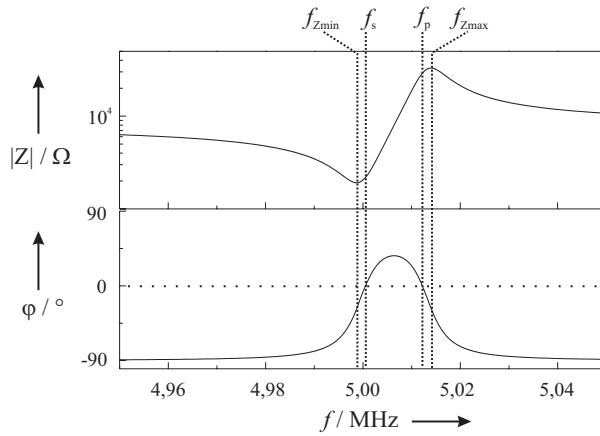


Abb. 3.4 Simuliertes Impedanzspektrum auf Basis des BVD-Schaltbildes unter Berücksichtigung von Energieverlusten mit den Parametern $C_q = 21,7 \text{ fF}$, $L_q = 46,7 \text{ mH}$, $R_q = 2000 \Omega$ und $C_0 = 4 \text{ pF}$.

In Tab. 3.3 sind die Ausdrücke der einzelnen Resonanzfrequenzen zusammengefasst.

Tab. 3.3: Mathematische Ausdrücke der Resonanzfrequenzen in Abhängigkeit von den Parametern des BVD-Schaltbildes.

Parameter	Ausdruck
f_s	$\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{L_q C_q}} \left(1 + \frac{C_0 R_q^2}{2 L_q} \right)$
f_p	$\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{L_q C_q}} \left(1 + \frac{C_q}{2 C_0} - \frac{C_0 R_q^2}{2 L_q} \right)$
$f_{Z\min}$	$\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{L_q C_q}} \left(1 - \frac{C_0 R_q^2}{2 L_q} \right)$
$f_{Z\max}$	$\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{L_q C_q}} \left(1 + \frac{C_q}{2 C_0} + \frac{C_0 R_q^2}{2 L_q} \right)$

Eine weitere Erhöhung der Dämpfung, welche eine Reduzierung des Phasenmaximums unter null ($\varphi_{\max} < 0$) hervorruft, macht eine Messung im aktiven Modus, in welchem der Quarzresonator als frequenzbestimmendes Element der Oszillatorschaltung fungiert, unmöglich. Um eine Beladung des Quarzes mit viskoelastischen Schichten, viskosen Flüssigkeiten und größeren Schichtdicken adäquat zu beschreiben, muss das elektrische Ersatzschaltbild um weitere Impedanzelemente ergänzt werden. Modelle solcher komplexeren Ersatzschaltbilder finden sich u.a. bei Johannsmann⁸¹, Martin et al.⁸², Buttry & Ward⁸³, Bandey et al.⁸⁴ und Lucklum & Hauptmann⁸⁵.

3.3.2.4 Messaufbau und Messbedingungen

Die Untersuchung der Adsorptionsprozesse von Proteinen an festkörperunterstützten Membranen erfolgte mittels QCM, deren Aufbau in Abb. 3.5 skizziert ist. Dabei wurde die QCM im aktiven Modus betrieben, d.h. der Quarz fungiert aufgrund der hohen Güte seiner Schwingung als frequenzbestimmendes Element in einer Rückkopplungsschleife eines Oszillatorschaltkreises. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Oszillatorschaltkreis auf Basis des TTL-Chips SN74LS124N (Texas Instruments, Dallas, USA) eingesetzt. Der Quarz, dessen obere Goldelektrode mit einer festkörperunterstützten Membran funktionalisiert ist, wird zwischen zwei Kalrez® Dichtringen eingespannt. Diese liegen am äußersten Rand des Quarzes auf, um einen möglichst geringen Einfluss auf die Schwingung zu nehmen. Da die Kontaktierung beider Elektroden von der Unterseite erfolgt, wurde die obere Goldelektrode mittels Silberleitkleber mit der Unterseite des Quarzes leitend verbunden. Der Oszillatorschaltkreis wird an die beiden Elektroden angeschlossen und von einer Gleichstromspannungsquelle konstant mit 4 V gespeist. Die Aufgabe des Oszillatorschaltkreises besteht darin, den Quarz zur resonanten Schwingung anzuregen und entstehende Energieverluste phasenrichtig auszugleichen. Durch die Ankopplung eines Frequenzzählers wird die Resonanzfrequenz ausgelesen und an einen Computer weitergeleitet, welcher dann ein Frequenz-Zeit-Diagramm aufzeichnet.

Zusätzlich zu dem oben beschriebenen aktiven Betriebsmodus kann auch in einem passiven Modus gemessen werden. Dazu wird mittels eines Frequenzgenerators eine erzwungene Schwingung in der Nähe der Resonanz des Quarzes angeregt. Die Massenbeladung sowie die Energiedissipation können durch Anpassen der Parameter des BVD-Schaltbildes an das resultierende frequenzabhängige Impedanzverhalten ermittelt werden. Eine simultane Bestimmung von Resonanzfrequenz und Energiedissipation ist auch mittels der dissipativen QCM Technologie möglich.

Zur Unterdrückung anderer Schwingungen ist es notwendig, dass die Messkammer mit Hilfe eines Deckels dicht und luftblasenfrei verschlossen ist, wobei der Abstand zwischen Deckel und Quarzoberfläche 200 µm beträgt. Der Zulauf ($r = 0,5$ mm) in die Messkammer erfolgt genau über der Mitte der Elektrodenfläche, während der Ablauf an den Rändern des Quarzes erfolgt, sodass eine Staupunktströmung über

dem Quarz resultiert. Über eine 12-Rollenperistaltikpumpe wird eine konstante Pumpgeschwindigkeit von 0,46 ml / min eingestellt. Mittels eines Dreiegehahns lassen sich prinzipiell zwei mögliche Flusswege einstellen, wobei die QCM sowohl im Kreislaufmodus als auch im Durchflussmodus betrieben werden kann. Im Kreislaufmodus erfolgt die Proteinzugabe über ein externes Eppendorfgefäß, durchläuft die Messzelle und wird schließlich wieder zurück in das Reaktionsgefäß gepumpt. Im Durchlaufmodus wird die durch die Messzelle gepumpte Lösung in ein Abfallgefäß geleitet. Die Messzelle, sowie der Oszillatorschaltkreis befinden sich in einem auf 20 °C temperierten Faraday-Käfig, welcher zur Minimierung von Erschütterungen auf einem Dämpfungstisch steht. Nachdem die Messkammer eingebaut, der geschlossene Flüssigkeitskreislauf hergestellt und der Faradaykäfig thermostatisiert ist, wird noch solange gewartet bis sich eine konstante Resonanzfrequenz eingestellt hat. Nach der sogenannten „Einschwingphase“ des Quarzes, kann mit Hilfe einer Mikroliterspritze die gewünschte Menge an Proteinlösung in das Eppendorfgefäß injiziert werden.

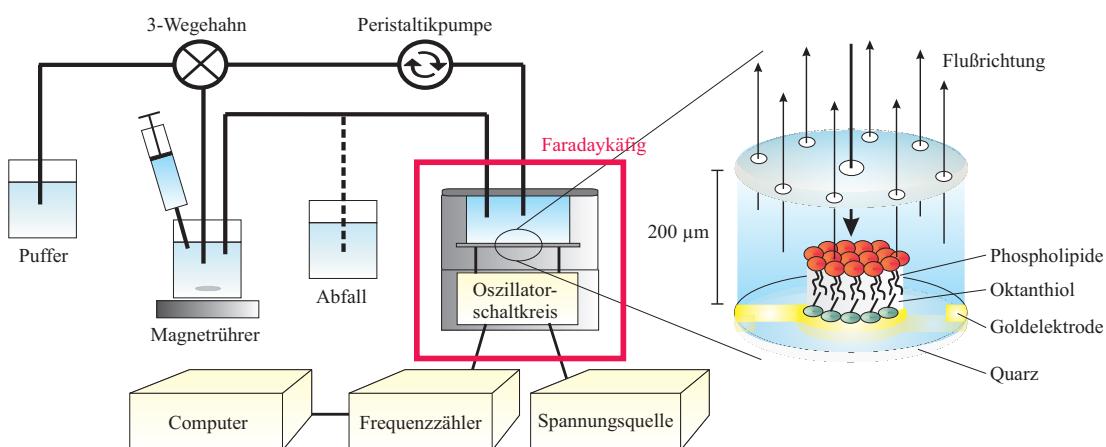


Abb. 3.5 Messaufbau der QCM. Der Schwingquarz ist zwischen zwei Dichtringen in die Teflonmesszelle eingebaut. Der Oszillatorschaltkreis, der von einer Spannungsquelle mit 4 V Gleichspannung gespeist wird, regt den Quarz zur resonanten Schwingung an, liest die Resonanzfrequenz aus und übermittelt diese an einen Frequenzzähler, welcher die Daten an einen Computer weiterleitet. Mittels einer Peristaltikpumpe kann entweder ein Kreislauf- oder ein Durchflussmodus betrieben werden, wobei der Zulauf immer über der Mitte des Quarzes erfolgt, während der Ablauf an den Rändern des Quarzes erfolgt. Die Messzelle, sowie der Oszillatorschaltkreis befinden sich in einem auf 20 °C termostatisierten Faradaykäfig.

3.3.3 Ellipsometrie

3.3.3.1 Die Polarisation von Licht

Die Ellipsometrie, erstmals beschrieben 1887 von Paul Drude^{86; 87}, ermöglicht die sensitive und zerstörungsfreie Bestimmung von Schichtdicken. Das Prinzip der Messung beruht auf der Änderung des Polarisationszustandes von reflektiertem Licht. Dazu strahlt man einen Laserstrahl definierter Polarisation in einem bestimmten Winkel auf die Probe und detektiert den reflektierten Strahl, aus dessen Polarisationszustand die Dicke der Schicht berechnet werden kann. Eine wesentliche Voraussetzung für die Interpretation ellipsometrischer Daten ist die Annahme eines lateral homogenen Films konstanter Dicke.

Licht kann als eine sich räumlich ausbreitende, elektromagnetische Welle aufgefasst werden, in welcher das elektrische und magnetische Feld senkrecht aufeinander stehen. Im Gegensatz zu natürlichem Licht mit statistisch verteilten Schwingungsebenen, versteht man unter polarisiertem Licht eine Welle mit einer genau definierten Schwingungsebene des elektrischen Feldvektors, d.h. das elektrische Feld oszilliert nur in einer Ebene. Zur Beschreibung eines Polarisationszustandes macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass dieser als Überlagerung zweier senkrecht zueinander polarisierter Teilstrahlen dargestellt werden kann. Dabei werden die elektrischen Feldvektoren als E_s und E_p bezeichnet, wobei das elektrische Feld senkrecht (E_s) bzw. parallel (E_p) zur Einfallsebene steht. Die zeitabhängigen Terme der Wellengleichungen lauten:

$$E_s = E_{s0} \cdot \sin(\omega t) \quad \text{Gleichung 16}$$

$$E_p = E_{p0} \cdot \sin(\omega t + \Delta) \quad \text{Gleichung 17}$$

wobei E_{s0} und E_{p0} die Amplituden der jeweiligen Komponenten, ω die Kreisfrequenz und Δ die Phasenverschiebung bezeichnet. Ist Δ von Null verschieden, so weisen die beiden überlagerten Wellen eine Phasenverschiebung auf und der resultierende elektrische Feldvektor rotiert auf einer Ellipse. Folglich ergibt sich die Umlaufkurve des E-Vektors aus den beiden überlagerten Komponenten E_s und E_p als allgemeine Gleichung einer Ellipse:

$$\left(\frac{E_s}{E_{s0}}\right)^2 + \left(\frac{E_p}{E_{p0}}\right)^2 - 2 \cdot \frac{E_s \cdot E_p}{E_{s0} \cdot E_{p0}} \cdot \cos \Delta = \sin^2 \Delta.$$

Gleichung 18

Prinzipiell lassen sich drei Fälle unterscheiden:

1. Fall: Lineare Polarisation: Der durch Überlagerung von E_s und E_p resultierende elektrische Feldvektor E schwingt nur in einer Ebene, wobei die Wellen der x- und y-Komponente die Phasenbeziehung $\Delta = N\pi$ (mit $N = 0, 1, 2, \dots$) haben. Damit vereinfacht sich Gleichung 18 zu einer Geradengleichung [Abb. 3.6 A)].
2. Fall: Zirkulare Polarisation: Der elektrische Feldvektor rotiert kreisförmig mit einer definierten Kreisfrequenz um die Ausbreitungsrichtung, wobei die Wellen der x- und y-Komponente gleiche Amplituden und eine relative Phasenverschiebung von $\Delta = \pi/2$ (bzw. ungeradzahliges Vielfaches) besitzen. Damit ergibt sich aus Gleichung 18 eine Gleichung eines Kreises mit dem Radius $r = E_{s0} = E_{p0}$ [Abb. 3.6 B)].
3. Fall: Elliptische Polarisation: Für alle anderen Fälle beschreibt der E-Vektor eine elliptische Umlaufbahn, aus deren Form und Orientierung im Raum die Phasenverschiebung hergeleitet werden kann. Zudem können hier noch zwei Spezialfälle unterschieden werden. Zum einen tritt elliptische Polarisation auf, wenn die Phasenverschiebung $\Delta = \pi/2$ beträgt, aber die Amplituden E_{s0} und E_{p0} verschieden groß sind [Abb. 3.6 C₁]). Zum anderen erhält man elliptisch polarisiertes Licht, wenn die Amplituden E_{s0} und E_{p0} gleich groß sind, aber die Phasenverschiebung $\Delta \neq \pi/2$ ist [Abb. 3.6 C₂]).

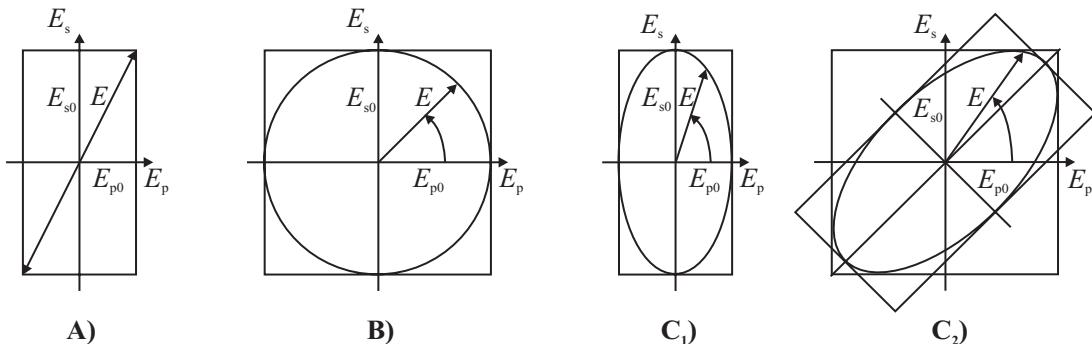


Abb. 3.6 Polarisiertes Licht von einem festen Ort aus betrachtet. **A)** Linear polarisiertes Licht mit einem Amplitudenverhältnis $E_{s0} / E_{p0} = 2$ und $\Delta = N\pi$ ($N = 0, 1, 2, \dots$). **B)** Zirkular polarisiertes Licht mit $E_{s0} = E_{p0}$ und $\Delta = \pi/2$. **C₁**) Elliptisch polarisiertes Licht mit $E_{s0} / E_{p0} = 2$ und $\Delta = N\pi/2$ ($N = 1, 3, 5, \dots$). **C₂**) Elliptisch polarisiertes Licht mit $E_{s0} = E_{p0}$ und $\Delta \neq \pi/2$.

3.3.3.2 Reflektion und Brechung an der Oberfläche

Trifft ein polarisierter Lichtstrahl auf eine Grenzfläche, so erfolgt Reflektion und Brechung, wobei sowohl der reflektierte, als auch der gebrochene Strahl teilpolarisiert wird. Der elektrische Feldvektor der einfallenden Welle kann in zwei Komponenten E_s und E_p zerlegt werden, welche senkrecht bzw. parallel zur Einfallsebene stehen. Die Einfallsebene entspricht dabei der Ausbreitungsrichtung des Lichts [Abb. 3.7 A)]. An der Grenzfläche zwischen einem optisch weniger dichten Medium zu einem optisch dichteren Medium wird die senkrecht zur Einfallsebene schwingende Komponente bevorzugt reflektiert, die parallele Komponente bevorzugt in das optisch dichtere Medium gebrochen [Abb. 3.7 B)]. Aus diesem Grund kommt es zu einer Teilpolarisierung des reflektierten und des gebrochenen Strahls. Die Fresnelschen Koeffizienten r_{12}^s und r_{12}^p beschreiben dabei die Amplituden der reflektierten Wellen:

$$r_{12}^s = \frac{n_1^* \cos(\phi_1) - n_2^* \cos(\phi_2)}{n_1^* \cos(\phi_1) + n_2^* \cos(\phi_2)} = \frac{-\cos(\phi_1) - \sqrt{\left(\frac{n_2^*}{n_1^*}\right)^2 - \sin^2(\phi_1)}}{\cos(\phi_1) + \sqrt{\left(\frac{n_2^*}{n_1^*}\right)^2 - \sin^2(\phi_1)}} \quad \text{Gleichung 19}$$

$$r_{12}^p = \frac{n_2^* \cos(\phi_1) - n_1^* \cos(\phi_2)}{n_2^* \cos(\phi_1) + n_1^* \cos(\phi_2)} = \frac{-\left(\frac{n_2^*}{n_1^*}\right) \cos(\phi_1) - \sqrt{\left(\frac{n_2^*}{n_1^*}\right)^2 - \sin^2(\phi_1)}}{\left(\frac{n_2^*}{n_1^*}\right) \cos(\phi_1) + \sqrt{\left(\frac{n_2^*}{n_1^*}\right)^2 - \sin^2(\phi_1)}}. \quad \text{Gleichung 20}$$

Für die reflektierten Intensitäten \mathfrak{R}^s und \mathfrak{R}^p gilt $\mathfrak{R}^s = |r_{12}^s|^2$ und $\mathfrak{R}^p = |r_{12}^p|^2$.

Für den Fall, dass auf der Oberfläche zusätzlich eine Schicht adsorbiert ist, findet an jeder Grenzfläche erneut Reflektion und Brechung statt [Abb. 3.7 C)]. Der Einfachheit halber soll im Folgenden der Fall betrachtet werden, bei welchem nur an der ersten Grenzfläche Brechung stattfindet. Das reflektierte Licht besteht dann aus der Überlagerung der an der ersten Grenzfläche reflektierten Welle, sowie der an der zweiten Grenzfläche reflektierten Welle. Aufgrund dessen weisen die beiden ausfallenden Wellen einen Wegunterschied und somit auch eine Phasenverschiebung

auf, die sich aus den unterschiedlichen optischen Weglängen ergibt. Somit gelten folgende Fresnelgleichungen:

$$R^s = \frac{r_{12}^s + r_{23}^s \exp(-i2\beta)}{1 + r_{12}^s r_{23}^s \exp(-i2\beta)} \quad \text{Gleichung 21}$$

$$R^p = \frac{r_{12}^p + r_{23}^p \exp(-i2\beta)}{1 + r_{12}^p r_{23}^p \exp(-i2\beta)} \quad \text{Gleichung 22}$$

mit der optischen Weglänge β unter Vernachlässigung von Vielfachreflektionen:

$$\beta = 2\pi \left(\frac{d}{\lambda} \right) n_2^* \cos(\phi_2) \quad \text{Gleichung 23}$$

und den reflektierten Intensitäten $\mathfrak{R}^{s0} = |R^s|^2$ und $\mathfrak{R}^{p0} = |R^p|^2$.

In der Ellipsometrie werden die Winkel Δ und Ψ bestimmt. Dabei entspricht der Winkel Δ der Phasendifferenz zwischen E_s und E_p der einfallenden Welle gegenüber E_s und E_p der ausfallenden Welle und kann Werte zwischen 0° und 360° annehmen. Der Winkel Ψ , welcher Werte zwischen 0° und 90° annehmen kann, beschreibt die Amplitudenänderung der elektrischen Feldvektorkomponenten parallel und senkrecht zur Einfallsalebene in Folge der Reflektion. Über die ellipsometrische Grundgleichung:

$$\frac{R^p}{R^s} = \tan \Psi \exp(i\Delta) \quad \text{Gleichung 24}$$

können dann die Reflektionskoeffizienten und damit der komplexe Brechungsindex sowie die Schichtdicke ermittelt werden⁸⁸⁻⁹⁰.

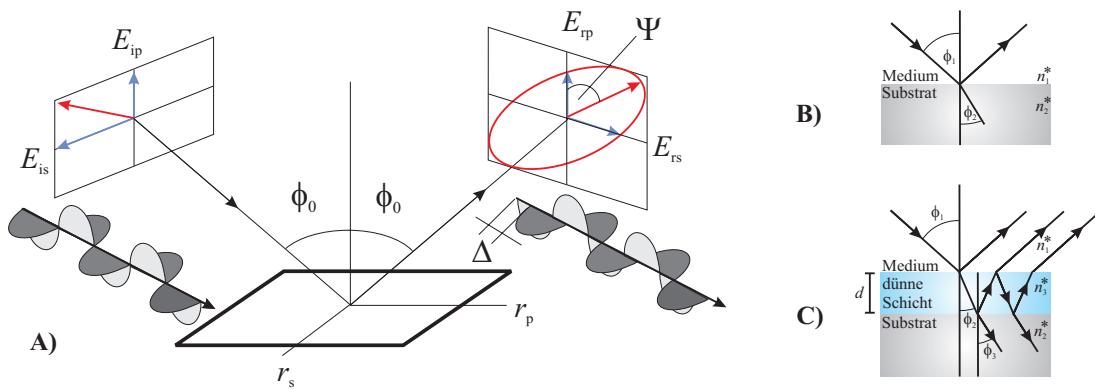


Abb. 3.7 A) Schematische Darstellung der Polarisationsänderung der einfallenden elektrischen Feldvektoren E_{is} und E_{ip} gegenüber den ausfallenden elektrischen Feldvektoren E_{rs} und E_{rp} . In der Ellipsometrie wird der Gangunterschied, ausgedrückt durch den Winkel Δ , sowie die Amplitudenänderung der Reflektion, gegeben durch den Winkel Ψ , gemessen (nach⁹¹). **B)** Reflexion und Brechung an einer Grenzfläche zwischen optisch dünnerem zu optisch dichterem Medium. **C)** Multiple Reflektionen und Brechungen unter der Berücksichtigung der Adsorption einer dünnen Schicht (nach H. Arwin⁹⁰).

3.3.3.3 Messaufbau und Messbedingungen

Die Adsorptionsuntersuchungen wurden mit dem Präzisionsellipsometer EL X-02C der Firma DRE (Ratzeburg) durchgeführt (Abb. 3.8). Als Lichtquelle wurde ein HeNe-Laser mit einer Wellenlänge von 632,8 nm eingesetzt. Der Einstrahlwinkel für alle Messungen betrug 70°. Mittels eines Polarisators wird linear polarisiertes Licht erzeugt, welches im Anschluss durch Drehung eines Verzögerungsplättchens in elliptisch polarisiertes Licht umgewandelt wird, das dann mit der Probe wechselwirkt. Die Auslöschung des Lichtstrahls am Detektor („Nullbestimmung“) wird durch Rotation von Polarisator und Analysator erreicht und so Δ und Ψ bestimmt. Da bei den durchgeführten Messungen Schichtdicken von wenigen nm bestimmt werden sollten, erfolgte die Schichtdickenbestimmung unter der Annahme und Vorgabe konstanter Brechungsindizes. Dabei wurde für das SiO₂-Substrat ein Brechungsindex von 1,4571⁹², für die Membran von 1,4840⁹³, für eine adsorbierte Proteinschicht von 1,5000⁹⁴ und für die Pufferlösung von 1,3328⁹⁵ angenommen.

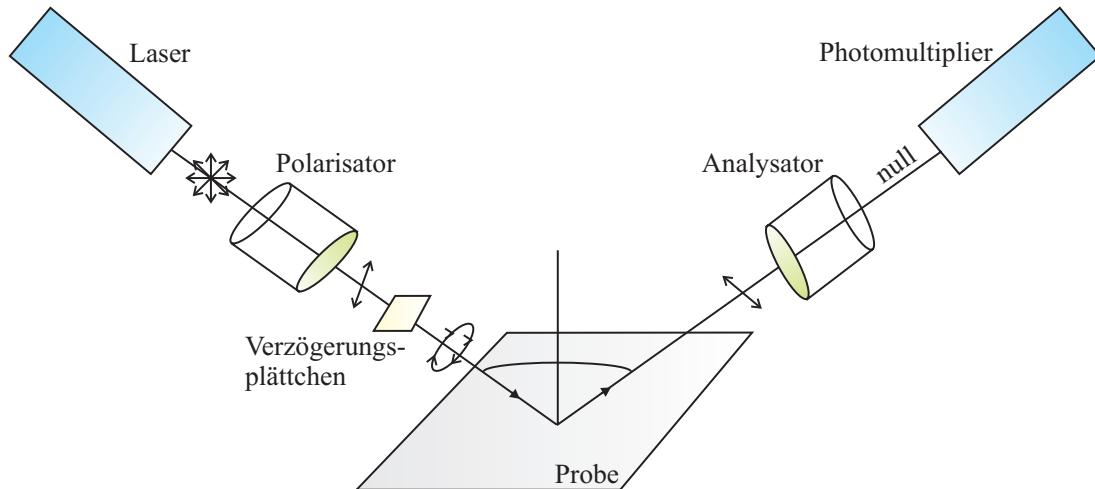


Abb. 3.8 Schematischer Aufbau eines Nullellipsometers. Das durch den HeNe-Laser ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) emittierte Licht wird durch einen Polarisator in linear polarisiertes Licht umgewandelt. Durch ein Verzögerungsplättchen ($\lambda / 4$ – Plättchen) elliptisch polarisiertes Licht trifft auf die Probe, wird reflektiert, mittels eines rotierenden Analysators auf „null“ gebracht und so die beiden Winkel Δ und Ψ bestimmt.

3.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine bildgebende Methode, bei welcher die durch Desaktivierung eines elektronisch angeregten Moleküls emittierte Strahlung detektiert wird. Durch die Absorption von Licht geeigneter Wellenlänge wird das Molekül von seinem Grundzustand (Singulettzustand S_0) in einen elektronisch angeregten Zustand (Singulettzustand S_1) überführt [Abb. 3.9 A)]. Die oberen Schwingungszustände erfahren dabei durch Stöße mit anderen Teilchen (Schwingungsrelaxation, *internal conversion*) eine strahlungslose Desaktivierung, d.h. es erfolgt auf diesem Weg eine Energieabgabe. Die Rückkehr aus dem Schwingungsgrundzustand des S_1 -Zustandes zum S_0 -Zustand kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Zum einen kann strahlungslose Relaxation stattfinden, zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die umgebenden Moleküle nicht in der Lage sind die Energie aufzunehmen. In diesem Fall kommt es zur Erzeugung eines Photons und die überschüssige Energie wird in Form von Strahlung abgegeben (Fluoreszenz). Da ein Teil der Energie bereits vor der Emission des Photons abgegeben wurde, kommt es zu einer Verschiebung zu höheren Wellenlängen. Die resultierende Differenz der Wellenlängenmaxima zwischen Absorption und Emission wird als Stock'sche Verschiebung bezeichnet⁹⁶.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Visualisierung von Lipiddoppelschichten Texas Red®-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin (Texas Red® DHPE) [Abb. 3.9 B)] und zur Markierung von F-Aktin Alexa Fluor® 488 Phalloidin [Abb. 3.9 C)] verwendet.

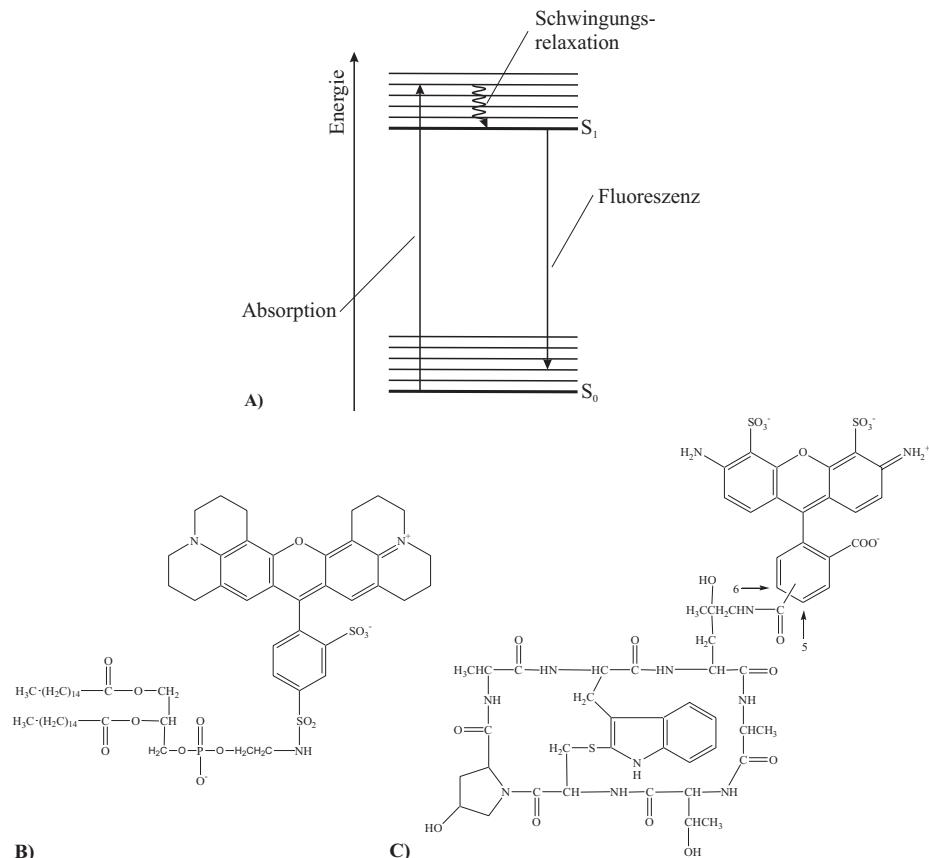


Abb. 3.9 A) Jablonski-Termschema: Gerade Linien entsprechen Strahlungsprozessen, gewellte Linien symbolisieren strahlungslose Prozesse. **B)** Texas Red® DHPE, welches zur Markierung der Modellmembran eingesetzt wurde. **C)** Alexa Fluor® 488 Phalloidin, das sich selektiv an Aktinfilamente anlagert und so deren Visualisierung ermöglicht.

3.3.4.1 Messaufbau und Messbedingungen

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop Axiotech vario der Firma Carl Zeiss GmbH (Göttingen) durchgeführt, welches in Abb. 3.10 schematisch dargestellt ist. Das durch eine Quecksilberdampflampe erzeugte Licht passiert einen Eingabe-Bandfilter, welcher nur für einen bestimmten, nämlich für die Anregung des Fluorophors notwendigen Wellenlängenbereich durchlässig ist. Der Lichtstrahl trifft auf einen dichroitischen Spiegel und wird von diesem durch ein Wasser-Immersionsobjektiv (Achromat-Objektiv 40 × / 0.80 W) auf die Probe gelenkt. Das von der fluoreszierenden Probe emittierte, langwelligere Licht kann den dichroitischen Spiegel passieren. Im

Anschluss wird durch einen Ausgabesperrfilter störendes Streulicht absorbiert. Für die durchgeführten Messungen wurde, je nach verwendetem Fluorophor Filtersatz 44 (BP 475 / 40, FT 500, BP 530 / 50), sowie Filtersatz 45 (BP 560 / 40, FT 585, BP 630 / 75) eingesetzt. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenzmessungen fanden im wässrigen Milieu statt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte über das Okular W-PI ($10 \times / 23$) und über eine CCD-Kamera (AxioCam HRm). Die erhaltenen Daten wurden mittels AxioVision 40 LE (Version 4.5.0.0) bearbeitet und dokumentiert. Die statistische Auswertung wurde mit SPIP™ (Version 3.3.5.0) durchgeführt.

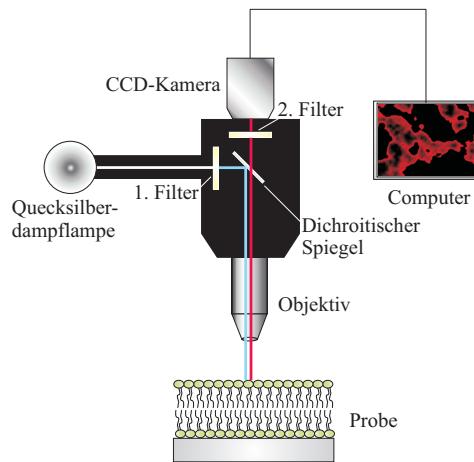


Abb. 3.10 Schematischer Aufbau eines Auflichtfluoreszenzmikroskops. Das von einer Quecksilberdampflampe erzeugte Licht trifft auf einen Eingabebandfilter und wird durch einen dichroitischen Spiegel auf die Probe gelenkt. Das emittierte, langwelligere Licht passiert den dichroitischen Spiegel. Im Anschluss wird störendes Streulicht von einem Ausgabesperrfilter absorbiert und die Fluoreszenz von einer CCD-Kamera an einen Computer weitergeleitet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Proteinisolierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden rekombinant aus *E. coli* gewonnen. Um die Löslichkeit und die spätere Aufreinigung zu erleichtern, waren alle Proteine mit Affinitäts-*Tags* fusioniert, wobei die Proteine entweder mit sechs Histidinresten oder mit Glutathion-S-Transferase (GST) versehen waren.

4.1.1 Expression und Aufreinigung der 6 × His-fusionierten Proteine

Ezrin und N-ERMAD

Die Genexpression in *E. coli* und die Aufreinigung von Ezrin und seiner N-terminalen Domäne N-ERMAD erfolgte wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben nach einer Vorschrift von Koltzscher et al.²⁹.

Expression und Isolierung von N-ERMAD

Die Ergebnisse der Expression und Isolierung von N-ERMAD sind in Abb. 4.1 dargestellt, wobei der gesamte Verlauf der Proteinisolierung mittels SDS-PAGE und *Western-blot*-Technik dokumentiert wurde. Dabei initiierte die Zugabe von IPTG die Genexpression in der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien. Im Anschluss wurden die Bakterien mittels Ultraschall lysiert (Spur 1) und Zellfragmente und unlösliche Proteine durch Ultrazentrifugation entfernt (Spur 3). Man erkennt bereits im Bakterienlysat das Auftreten einer dominanten Bande bei ~39 kDa, die in Spur 2 noch deutlicher zu erkennen ist, da ein Teil der Verunreinigungen durch den Zentrifugationsschritt bereits abgetrennt wurde. Die affinitätschromatographische Aufreinigung, bei welcher man sich die spezifische Bindung zwischen Ni-Ionen und den N-terminal an die Proteine fusionierten 6 × Histidin-*Tag* zunutze macht, erfolgte mit Ni-NTA-Agarose (Spur 4-7). Hier sieht man, dass nahezu das gesamte 6 × Histidin- fusionierte Protein an die Matrix gebunden hat, wohingegen der Durchlauf die Verunreinigungen enthält (Spur 4). Das Spülen der Säulenmatrix mit den Waschpuffern I (Spur 5 & 6) und II (Spur 7), welche eine erhöhte Imidazolkonzentration besaßen, löste nahezu keine weiteren unspezifisch gebundenen Proteine ab. Vielmehr wird, bedingt durch die erhöhte Imidazolkonzentration des Waschpuffers, erkennbar die ~39 kDa Bande von der

Matrix (Spur 7) abgelöst. Durch Eluierung mittels eines Imidazolsprungs ($c = 250$ mM) erhält man die aufgereinigte ~39 kDa Bande (Spur 8). Die Identifizierung der ~39 kDa Bande als $6 \times$ His-N-ERMAD erfolgte mit Hilfe der *western-blot*-Technik (Spur 9) unter dem Einsatz eines $6 \times$ His-Antikörpers. Hier treten noch zwei höhermolekulare Aggregate bei ~50 kDa und ~60 kDa auf, welche jedoch verglichen mit N-ERMAD eine sehr geringe Intensität aufweisen.

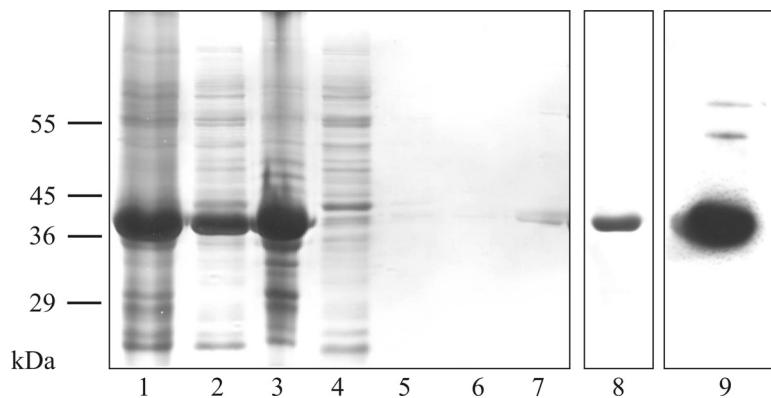


Abb. 4.1 SDS-PAGE (Spur 1-8) und *Western-blot* (Spur 9) zur Isolierung von N-ERMAD aus *E. coli*. Spur 1: Bakterienlysat nach der Ultrabeschallung. Spur 2: Überstand nach der Ultrazentrifugation. Spur 3: Pellet nach der Ultrazentrifugation. Spur 4: Durchlauf der Ni-NTA-Agarose-Säule. Spur 5 & 6: Spülen mit Waschpuffer I. Spur 7: Spülen mit Waschpuffer II. Spur 8: Typische Elutionsfraktion. Spur 9: *Western-blot* Analyse der Elutionsfraktion.

Expression und Isolierung von Ezrin

Die Ergebnisse der Expression und Isolierung von Ezrin, deren Verlauf mittels SDS-PAGE und *western-blot* Technik analysiert wurde, sind in Abb. 4.2 dargestellt. Nach Induktion der Genexpression durch IPTG in der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien, wurden diese nach drei Stunden durch Ultraschall lysiert (Spur 1). Man erkennt hier deutlich eine Bande, die bei ~82 kDa auftritt. Unlösliche Proteine und Zellfragmente wurden mittels Ultrazentrifugation abgetrennt. Im resultierenden Überstand (Spur 3) sieht man eine Anreicherung der ~82 kDa Bande. Die weitere Aufreinigung erfolgte affinitätschromatographisch, indem der Überstand auf eine Ni-NTA-Agarose-Matrix appliziert wurde, welche eine spezifische Bindung mit $6 \times$ Histidin fusionierten Proteinen vermittelt. Im Durchlauf der Proteinlösung (Spur 4) sieht man diejenigen Proteine, welche nicht an die Matrix gebunden haben. Der Großteil dieser Proteine findet sich im Durchlauf, während die Waschschrifte I (Spur 5) und II (Spur 6) nahezu keine weitere Ablösung bedingen. Allerdings erkennt man, dass sowohl im Durchlauf als auch in den beiden sich anschließenden

Waschschritten die Bande bei ~82 kDa in geringer Intensität auftritt. Mittels eines Imidazolsprungs ($c = 250$ mM) wurden die an der Matrix gebundenen Proteine eluiert (Spur 7). Hier tritt neben der dominanten ~82 kDa Bande eine Reihe von niedermolekularen Verunreinigungen auf. Um zu klären, ob es sich um Abbaubanden der ~82 kDa Verbindung handelt, wurde die Elutionsfraktion durch die *western-blot*-Technik analysiert, wobei ein $6 \times$ Histidin-Antikörper als Sonde eingesetzt wurde. Betrachtet man das Ergebnis (Spur 8), erkennt man, dass fast alle im SDS-Gel detektierten Banden auch im *western-blot* auftreten. Somit liegen Proteine vor, die einen N-terminalen $6 \times$ Histidin-Tag aufweisen, also C-terminal verkürzte Ezrinmoleküle darstellen. Aufgrund dessen ist eine Abtrennung dieser Verunreinigungen über eine Ni-NTA-Matrix nicht möglich.

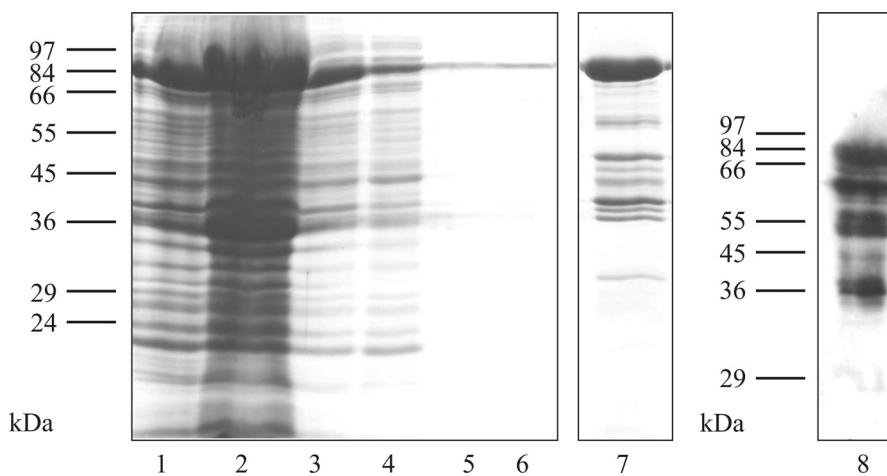


Abb. 4.2 Isolierung und Aufreinigung von Ezrin aus *E. coli* analysiert durch SDS-PAGE (Spur 1-7) und *western-blot*-Technik (Spur 8). Spur 1: Bakterienlysat nach Ultraschallbehandlung. Spur 2: Pellet nach der Ultrazentrifugation. Spur 3: Überstand nach der Ultrazentrifugation. Spur 4: Durchlauf der Ni-NTA-Agarose-Matrix. Spur 5: Spülen mit Waschpuffer I. Spur 6: Spülen mit Waschpuffer II. Spur 7: Typische Elutionsfraktion. Spur 8: *western-blot*-Analyse der Elutionsfraktion.

Um eine Abtrennung anderer, nicht $6 \times$ Histidin fusionierter Proteine zu erreichen, wurde die Elution der ersten Ni-NTA-Agarose-Säule dialysiert, auf eine weitere Ni-NTA-Matrix appliziert, gewaschen und eluiert. Das Ergebnis dieses Aufreinigungsschrittes wurde mittels SDS-PAGE analysiert. In Spur 1 von Abb. 4.3 ist eine repräsentative Elutionsfraktion dargestellt. Man erkennt hier eine dominierende Bande bei ~82 kDa, die Ezrin zugeordnet werden kann. Zusätzlich treten eine Reihe von niedermolekularen Banden auf, die denen der ersten affinitätschromatographischen Aufreinigung entsprechen.

Um Ezrin dennoch von den Verunreinigungen abzutrennen wurde, basierend auf möglicherweise vorhandenen Ladungsunterschieden der Proteine, eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Dazu wurde die Proteinlösung gegen einen Puffer niedriger Ionenstärke (10 mM NaCl) dialysiert, auf eine Q-Sepharosematrix aufgetragen, gewaschen und mittels eines steigenden Salzgradienten eluiert. Das Ergebnis der Aufreinigung, dokumentiert durch SDS-PAGE, ist in Abb. 4.3 dargestellt. Dabei zeigt Spur 2 die Proteinlösung nach dem Dialyseschritt. Hier erkennt man neben der Ezrin-Bande bei ~82 kDa auch niedermolekulare Abbaubanden des Proteins. Sowohl im Durchlauf (Spur 3-5) als auch nach Waschen der Säulenmatrix mit Puffer (Spur 6) ist kein Protein im SDS-Gel detektierbar, was auf eine komplette Adsorption der Proteine an die Matrix hinweist. Um die gebundenen Proteine selektiv von der Matrix abzulösen, wurde die NaCl-Konzentration sukzessive erhöht: 50 mM (Spur 7-9), 100 mM (Spur 10-12), 200 mM (Spur 13-15) und 300 mM (Spur 16-20). Die intensivsten Banden sind in Spur 16 erkennbar, wobei die Bande bei ~82 kDa Ezrin entspricht, während Abbaubanden im niedermolekularen Bereich auftreten. In den restlichen Spuren (15, 17-20), in denen Proteinbanden detektiert wurden, zeigt sich bei verringriger Intensität eine gleiche Verteilung der Proteinbanden wie in Spur 16. Somit kann auch mittels Ionenaustauschchromatographie keine weitere Verbesserung der Aufreinigung erzielt werden.

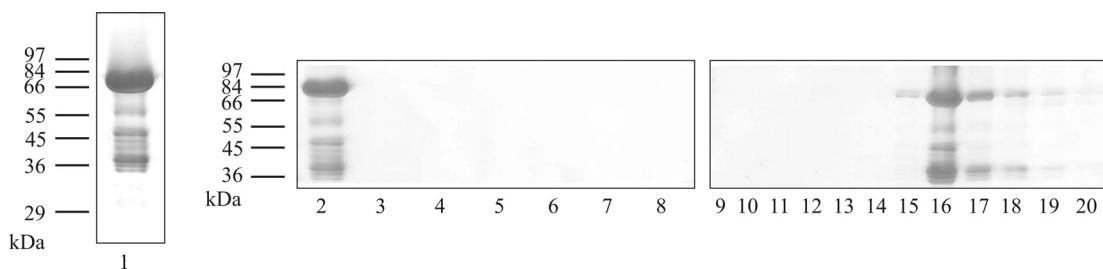


Abb. 4.3 SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung von Ezrin durch Ni-NTA-Agarose (Spur 1) und Q-Sepharose (Spur 2-20). Spur 1: Elutionsfraktion nach zweimaliger Aufreinigung mittels Ni-NTA Matrix. Spur 2: Proteinlösung nach Dialyse. Spur 3-5: Durchlauf der Q-Sepharose Matrix. Spur 6: Spülen der Q-Sepharose Matrix. Spur 7-9: Elution mit 50 mM NaCl. Spur 10-12: Elution mit 100 mM NaCl. Spur 13-15: Elution mit 200 mM NaCl. Spur 16-20: Elution mit 300 mM NaCl.

Um zu überprüfen, ob die Abbaubanden schon während der Genexpression, also bereits in der Bakterienzelle, oder erst während der Aufreinigungsprozedur entstanden sind, wurde Ezrin bei 37 °C mehrere Minuten inkubiert. Abb. 4.4 zeigt in Form eines SDS-Gels den Verlauf dieses Experiments. In Spur 1 ist Ezrin vor

Beginn der Inkubation aufgetragen. Man erkennt hier die typische Ezrinbande bei ~82 kDa, sowie die auftretenden Verunreinigungen. Im Folgenden wurde Ezrin bei 37 °C fünf Minuten (Spur 2), zehn Minuten (Spur 3), 30 Minuten (Spur 4) und 60 Minuten (Spur 5) inkubiert. Anhand der auftretenden Intensität sowie der Verteilung der Banden lässt sich keine Intensivierung der Abbaubanden bei erhöhten Temperaturen beobachten. Zu Vergleichszwecken ist in Spur 6 eine 1 : 1 Mischung von Ezrin zu N-ERMAD und in Spur 7 N-ERMAD aufgetragen.

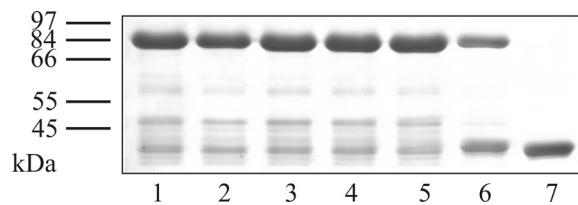


Abb. 4.4 Temperaturstabilität von Ezrin analysiert durch SDS-PAGE. Spur 1: Ezrin. Spur 2: Fünf Minuten Inkubation von Ezrin bei 37 °C. Spur 3: Zehn Minuten Inkubation von Ezrin bei 37 °C. Spur 4: 30 Minuten Inkubation von Ezrin bei 37 °C. Spur 5: 60 Minuten Inkubation von Ezrin bei 37 °C. Spur 6: Ezrin und N-ERMAD im Verhältnis 1 : 1. Spur 7: N-ERMAD.

Aus den erzielten Ergebnissen kann man schließen, dass die Kontaminierungen des Ezrins aller Wahrscheinlichkeit nach bereits in den Bakterienzellen vorliegen und deshalb auch mit den hier angewandten Methoden nicht abgetrennt werden konnten. Da jedoch Ezrin in allen Fraktionen die dominierende Bande darstellt und die Verunreinigungen mit niedriger Intensität auftreten, ist eine Verwendung der Ezrinfraktionen gerechtfertigt.

4.1.2 Expression und Aufreinigung der GST fusionierten Proteine

Ezrin T567D, Ezrin T567A und N-ERMAD

Die Genexpression in *E. coli* und die Aufreinigung der Ezrinmutanten T567D und T567A sowie der N-terminalen Domäne N-ERMAD erfolgte wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben.

Expression und Isolierung von Ezrin T567D

Die Ergebnisse der Expression und Isolierung der konstitutiv aktiven Mutante Ezrin T567D sind in Abb. 4.5 dargestellt, wobei die Dokumentation des gesamten Verlaufs der Proteinisolierung mittels SDS-PAGE erfolgte. In der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien wurde die Genexpression durch Zugabe von IPTG induziert und die Bakterien nach drei Stunden mittels dreimaligem Einfrieren und

Auftauen sowie Ultraschall lysiert (Spur 1). Man erkennt bereits hier eine Bande bei ~105 kDa, welche dem GST fusionierten Ezrin T567D zugeordnet werden kann. Zusätzlich treten noch einige Banden höherer Intensität im Bereich von ~36 kDa auf. Unlösliche Bestandteile wurden mittels Ultrazentrifugation abgetrennt (Spur 2), während sich im Überstand die löslichen Proteine befinden (Spur 3). Die affinitätschromatographische Aufreinigung wurde über eine Glutathion-Sepharose-Matrix durchgeführt. Man sieht hier, dass im Durchlauf (Spur 4) fast alle Kontaminierungen enthalten sind, während der Waschschritt der Matrix nahezu keine weiteren Proteine enthält (Spur 5). Spur 6-9 zeigen die ersten vier Elutionsfraktionen, die nur eine relativ geringe Ausbeute an Ezrin T567D enthalten. Zudem treten wie bei der Isolierung von Ezrin einige Abbaubanden geringer Intensität auf.

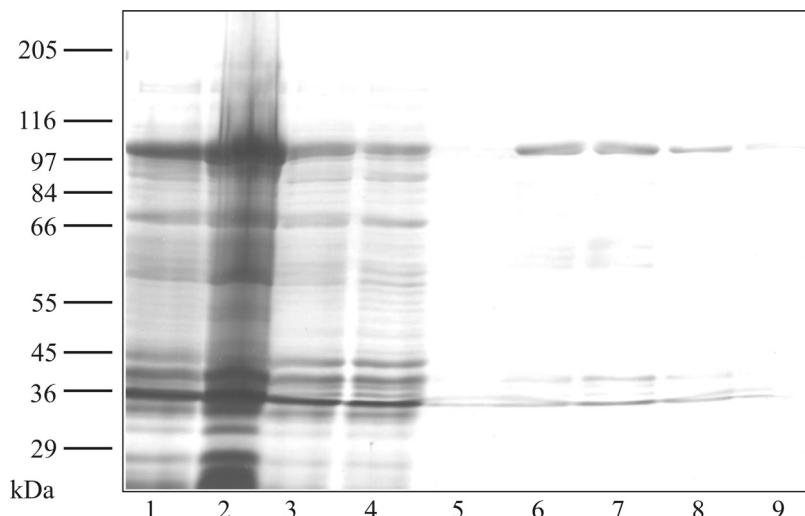


Abb. 4.5 SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung von Ezrin T567D über eine Glutathion-Sepharose-Matrix. Spur 1: Bakterienlysat. Spur 2: Pellet nach der Ultrazentrifugation. Spur 3: Überstand nach der Ultrazentrifugation. Spur 4: Durchlauf der Glutathion-Sepharose-Matrix. Spur 5: Waschschritt. Spur 6-9: Elutionsfraktionen.

Expression und Isolierung von Ezrin T567A

Die Versuchsresultate der Expression und Isolierung der konstitutiv inaktiven Mutante Ezrin T567A, deren Verlauf mittels SDS-PAGE analysiert wurde, sind in Abb. 4.6 dargestellt. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte drei Stunden nach der Genexpression, die in der exponentiellen Wachstumsphase durch IPTG induziert worden war, indem diese dreimal eingefroren und aufgetaut sowie Ultraschall ausgesetzt waren (Spur 1). Neben einer prägnanten Bande bei ~105 kDa, die Ezrin T567A zugeordnet werden kann, tritt noch eine stärker ausgeprägte Bande bei

~36 kDa auf, bei der es sich vermutlich um N-ERMAD handelt. Im Überstand der Ultrazentrifugation (Spur 3) tritt die Bande bei 105 kDa in nur noch relativ geringer Intensität auf, während der Großteil sich als unlöslicher Bestandteil im Pellet findet (Spur 2). Die Adsorption von Ezrin T567A an die Glutathion-Sepharose-Matrix ermöglicht den Großteil der Verunreinigung im Durchlauf (Spur 4) und im Waschschritt (Spur 5) abzutrennen. Spuren 6-9 zeigen Elutionsfraktionen, wobei das isolierte Ezrin T567A nur in relativ geringer Intensität auftritt.

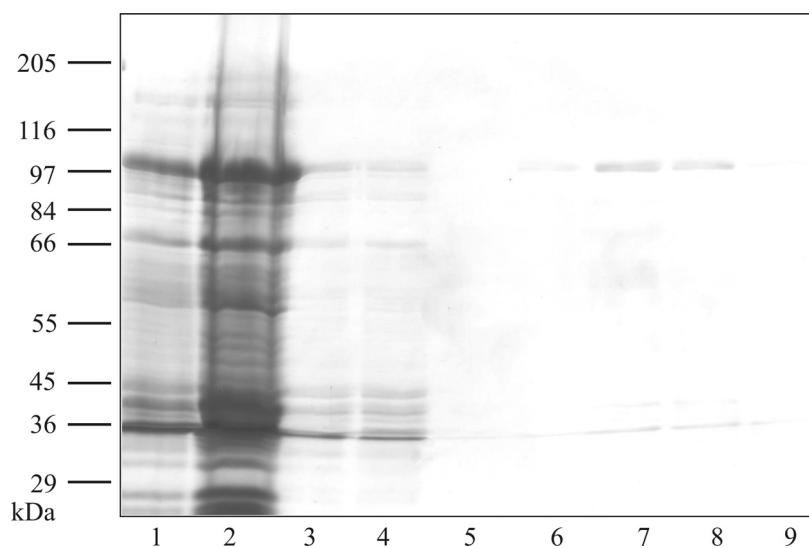


Abb. 4.6 Aufreinigung von Ezrin T567A über eine Glutathion-Sepharose-Matrix. Spur 1: Bakterienlysat. Spur 2: Pellet nach der Ultrazentrifugation. Spur 3: Überstand nach der Ultrazentrifugation. Spur 4: Durchlauf der Glutathion-Sepharose-Matrix. Spur 5: Waschschritt. Spur 6-9: Elutionsfraktionen.

Isolierung von N-ERMAD und proteolytische Abspaltung des GST-Tags

Für die Untersuchung der Wechselwirkung von S100P mit der N-terminalen Domäne von Ezrin war es notwendig, N-ERMAD ohne fusionierten Tag zu verwenden. Zu diesem Zweck wurde N-ERMAD als GST-Fusionsprotein isoliert, an eine Glutathion-Sepharose-Matrix gebunden und anschließend dessen Affinitäts-Tag durch Thrombin abgespalten. Das Ergebnis ist in Abb. 4.7 als SDS-Gel dokumentiert. Dabei ist in Spur 2 eine Probe der Säulenmatrix dargestellt, die eine deutlich erkennbare Bande bei ~63 kDa aufweist, welche dem adsorbierten GST-fusionierten N-ERMAD entspricht. Die proteolytische Abspaltung des GST-Tags wurde durch Zugabe von Thrombin initiiert. Um einen weiteren Abbau des Proteins vorzubeugen, wurde PMSF als Proteaseinhibitor zugesetzt. Die Säulenmatrix wurde zentrifugiert und führte zur Abtrennung des gespaltenen Proteins. Der resultierende

Überstand ist in Spur 1 aufgetragen. Hier tritt eine dominante Bande bei ~36 kDa auf, die N-ERMAD zugeordnet werden kann.

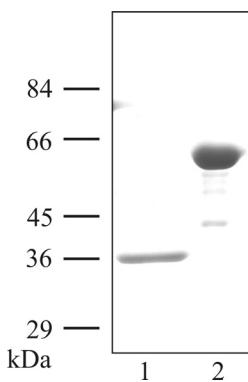


Abb. 4.7 Proteolytische Abspaltung des GST-Tags von N-ERMAD. Spur 1: N-ERMAD nach der Thrombin Inkubation. Spur 2: An die Glutathion-Sepharose-Matrix adsorbiertes GST-fusioniertes N-ERMAD.

4.1.3 Expression und Aufreinigung des $6 \times$ His-fusionierten Proteins S100P

Die Genexpression in *E. coli* und die Aufreinigung von S100P erfolgte wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben nach einer Vorschrift von Koltzscher et al.²⁹.

Der Verlauf der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE analysiert und ist in Abb. 4.8 dokumentiert. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG in der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden wurde die Bakteriensuspension zuerst durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen sowie Sonifizierung lysiert (Spur 1) und dann zentrifugiert. Im Lysat erkennt man deutlich eine dominierende Bande bei ~10 kDa, welche aufgrund der denaturierenden und reduzierenden Bedingungen dem monomeren S100P entspricht. Im Überstand nach der Ultrazentrifugation (Spur 2) ist eine Intensivierung der S100P Bande detektierbar, während im Pellet (Spur 3) nahezu kein S100P vorhanden ist. Der Überstand wurde auf eine Phenylsepharose-Matrix appliziert und diese dann gewaschen. Sowohl der Durchlauf (Spur 3) als auch der Waschschritt (Spur 4) enthalten fast alle Kontaminanten, sodass in der resultierenden Elution (Spur 6) nahezu reines S100P vorliegt, erkennbar an der ausgeprägten Bande bei ~10 kDa. Zur weiteren Aufreinigung wurde die eluierte Proteinlösung über Nacht dialysiert (Spur 7) und auf eine Ni-NTA-Agarose-Matrix appliziert. Hier treten weder im Durchlauf (Spur 8) noch nach dem Waschen (Spur 9) Verunreinigungen auf, sodass

die Elutionsfraktion (Spur 10) ausschließlich eine Bande bei ~10 kDa, die dem aufgereinigten S100P entspricht, enthält.

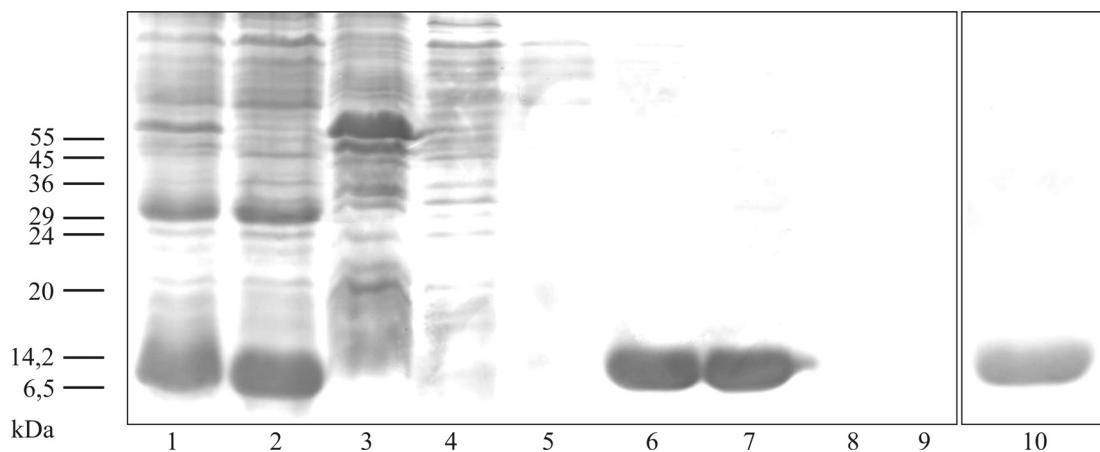


Abb. 4.8 Expression und Aufreinigung von S100P analysiert durch SDS-PAGE. Spur 1: Bakterienlysat. Spur 2: Überstand nach der Ultrazentrifugation. Spur 3: Pellet nach der Ultrazentrifugation. Spur 4: Durchlauf der Phenylsepharose-Matrix. Spur 5: Waschsritt. Spur 6: Elution der Phenylsepharose-Matrix. Spur 7: Proteinlösung nach der Dialyse. Spur 8: Durchlauf der Ni-NTA-Agarose-Matrix. Spur 9: Waschsritt. Spur 10: Typische Elutionsfraktion.

4.2 Modell zur Auswertung der kooperativen Adsorption von Teilchen an Oberflächen

Wie im nachfolgenden Kapitel 4.4 gezeigt wird, handelt es sich bei der Bindung von Ezrin an PIP₂-dotierte POPC-Membranen um eine kooperative Adsorption. Durch Messungen mit der Quarzmikrowaage und dem Rasterkraftmikroskop konnten zudem Erkenntnisse über die Reversibilität der Bindung, die Oberflächenbelegung mit Protein sowie das Wachstum von Proteindomänen gewonnen werden. Unter anderem wurde gezeigt, dass eine teilweise Reversibilität der Ezrinbindung charakteristisch ist. Im Unterschied zu anderen Beispielen einer teilweisen Reversibilität, wie sie z.B. bei der Annexin A1 Adsorption beobachtet werden kann, dessen Irreversibilität auf der Bindung an vorhandenen Lipiddomänen beruht, wird die Irreversibilität der Ezrin Adsorption durch intermolekulare Wechselwirkungen von Ezrinmolekülen auf der Oberfläche bedingt. Deshalb ist die Annahme einer Langmuirkinetik nicht gerechtfertigt, da dieses Modell eine völlig reversible Bindung voraussetzt und zudem eine Interaktion der Teilchen auf der Oberfläche ausschließt. Aufgrund dessen ist es notwendig, ein geeignetes theoretisches Modell zu verwenden, welches die korrekte Beschreibung der experimentellen Daten widerspiegelt. Ein solches kinetisches Modell, mit dessen Hilfe die kooperative Adsorption von Ezrin an PIP₂-dotierte Membranen belegt werden kann, wurde von Minton^{97; 98} entwickelt und soll im Folgenden vorgestellt werden.

Abb. 4.9 zeigt schematisch die von Minton⁹⁸ vorgeschlagenen kinetischen Prozesse, die eine kooperative Adsorption bedingen. Im Rahmen dieser Arbeit liegt dem Modell die strukturelle Annahme zu Grunde, dass alle Partikel in Form von Kreisen an die Oberfläche adsorbieren und eine Proteinmonoschicht ausbilden, d.h. im Gleichgewichtszustand hat jedes Teilchen Kontakt zur Oberfläche. Zudem erfolgt das Wachstum der Proteindomänen unter der Annahme einer reversiblen Anlagerung von einzelnen Teilchen, also der Addition von Proteinmonomeren und nicht durch die Fusion von Proteindomänen. Diese Vereinfachung des Modells ist dadurch gerechtfertigt, dass die laterale Diffusion von Proteindomänen stark mit der Größe der Domäne abnimmt. Unter diesen Voraussetzungen erfolgt die Bildung von $i + 1 -$ meren durch die Adsorption von in Lösung befindlichen Monomeren an vorhandene $i -$ mère über zwei mögliche Wege. Im ersten Fall adsorbiert ein Teilchen aus der Lösung an einen freien Platz auf der Oberfläche (Übergangszustand T₁), diffundiert

lateral zu einer Proteindomäne (T_2) und lagert sich dort an. Im zweiten Fall kommt es zu einer Anlagerung eines Monomers aus der Lösung auf eine existierende Domäne (T_3) mit anschließender Insertion in diese. In Analogie zu Minton wird dieser Prozess als *piggyback*-Anlagerung bezeichnet. Die Kombination beider Möglichkeiten des Domänenwachstums liefert folgende Ratengleichungen:

$$\frac{d\rho_1}{dt} = \left[k_{1f}c + \sum_{i=1} k_{2b}^{(i)}\rho_{i+1} + (k_{2b}^{(1)} + k_{3b}^{(1)})\rho_2 \right]$$

Gleichung 25

$$- \left[k_{1b} + \sum_{i=1} k_{2f}^{(i)}\rho_i + k_{2f}^{(1)}\rho_1 + k_{3f}^{(1)}c \right] \rho_1$$

und für $i > 1$

$$\frac{d\rho_i}{dt} = (k_{2f}^{(i-1)}\rho_1 + k_{3f}^{(i-1)}c)\rho_{i-1} + (k_{2b}^{(i)} + k_{3b}^{(i)})\rho_{i+1}$$

Gleichung 26

$$- \left[(k_{2b}^{(i-1)} + k_{3b}^{(i-1)}) + (k_{2f}^{(i)}\rho_1 + k_{3f}^{(i)}c) \right] \rho_i .$$

- ρ_i : Oberflächenpartikeldichte der jeweiligen i – meren Spezies
- c : Konzentration der Teilchen in Lösung
- k_{nf} : Ratenkonstante der Hinreaktion ($n = 1,2,3$)
- k_{nb} : Ratenkonstante der Rückreaktion ($n = 1,2,3$)

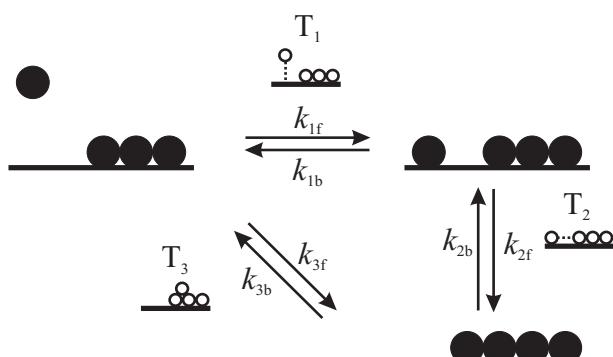


Abb. 4.9 Schematische Darstellung des kinetischen Modells nach Minton⁹⁸. Das Wachstum von Proteindomänen auf der Oberfläche kann zum einen durch Adsorption (Übergangszustand T_1) mit anschließender lateraler Addition (T_2), zum anderen durch *piggyback* Anlagerung (T_3) und Insertion in Proteindomänen beschrieben werden.

Im Folgenden sollen die einzelnen Gleichungen der Ratenkonstanten wiedergegeben werden. Eine Skalierung und damit eine Vereinfachung der einzelnen Ausdrücke wird gemäß Minton⁹⁸ mittels Division aller Ratenkonstanten durch die Ratenkonstante der Desorption erreicht:

$$\overset{'}{k_{1f}} = K_1^{\text{Ads}} / \gamma_1,$$

Gleichung 27

$$\overset{'}{k_{1b}} = 1,$$

Gleichung 28

$$\overset{(i)}{k_{2f}} = k_{2f}^{0'} \frac{\gamma_1 \gamma_i}{\gamma_{i+1}} s_i,$$

Gleichung 29

$$\overset{(i)}{k_{2b}} = k_{2f}^{0'} s_i / \exp(-\Delta F_i / RT),$$

Gleichung 30

$$\overset{(i)}{k_{3f}} = J K_1^{\text{Ads}} \left(1 - \frac{1}{\gamma_1} \right) \frac{a_i}{\sum_j \rho_j a_j},$$

Gleichung 31

$$\overset{(i)}{k_{3b}} = \frac{J (1 - \gamma_1^{-1}) \gamma_{i+1} a_i}{\exp(-\Delta F_i / RT) \gamma_i \sum_j \rho_j a_j}.$$

Gleichung 32

K_1^{Ads} : Gleichgewichtskonstante der Adsorption von Protein aus der Lösung

γ_i : Aktivitätskoeffizient der entsprechenden Spezies i

s_i : Umfang des adsorbierten Teilchens

a_i : Fläche der i-meren Domäne

ΔF_i : Änderung der freien Energie bei der Monomeraddition

J : *piggyback*-Anlagerungskonstante

Zu beachten ist, dass sich die Werte für die Parameter s_i , a_i und ΔF_i aus dem gewählten strukturellen Modell ergeben. In diesem Fall wurde angenommen, dass alle Proteine als kreisförmige Partikel an die Oberfläche adsorbieren. Dabei ergibt

sich die Gesamtfläche (a_i) als Produkt der beteiligten Teilchen i und der Fläche eines Monomers (a_1), also $a_i = i \cdot a_1$. Der Umfang, den eine Proteindomäne beschreibt, beträgt:

$$s_i = 2\sqrt{i\pi a_1} .$$

Gleichung 33

Die Änderung der freien Energie ΔF_i wird als Produkt der freien Energie eines einzelnen intermolekularen Kontakts (U_c) und der Änderung der Anzahl der Kontakte, welcher aus der Addition von einem Monomer zu einer Proteindomäne resultiert ($\Delta n_{c,i \rightarrow i+1}$) definiert:

$$\Delta F_i = \Delta n_{c,i \rightarrow i+1} U_c$$

Gleichung 34

mit

$$\Delta n_{c,i \rightarrow i+1} = 2,5 + 3,78 \left\{ \exp[-(i+1)/2,51] - \exp[-i/2,51] \right\},$$

Gleichung 35

wobei $\Delta n_{c,i \rightarrow i+1}$ durch die Annahme einer hexagonalen Anordnung mit einer maximalen Anzahl an intermolekularen Kontakten empirisch bestimmt wurde.

Mittels Matlab[®] (Version 6.5)* wurden durch die Variation der Parameter $c^* = K_1^{\text{Ads}} c$, k_{1b} , U_c , k_{2f}^0 und J zeitaufgelöste Adsorptions- und Desorptionsverläufe simuliert und mit den experimentellen QCM-Daten verglichen (siehe Kapitel 4.4). Hier soll zum besseren Verständnis des Modells der Einfluss der einzelnen Parameter auf die Kurvenverläufe dargestellt werden. Dabei entspricht c^* einer um K_1^{Ads} skalierten Proteinkonzentration in Lösung, wobei K_1^{Ads} die thermodynamische Gleichgewichtskonstante der Adsorption und c die Proteinkonzentration in Lösung ist. k_{1b} ist die Ratenkonstante der Desorption. Der Beginn der Desorption wurde dadurch initialisiert, dass die Proteinkonzentration $c = 0$ gesetzt wurde. Die

* Der Programmcode wurde von Allen P. Minton zur Verfügung gestellt.

Kooperativität wird durch U_c beschrieben, was die freie Energie eines intermolekularen Kontakts in der Proteindomäne wiedergibt. Dabei entspricht ein negativer Wert attraktiven Kräften, also einer positiven Kooperativität, während ein positiver Wert repulsive Kräfte, also eine negative Kooperativität symbolisiert. Die Ratenkonstante der lateralen Proteinaddition ist gegeben durch k_{2f}^0 und die Wahrscheinlichkeit der *piggyback*-Anlagerung wird durch die dimensionslose Konstante J definiert, wobei ein höherer Wert von J eine *piggyback*-Anlagerung wahrscheinlicher macht.

Im Folgenden sind simulierte Kurvenverläufe dargestellt, bei denen immer ein Parameter variiert wurde. Die jeweils anderen Parameter wurden konstant gehalten und zwar: $c^* = 5$, $U_c = -5RT$, $k_{2f}^0 = 0,01 \text{ s}^{-1}$, $J = 0,01$ und $k_{1b} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Im Rahmen der Simulationen betrug der Zeitraum der Adsorption wie der Desorption jeweils 5 000 Sekunden. Graphisch dargestellt ist die Oberflächenbelegung Θ gegen die Zeit. Im ersten Fall, dargestellt in Abb. 4.10, wurde die um die Gleichgewichtskonstante der Adsorption skalierte Konzentration c^* variiert. Dabei wurden Kurvenverläufe mit $c^* = 0,5, 1, 2,5, 5$ und 10 berechnet. Man erkennt deutlich, dass sich eine Zunahme von c^* sowohl auf den Adsorptions- als auch auf den Desorptionsprozess auswirkt. Bei Werten von $0,5$ und 1 ist eine nahezu reversible Bindung detektierbar, während bei den anderen Werten der Adsorptions- sowie der Desorptionsvorgang im beobachteten Zeitfenster noch nicht abgeschlossen ist. Insbesondere der Adsorptionsprozess liefert bei einer bereits hohen Belegung der Oberfläche einen nahezu linear verlaufenden zweiten Anstieg der Oberflächenbelegung.

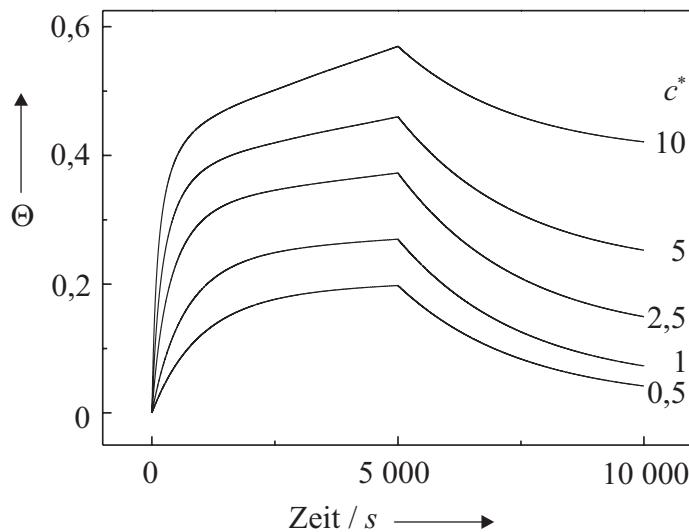


Abb. 4.10 Simulierte Adsorptions- und Desorptionsverläufe mit $c^* = 0,5, 1, 2,5, 5, 10$ unter Konstanthaltung von $U_c = -5RT$, $k_{2f}^0 = 0,01\text{ s}^{-1}$, $J = 0,01$ und $k_{1b} = 4 \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$.

Bei der folgenden Simulationsserie (Abb. 4.11) wurde die Ratenkonstante der Desorption k_{1b} verändert. Dabei fand eine Zuweisung folgender Werte zur Ratenkonstante statt: $1 \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$, $5 \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ und $10 \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$. Hier ist zu beobachten, dass sich die variierten Werte auf die Oberflächenbelegung sowohl bei der Adsorption als auch bei der Desorption auswirken. Während ein Wert von $1 \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ nahezu eine Gleichgewichtseinstellung des Adsorptionprozesses im betrachteten Zeitfenster bedingt, resultiert bei der Desorption ein mehr oder weniger linearer Abfall des Belegungsgrades. Umgekehrt bewirkt ein Wert von $10 \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ einen länger andauernden Adsorptionsvorgang, welcher im betrachteten Zeitfenster keinen Endwert erreicht, während der Desorptionsprozess bei einer Oberflächenbelegung von $\Theta \sim 0,5$ in die Sättigung führt.

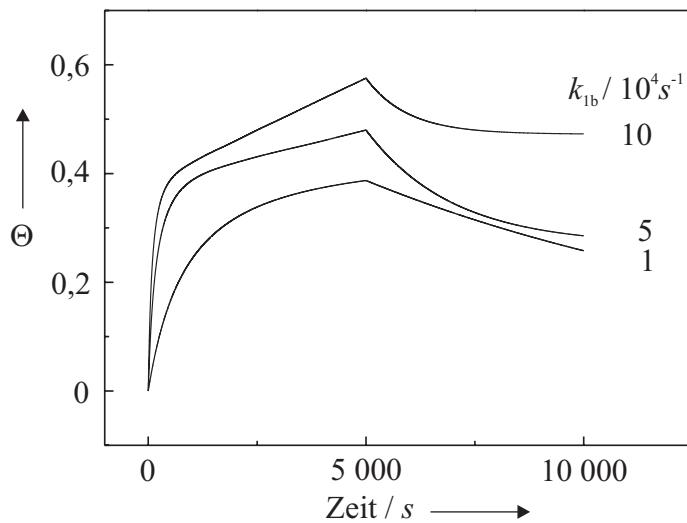


Abb. 4.11 Simulierte Adsorptions- und Desorptionsprozesse mit $k_{1b} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $10 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ unter Konstanthaltung von $c^* = 5$, $U_c = -5RT$, $k_{2f}^0 = 0,01 \text{ s}^{-1}$ und $J = 0,01$.

In Abb. 4.12 sind Kurvenverläufe gezeigt, bei welchen der Parameter U_c variiert wurde. Dabei entspricht ein negativer Wert einer positiven Kooperativität, während ein positiver Wert eine negative Kooperativität bedingt. Eine Erniedrigung von U_c ist deutlich anhand eines linearen Anstiegs im Adsorptionsprozess zu erkennen, der zu einer gesteigerten Oberflächenbelegung führt. Im Gegensatz hierzu ist bei positiven Werten ($U_c > 0$), also repulsiven Kräften, eine reversible Bindungskinetik zu beobachten. Betrachtet man den entsprechenden Desorptionsvorgang bei den verschiedenen Werten von U_c , so erkennt man, dass bedingt durch die attraktiven intermolekularen Kräfte ($U_c = -5RT$) der Desorptionsprozess zu einem weniger starken Abfall des Belegungsgrades führt, als dies bei repulsiven intermolekularen Kräften ($U_c = 5RT$) der Fall ist.

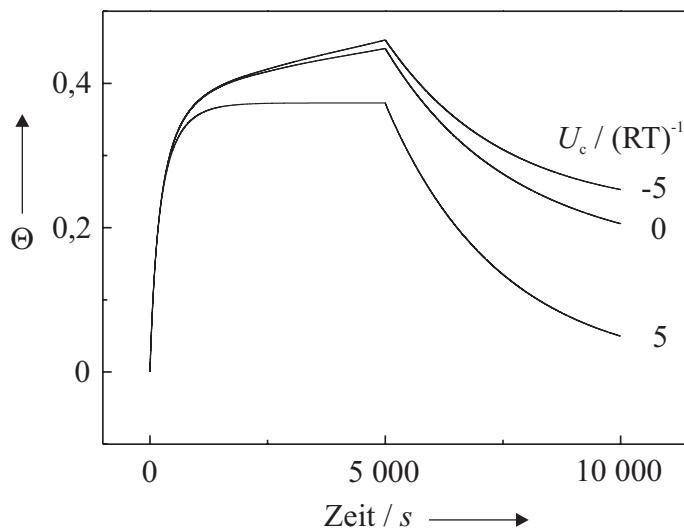


Abb. 4.12 Simulierte Adsorptions- und Desorptionskinetiken mit $U_c = -5RT, 0, 5RT$ unter Konstanthaltung von $c^* = 5$, $k_{2f}^0 = 0,01 \text{ s}^{-1}$, $J = 0,01$ und $k_{1b} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Durch Variation der Ratenkonstante der lateralen Proteinaddition auf der Oberfläche k_{2f}^0 ergeben sich die in Abb. 4.13 gezeigten Adsorptions- und Desorptionsverläufe. Hier sieht man, dass eine Erhöhung von k_{2f}^0 sowohl Einfluss auf die Adsorption als auch auf die Desorption hat. Zum einen resultiert im betrachteten Zeitfenster eine höhere Oberflächenbelegung, zum anderen wird die Desorption von Teilchen von der Oberfläche stark vermindert, sodass im Fall von $k_{2f}^0 = 0,1 \text{ s}^{-1}$ eine nahezu irreversible Bindung simuliert werden kann.

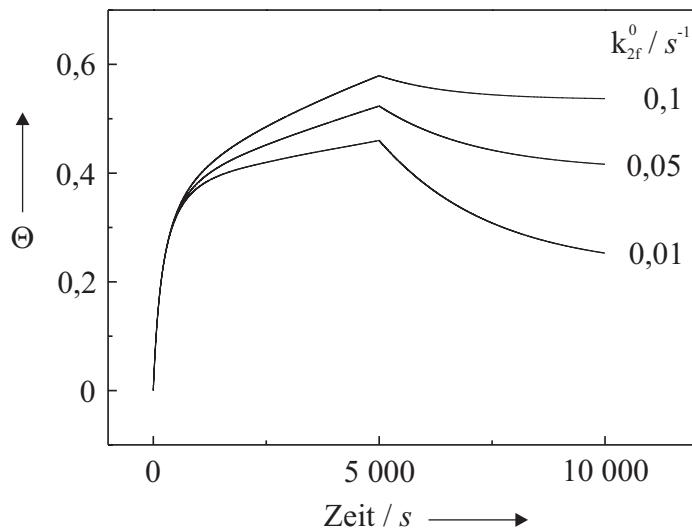


Abb. 4.13 Simulierte Adsorptions- und Desorptionsverläufe mit $k_{2f}^0 = 0,01 \text{ } s^{-1}$, $0,05 \text{ } s^{-1}$, $0,1 \text{ } s^{-1}$ unter Konstanthaltung von $c^* = 5$, $U_c = -5RT$, $J = 0,01$ und $k_{1b} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ } s^{-1}$.

Im folgenden Fall (Abb. 4.14) sind Kurvenverläufe dargestellt, bei denen der Parameter J , welcher die *piggyback*-Anlagerung bedingt, verändert wurde. Die simulierten Daten zeigen, dass die Variation dieses Parameters einen erheblichen Einfluss auf die Bindungskinetik hat. Eine Erhöhung von J bewirkt eine drastische Zunahme des Belegungsgrads einhergehend mit einer starken linearen Komponente im Adsorptionsprozess. Der Desorptionsprozess erfährt ebenfalls eine starke Änderung bei höheren Werten von J und zwar in der Weise, dass eine fast vollständig irreversible Bindung simuliert werden kann ($J = 0,05$).

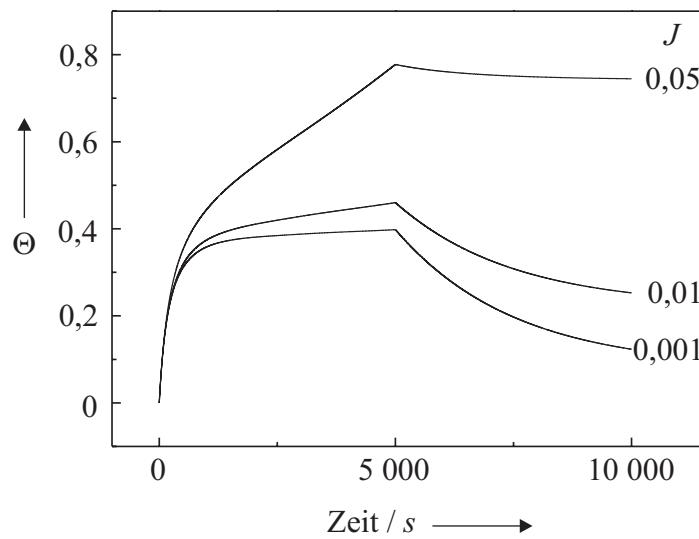


Abb. 4.14 Simulierte Adsorptions- und Desorptionskinetiken mit $J=0,001, 0,01, 0,05$ unter Konstanthaltung von $c^* = 5$, $U_c = -5RT$, $k_{2f}^0 = 0,01 \text{ s}^{-1}$ und $k_{1b} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Basierend auf den durchgeföhrten simulierten Bindungskinetiken wurde anhand des von Minton entwickelten kinetischen Modells einer kooperativen Bindung die Auswertung der QCM-Daten in Abschnitt 4.4 vorgenommen.

4.3 Impedanzspektroskopische Charakterisierung der festkörperunterstützten Membranen

Zur Untersuchung der Interaktion von Ezrin mit PIP₂ ist es notwendig, dass die verwendeten festkörperunterstützten Membranen vollständig und defektfrei ausgebildet werden. Deshalb wurden die artifiziellen Membranen mittels elektrischer Impedanzspektroskopie charakterisiert. Die Herstellung der Doppelschichten auf dem Quarzresonator erfolgte wie in Abschnitt 3.2.8 beschrieben. Zuerst wurde eine Oktanthiolmonoschicht (OT) an die Goldelektrode des Quarzes chemisorbiert⁹⁹ und anschließend unilamellare Vesikel auf der hydrophoben Oberfläche gespreitet, deren Fusion zur Ausbildung einer zweiten Monoschicht führte. Für jede einzelne Schicht wurde ein Impedanzspektrum (siehe Abschnitt 3.3.1) in einem Frequenzbereich von 0,1 bis 10⁶ Hz aufgezeichnet. Die Darstellung der Impedanzspektren erfolgte im Bodediagramm, wobei der Betrag der Impedanz $|Z|$ sowie die Phasenverschiebung φ als Funktion der angelegten Wechselspannungsfrequenz f aufgetragen sind. Basierend auf dem in Abb. 3.1 gezeigten Ersatzschaltbild wurden die Impedanzspektren durch nicht-lineare Kurvenanpassung ausgewertet.

In Abb. 4.15 ist ein typisches Impedanzspektrum einer OT-Monoschicht und einer OT – POPC / PIP₂ (97:3) Doppelschicht dargestellt. Man erkennt, dass die Impedanz im Bereich hoher Frequenzen frequenzunabhängig ist und keine Phasenverschiebung zwischen Spannung und Strom auftritt, da hier das Impedanzverhalten des Systems durch den Widerstand der Elektrolytlösung R_{el} bestimmt wird. In Richtung kleinerer Frequenzen bei einem Wert ab etwa 5·10³ Hz zeigt sich ein frequenzabhängiges Verhalten der Impedanz, ausgedrückt durch einen linearen Anstieg des Betrages der Impedanz und einer Phasenverschiebung φ von -90 °. Die Gesamtimpedanz wird in diesem Bereich von der Kapazität C_{m+el} , die sich aus der Membrankapazität C_m und der Kapazität der elektrochemischen Doppelschicht C_{el} zusammensetzt, dominiert. Da C_{el} typischerweise einen Wert von etwa 30 $\mu\text{F} / \text{cm}^2$ aufweist⁷⁴, wird die Gesamtkapazität C_{m+el} hauptsächlich durch die Membrankapazität C_m bestimmt.

Durch Anpassung der Parameter Ersatzschaltbildes aus Abb. 3.1 C) an die Daten ergibt sich eine spezifische Kapazität von 2,02 $\mu\text{F} / \text{cm}^2$ für die OT-Monoschicht und von 1,00 $\mu\text{F} / \text{cm}^2$ für die OT-Phospholipiddoppelschicht. Die statistische Auswertung von 20 unabhängigen Messungen lieferte einen Mittelwert für die

Kapazität der OT-Monoschicht von $(2,04 \pm 0,10) \mu\text{F} / \text{cm}^2$. Für die Kapazität der OT – POPC / PIP₂ (97:3) Doppelschicht ergab sich ein Mittelwert von $(1,08 \pm 0,07) \mu\text{F} / \text{cm}^2$. Die ermittelten Werte garantieren einen Belegungsgrad größer 99 %, welcher eine Voraussetzung für fehlerfreie Adsorptionsstudien ist¹⁰⁰. Membranen, die einen geringeren Belegungsgrad aufwiesen, wurden nicht für die QCM-Messungen verwendet.

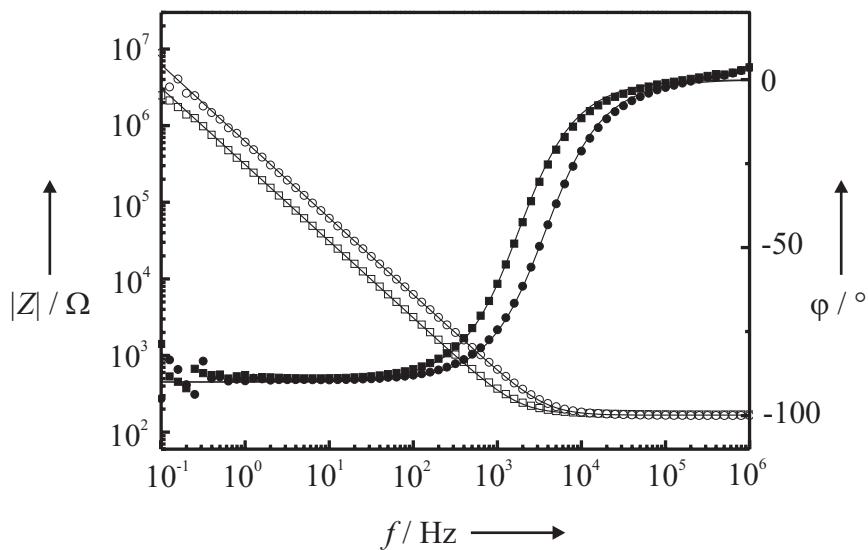


Abb. 4.15 Impedanzspektrum einer OT-Monoschicht (\square , ■) und einer OT-POPC / PIP₂ (97:3)-Doppelschicht (\circ , ●) in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4. Der Betrag der Impedanz $|Z|$ (\square , \circ), sowie die Phasenverschiebung φ (■, ●) sind als Funktion der angelegten Wechselspannungsfrequenz f aufgetragen. Durch Anpassung der Parameter des Ersatzschaltbildes aus Abb. 3.1 C an die Daten wurde für die Kapazität der Monoschicht ein Wert von $2,02 \mu\text{F} / \text{cm}^2$, für die Kapazität der Doppelschicht ein Wert von $1,00 \mu\text{F} / \text{cm}^2$ ermittelt (durchgezogene Linien).

4.4 Untersuchung der Membranbindungeigenschaften von Ezrin

Neben einer Reihe weiterer Eigenschaften von Ezrin ist bekannt, dass es über seine N-terminale Domäne mit dem Phospholipid PIP₂ interagiert^{20; 46}. Zur genaueren Untersuchung der Membranbindungeigenschaften von Ezrin wurden Vesikelassays, die Quarzmikrowaagetechnik sowie Rasterkraftmikroskopie * eingesetzt.

4.4.1 Wechselwirkung von N-ERMAD mit PIP₂-haltigen Membranen

4.4.1.1 Vesikelpelletierungsassays

Eine erste Charakterisierung der Wechselwirkung von N-ERMAD mit PIP₂ erfolgte mittels Vesikelbindungsstudien. Zu diesem Zweck wurden multilamellare POPC-Vesikel (MLV), die mit unterschiedlichen PIP₂-Gehalten dotiert waren, verwendet. Um den in natürlichen Membranen vorliegenden Gehalt an PIP₂ in den artifiziellen Modellmembranen zu repräsentieren, lag der PIP₂-Anteil in den Vesikeln zwischen 1 und 5 mol%. Alle Vesikelassays wurden in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4 durchgeführt, wobei die Proteinkonzentration 0,1 mg / mL und die Lipidkonzentration 0,5 mg / mL betrug. Die Durchführung der Vesikelassays erfolgte wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben. Dazu wurden MLV mit dem zu untersuchenden Protein 20 Minuten inkubiert, zentrifugiert und der resultierende Überstand (\ddot{U}_1) mittels SDS-PAGE analysiert. Um unspezifisch an die MLV gebundene Proteine zu entfernen, wurde das Pellet mit Puffer gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet (P), sowie der Überstand (\ddot{U}_2) wurde ebenfalls durch SDS-PAGE untersucht.

Da die Membranbindung von Ezrin über die N-terminale Domäne N-ERMAD vermittelt wird, wurde zunächst untersucht inwieweit eine spezifische Bindung zwischen N-ERMAD und PIP₂ detektierbar ist. In Abb. 4.16 ist das Ergebnis dieses Vesikelassays dargestellt, wobei MLV mit verschiedenen Lipidkompositionen eingesetzt wurden. Bei Verwendung von reinem POPC konnte kein N-ERMAD copelletiert werden, während ein steigender PIP₂-Gehalt der MLV in einer effektiveren Copelletierung resultierte. Anhand des SDS-Gels ist deutlich zu erkennen, dass bereits ab einem PIP₂-Gehaltes von 2 mol% der größte Teil des

* Alle rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen in dieser Arbeit wurden von Matthias Janke an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz durchgeführt.

Proteins an die Membran gebunden hat. Somit konnte gezeigt werden, dass die Bindung an PIP₂ spezifisch ist und über N-ERMAD erfolgt.

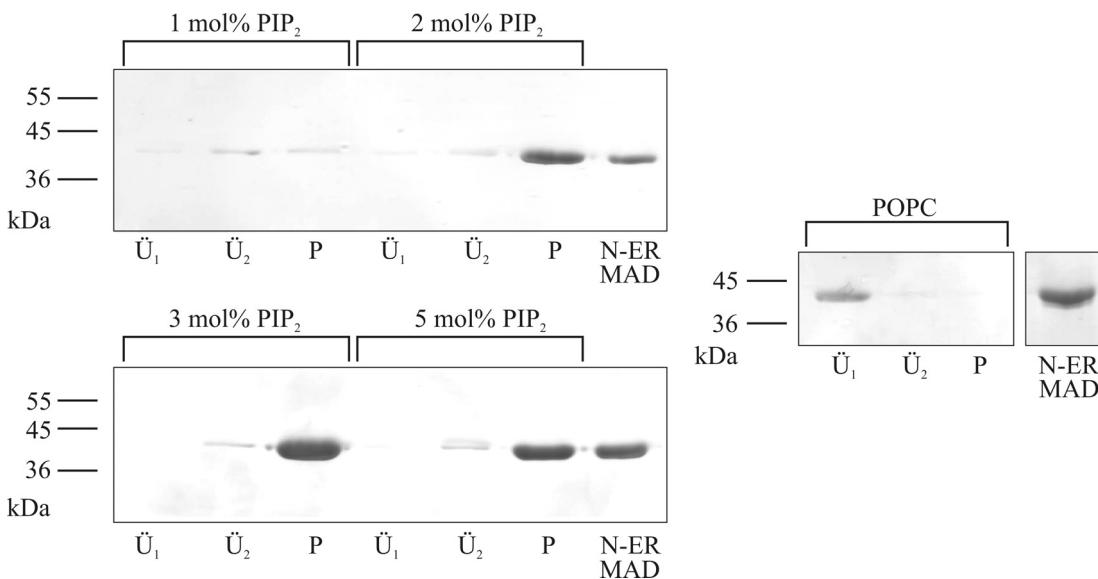


Abb. 4.16 SDS-PAGE-Analyse des Vesikelcopelletierungsassays von 0,1 mg / mL N-ERMAD mit 0,5 mg / mL multilamellaren POPC-Vesikeln, die mit der angezeigten Menge an PIP₂ dotiert waren. Der Assay wurde in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4 durchgeführt. Die Visualisierung der Überstände (\ddot{U}_1), Überstände nach dem Waschen (\ddot{U}_2) sowie des Pellets (P) erfolgte durch Coomassie Brilliant Blue. Zur eindeutigen Identifizierung wurde N-ERMAD ohne Inkubation mit Vesikeln aufgetragen.

4.4.1.2 QCM-Messungen

Durch den Einsatz der Quarzmikrowaagetechnik (QCM-Technik) erfolgte eine detailliertere Untersuchung der Wechselwirkung von N-ERMAD mit PIP₂. Hierzu wurden auf einem 5 MHz-Quarz immobilisierte Membranen verwendet, die aus einer Oktanthiolmonoschicht und aus einer zweiten Monoschicht, bestehend entweder aus reinem POPC oder aus POPC mit verschiedenen Anteilen an PIP₂ zusammengesetzt waren. Alle Messungen wurden in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4 durchgeführt. In Abb. 4.17 sind exemplarisch zeitaufgelöste Änderungen der Resonanzfrequenz $\Delta f = f(t) - f(t = 0)$ aufgetragen, welche aus der Zugabe von 0,12 μ M N-ERMAD (A) zu einer reinen POPC-Membran und zu einer POPC / PIP₂ (97:3)-Membran resultieren. Dabei stellt $f(t)$ die Frequenz zum Zeitpunkt t , $f(t = 0)$ die Frequenz zu Beginn der Messung dar. Bei einem PIP₂-Gehalt von 3 mol% resultiert eine Resonanzfrequenzänderung von $-(20,8 \pm 0,5)$ Hz und zeigt somit die erfolgreiche Adsorption von N-ERMAD an die Membran an. Im Gegensatz hierzu sind bei Zugabe von N-ERMAD zu einer reinen POPC-Membran

keine Frequenzänderungen zu detektieren. In Analogie zu den Ergebnissen der Vesikelassays ist eine eindeutige Spezifität von N-ERMAD zu PIP₂ nachweisbar.

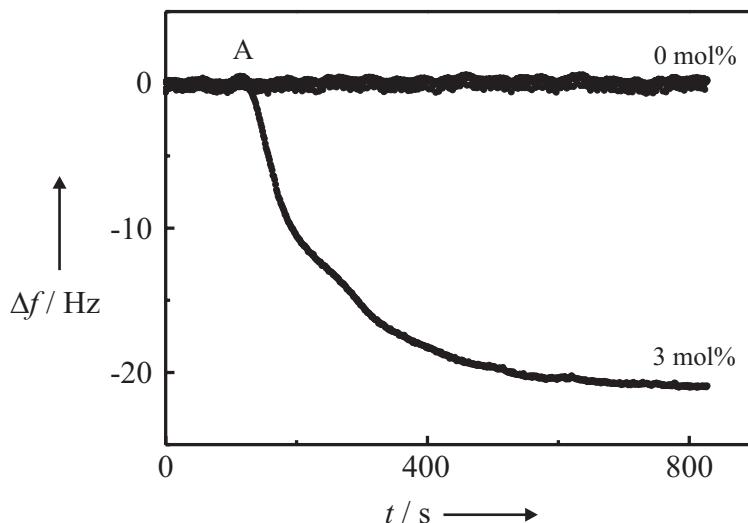


Abb. 4.17 Typische Änderungen der Resonanzfrequenz nach Zugabe von $0,12 \mu\text{M}$ N-ERMAD (A) zu einer festkörperunterstützten POPC und POPC / PIP₂ (97:3)-Membran in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4.

Abb. 4.18 zeigt die Adsorptionsisotherme von N-ERMAD, die sich aus den gemessenen Änderungen der Resonanzfrequenz im Gleichgewicht $-\Delta f_e$ bei verschiedenen N-ERMAD Konzentrationen ergibt. Dabei wurden die QCM-Messungen an festkörperunterstützten POPC / PIP₂ (97:3)-Membranen in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4 durchgeführt. Ab einer Proteinkonzentration von etwa $0,4 \mu\text{M}$ ist deutlich eine Sättigung der Oberfläche mit N-ERMAD zu erkennen, welche einer maximalen Frequenzänderung von etwa 31 Hz entspricht.

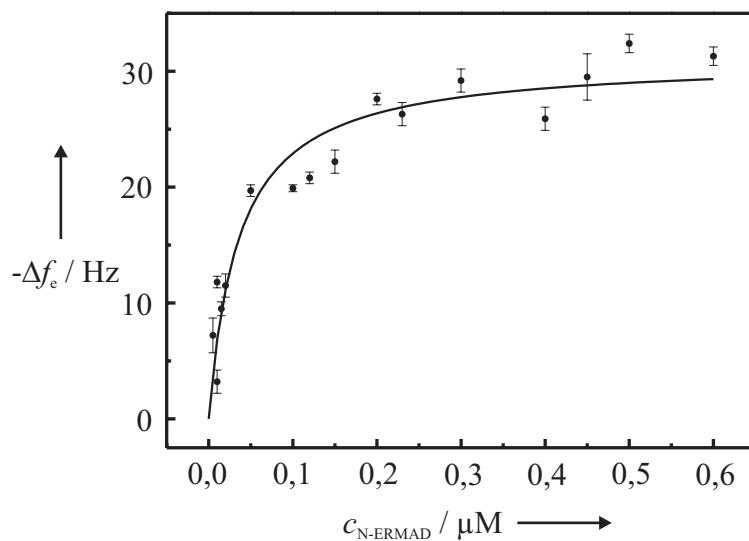


Abb. 4.18 Adsorptionsisotherme von N-ERMAD, gebunden an eine festkörperunterstützte POPC / PIP₂ (97:3)-Membran in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4.

Im Folgenden wurde die Reversibilität der Bindung von N-ERMAD an mit 3 mol% PIP₂ dotierten POPC-Membranen mittels der QCM-Technik untersucht. In Abb. 4.19 A) und B) sind zwei typische Frequenzverläufe dargestellt, bei welchen nach der Proteinadsorption (A) der Desorptionsprozess (B) durch Spülen des Systems mit Puffer induziert wurde. Im ersten Fall (A)) resultiert die Zugabe von 0,4 μM N-ERMAD in einer Frequenzänderung $-\Delta f_{\text{Ads}}$ von (26 ± 1) Hz. Nachdem die Messzelle mit Puffer gespült wurde, beträgt die Frequenzänderung $-\Delta f_{\text{Des}}$ (19 ± 1) Hz und zeigt somit an, dass ein Teil des Proteins irreversibel an der Membran gebunden bleibt. Neben diesen Messungen, die eine teilweise Reversibilität in Bezug auf die N-ERMAD - PIP₂ Bindung zeigten, wurden auch Messungen durchgeführt, bei denen nahezu keine Desorption stattfand (B)). Hier kann nach Zugabe von 0,05 μM N-ERMAD (A) zu der Membran eine Änderung der Resonanzfrequenz von $(20,3 \pm 0,5)$ Hz detektiert werden, die sich durch Spülen des Systems mit Puffer (B) nur unwesentlich ändert. Die beobachteten Desorptionsprozesse zeigen, dass ein Teil von N-ERMAD irreversibel an der Membran gebunden bleibt. Allerdings variierte der reversibel gebundene Anteil von N-ERMAD stark. So konnten bezogen auf den adsorbierten Proteinteil 1 bis 32 % des Proteins wieder abgelöst werden. Da das Rezeptorlipid PIP₂ homogen in der Membran verteilt ist [siehe Abb. 4.23 A)], also keine vorstrukturierten Lipiddomänen vorliegen, könnte der irreversibel gebundene Proteinanteil das Resultat einer lateralen positiven Kooperativität darstellen. Ein

weiterer Befund, der auf eine intermolekulare Interaktion des Proteins hindeutet, ist die Tatsache, wie auf Rasterkraftmikroskopie-Aufnahmen deutlich zu erkennen ist, dass N-ERMAD als etwa 1 nm hohe Proteinmonoschicht auf POPC / PIP₂ (97:3)-Membranen in Form von Domänen adsorbiert.

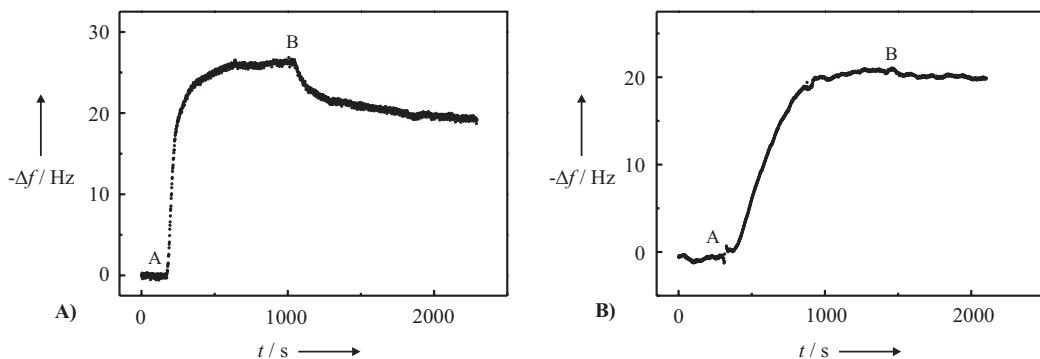


Abb. 4.19 Repräsentative, zeitaufgelöste Frequenzänderungen des Adsorptions- (A) und Desorptionsprozesses (B) von N-ERMAD unter Verwendung festkörperunterstützter POPC / PIP₂ (97:3)-Membranen in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4. **A)** Die Zugabe von 0,4 µM N-ERMAD ruft eine Frequenzänderung $-\Delta f_{\text{Ads}}$ von (26 ± 1) Hz hervor. Der durch die Desorption resultierende Endwert $-\Delta f_{\text{Des}}$ beträgt (19 ± 1) Hz. **B)** Die erzielte Frequenzänderung $-\Delta f_{\text{Ads}}$ nach Zugabe von 0,05 µM N-ERMAD erreicht $(20,3 \pm 0,5)$ Hz, während keine nennenswerte Desorption detektierbar ist.

Zur Verifizierung dieser Hypothese wurde versucht, mit Hilfe des von Minton entwickelten Modells die Adsorptions- und Desorptionsprozesse zu beschreiben. Dazu ist es erforderlich, die Frequenzänderungen der experimentellen Daten in den Oberflächenbelegungsgrad umzuwandeln. Hierbei wurde die aus der Adsorptionsisotherme ermittelte maximale Frequenzänderung von 31 Hz gleich einer maximalen Oberflächenbelegung von 70 % gesetzt. In Abb. 4.20 A) und B) sind die experimentellen Daten der QCM Messungen denen der simulierten gegenübergestellt. Die oberen Bereiche der Graphen zeigen die auf den Belegungsgrad skalierten QCM-Daten, die durch Messung der Adsorption von N-ERMAD auf POPC / PIP₂ (97:3)-Membranen in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4 erhalten wurden. Hierbei induzierte das Spülen des Systems mit Puffer die Desorption. Im unteren Bereich der Graphen sind die nach dem Minton-Modell simulierten Kurven gezeigt. Durch Variation der Parameter c^* , k_{1b} , U_c , k_{2f}^0 und J wurde versucht, eine möglichst gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten zu erreichen. Für alle simulierten Kurven wurde $J=0$ gesetzt, da auf den SFM Aufnahmen keine *piggyback*

Anlagerung beobachtet werden konnte. Wie der Vergleich der experimentell ermittelten Kurven mit den simulierten Kurven zeigt, war es nicht möglich die kinetischen Prozesse adäquat zu simulieren. Mit den Werten $c^* = 170$, $k_{1b} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $U_c = -0.1RT$ und $k_{2f}^0 = 0.03 \text{ s}^{-1}$ für die in A) dargestellte Kurve konnte der Adsorptionsprozess gut beschrieben werden, während der simulierte Desorptionsprozess eine große Abweichung zu den experimentellen Daten aufweist. In B) ist eine Kurve dargestellt, die eine gute Übereinstimmung der Simulation mit dem Desorptionsprozess unter Verwendung von $c^* = 40$, $k_{1b} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $U_c = -5RT$ und $k_{2f}^0 = 0.03 \text{ s}^{-1}$ liefert. Im Gegensatz dazu wird hier der Adsorptionsvorgang nur ungenügend beschrieben.

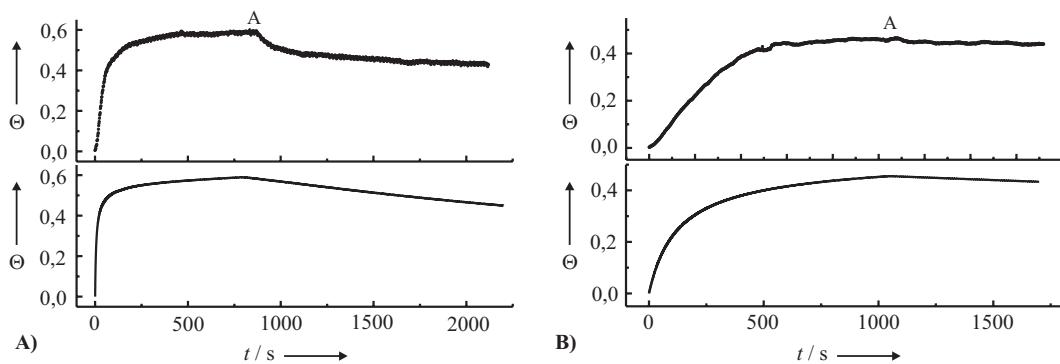


Abb. 4.20 Experimentelle (oberer Teil) und simulierte (unterer Teil) Adsorptions- und Desorptionsverläufe von N-ERMAD an POPC / PIP₂ (97:3)-Membranen in Ezrinpuffer. Die applizierte Proteinkonzentration war **A)** 0,40 μM und **B)** 0,05 μM . Durch Spülen mit Puffer (A) wurde der Desorptionsprozess induziert. Die gemessenen Änderungen der Resonanzfrequenz wurden unter der Annahme, dass eine maximale Frequenzänderung von 31 Hz einer Proteinbelegung von 70 % entspricht in die entsprechende Oberflächenbelegung umgerechnet. Simulationsparameter: **A)** $c^* = 170$, $k_{1b} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $U_c = -0.1RT$, $k_{2f}^0 = 0.03 \text{ s}^{-1}$, $J = 0$ und **B)** $c^* = 40$, $k_{1b} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $U_c = -5RT$, $k_{2f}^0 = 0.03 \text{ s}^{-1}$, $J = 0$.

4.4.2 Wechselwirkung von Ezrin mit PIP₂-haltigen Membranen

4.4.2.1 Vesikelpelletierungsassays

Um zu vergleichen, ob Ezrin eine ähnliche Spezifität wie N-ERMAD für das Phospholipid PIP₂ aufweist, wurde in Analogie zu den Versuchen mit N-ERMAD ein Vesikelassay durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde 0,1 mg / mL Ezrin an 0,5 mg / mL multilamellare POPC-Vesikel bzw. an PIP₂ dotierte POPC-Vesikel in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4 gebunden. Die anschließende Zentrifugation trennte nicht gebundenes Protein ab (\bar{U}_1). Das

resultierende Pellet wurde mit Puffer gewaschen und die Vesikelsuspension erneut zentrifugiert. Der Überstand (\ddot{U}_2) sowie das Pellet (P) wurden ebenfalls mittels SDS-PAGE untersucht. Abb. 4.21 zeigt das Ergebnis des Vesikelassays, wobei der PIP_2 -Gehalt der Vesikel zwischen 0 und 5 % variierte. Es ist deutlich zu erkennen, dass keine Bindung zwischen Ezrin und reinen POPC-Vesikeln stattfindet. Mit steigender PIP_2 -Konzentration ist ein erhöhter Anteil von gebundenem Ezrin detektierbar. Im Unterschied zu N-ERMAD ist ein PIP_2 -Gehalt von 1 und 2 % noch nicht ausreichend, um signifikante Mengen von Ezrin irreversibel an die Vesikel zu binden. Erst ab einer PIP_2 -Konzentration von 3 % ist eine deutliche Ezrinbande im SDS-Gel zu erkennen, die ab 5 % noch intensiver in Erscheinung tritt und so die Spezifität von Ezrin mit PIP_2 belegt.

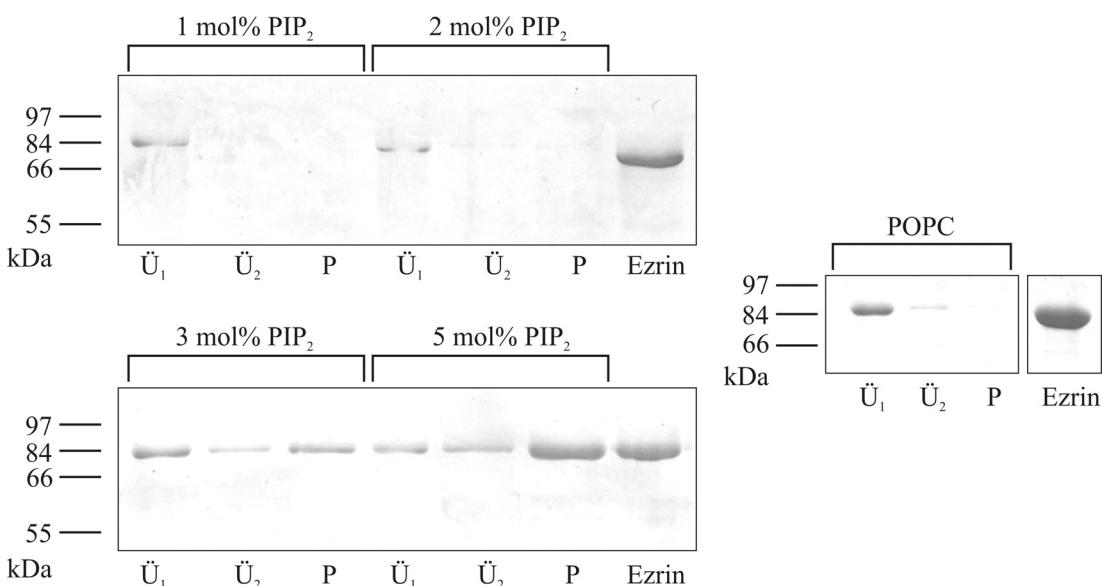


Abb. 4.21 SDS-PAGE-Analyse des Vesikelcopelletierungsassays von 0,1 mg / mL Ezrin mit 0,5 mg / mL multilamellaren POPC Vesikeln, die mit der angezeigten Menge an PIP_2 dotiert waren. Der Assay fand in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN_3 , pH 7,4 statt. Überstände (\ddot{U}_1), Überstände nach Waschen (\ddot{U}_2) sowie Pellets (P) wurden durch Coomassie Brillant Blue visualisiert. Zur eindeutigen Identifizierung wurde Ezrin ohne Inkubation mit Vesikeln aufgetragen.

4.4.2.2 QCM- und SFM-Messungen

Um den Einfluss des PIP_2 -Gehaltes auf die Adsorption von Ezrin detaillierter zu untersuchen, wurde die Bindung zum einen mittels der QCM-Technik quantifiziert, zum anderen durch Rasterkraftmikroskopie (SFM, *scanning force microscopy*) visualisiert. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten QCM-Messungen kamen festkörperunterstützte Membranen zum Einsatz, die auf einem 5 MHz-Quarz

immobilisiert waren. Dabei bestanden die Membranen aus einer chemisorbierten Oktanthiolmonoschicht, auf welcher eine zweite Monoschicht aus reinem POPC oder aus PIP₂ dotiertem POPC gespreitet wurde. Abb. 4.22 A) zeigt typische Änderungen der Resonanzfrequenz, die aus der Zugabe von 0,1 µM Ezrin in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4 resultieren. Die Abnahme der Resonanzfrequenz ist proportional zur adsorbierten Masse von Ezrin. Die Änderung der Frequenz Δf ist dabei definiert als Differenz zwischen der momentanen Frequenz $f(t)$ und der Frequenz zum Zeitpunkt $f(t = 0)$. Die größte Belegung der Membran mit Ezrin konnte bei einem PIP₂-Gehalt von 10 mol% beobachtet werden. Die Reduzierung der PIP₂-Konzentration führte zu einer Erniedrigung der Frequenzänderung und zeigt somit eine geringere Menge an gebundenem Ezrin an. Ein PIP₂-Gehalt von 0,5 und 1 mol% resultierte in nahezu gleichen Frequenzänderungen, während bei reinen POPC-Membranen keine Änderung der Resonanzfrequenz detektiert werden konnte. In Analogie zu den durchgeföhrten Vesikelassays konnte mit den QCM-Messungen die Spezifität von Ezrin für das Rezeptorlipid PIP₂ bestätigt werden. In Abb. 4.22 B) sind die Ergebnisse der QCM-Messungen zusammengefasst dargestellt. Dabei wurden die Mittelwerte $-\Delta f_e$ 20 Minuten nach der Proteinzugabe zu (42 ± 1) Hz ($n = 3$) für 10 mol% PIP₂, $(27,6 \pm 0,3)$ Hz ($n = 7$) für 3 mol% PIP₂, $(14,7 \pm 0,3)$ Hz ($n = 6$) für 2 mol% PIP₂, $(3,6 \pm 0,5)$ Hz ($n = 5$) für 1 mol% PIP₂ und $(4,9 \pm 0,5)$ Hz ($n = 4$) für 0,5 mol% PIP₂ bestimmt ($n \equiv$ Anzahl der QCM-Messungen).

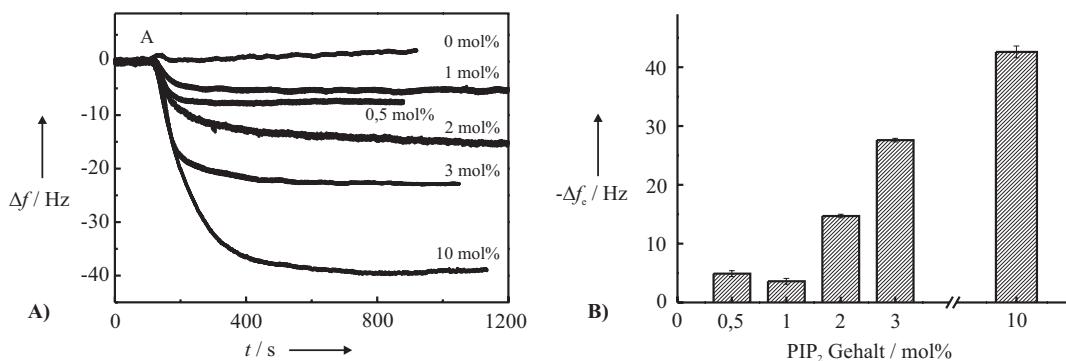


Abb. 4.22 A) Typische Resonanzfrequenzänderungen, die nach einer Zugabe von 0,1 µM Ezrin (A) zu POPC-Membranen mit verschiedenen PIP₂-Gehalten in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4 resultieren. **B)** Δf_e -Mittelwerte nach Zugabe von 0,1 µM Ezrin zu PIP₂-dotierten Membranen in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4.

In einem nächsten Schritt sollte die molekulare Anordnung des Proteins auf der Membran in Abhängigkeit des PIP₂-Gehaltes untersucht werden. Aus diesem Grund wurden SFM-Messungen durchgeführt. Dazu wurden mit PIP₂ dotierte POPC-Vesikel auf oxidierte, hydrophilisierte Siliziumplättchen gespreitet. Die Ausbildung der festkörperunterstützten Membran wurde mittels SFM visualisiert [Abb. 4.23 A)]. Eine glatte und gleichmäßige Oberfläche zeigt die Ausbildung der Membran und eine homogene Verteilung des Rezeptorlipids PIP₂ an. Es konnte keine Domänenbildung von Lipiden beobachtet werden. Die Höhenanalyse kleiner Defektstellen in der Membran [Abb. 4.23 A')] ergab eine Höhe von 4 – 5 nm und weist so die Existenz der Doppelschicht nach. Nach der Verifizierung der Membranbildung wurden 1 µM Ezrin appliziert und zu verschiedenen Zeiten SFM-Bilder aufgenommen. Im Vergleich zu den QCM-Messungen erfolgte die Proteinadsorption bei den SFM-Messungen relativ langsam, da es sich hier um einen diffusions-limitierten Prozess handelt. Deshalb wurde der Adsorptionsprozess als abgeschlossen betrachtet, wenn keine weitere Proteinanlagerung mit dem SFM detektiert werden konnte. In Abb. 4.23 B) bis F) sind repräsentative topographische Aufnahmen von Membranen unterschiedlichen PIP₂-Gehalts nach der Ezrinadsorption dargestellt. Bei niedrigen PIP₂-Konzentrationen ist die Membran nur teilweise mit Protein bedeckt. Hier sind Proteindomänen erkennbar, deren Höhe basierend auf Histogrammanalysen einen Wert von $(1,8 \pm 0,2)$ nm aufweisen. Da bei Adsorptionsbeginn von Ezrin keine Lipiddomänen in der Membran existierten, kann die Bildung der Proteinaggregate auf eine positive laterale Interaktion zwischen den Ezrinmolekülen zurückzuführen sein. Eine Erhöhung des PIP₂-Gehalts ruft in Übereinstimmung mit den QCM-Ergebnissen eine höhere Belegung der Membran mit Protein hervor. Eine nahezu komplette Belegung der Membran mit Ezrin wurde bei einem PIP₂-Gehalt von 3 mol% beobachtet, während ein weiterer Anstieg der PIP₂-Konzentration auf 10 mol% in einer höheren Proteinbelegung der Membran resultierte. Die Ausbildung einer Proteinmonoschicht wurde mittels Höhenanalyse bestätigt. Das Höhenprofil, welches in Abb. 4.23 F') dargestellt ist, zeigt einen Defekt in der Proteinschicht, die auf einer intakten Membran adsorbiert ist. Dabei ergibt sich ein Wert für die Höhendifferenz von etwa 2 – 3 nm, welche im Einklang mit einer monomolekularen Anordnung des Proteins steht¹⁷.

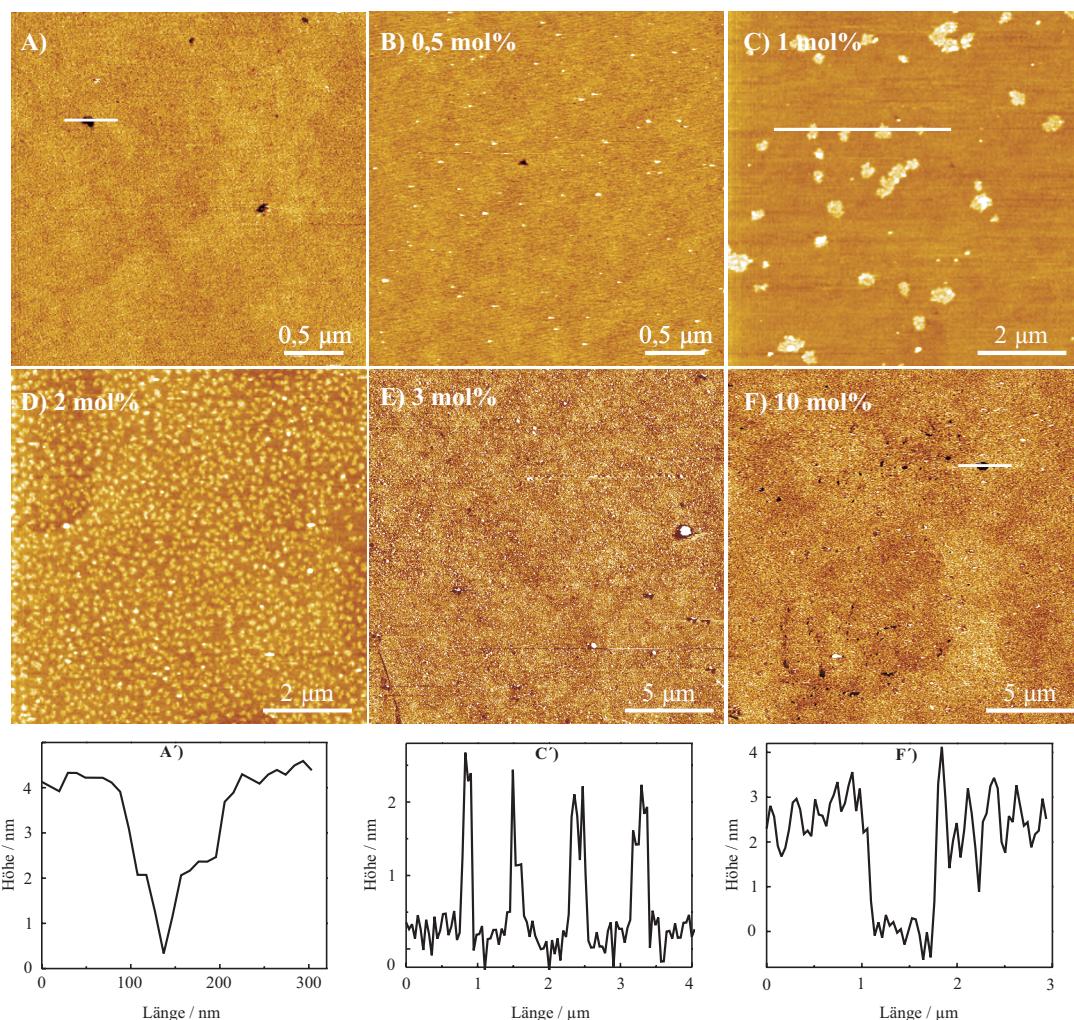


Abb. 4.23 SFM-Aufnahmen (*TappingMode*), welche die Topographie von festkörperunterstützten POPC-Membranen mit variiertem PIP₂-Gehalt in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4 darstellen. **A)** Membran mit 3 mol% PIP₂ vor der Proteinzugabe. **A')** Höhenprofil entlang der in A) gezeigten Linie. Membranen mit **B) 0,5 mol% PIP₂**, **C) 1 mol% PIP₂**, **D) 2 mol% PIP₂**, **E) 3 mol% PIP₂** und **F) 10 mol% PIP₂** nach der Zugabe von 1 μM Ezrin. In **C')** und **F')** sind die korrespondierenden Höhenprofile entlang der Linien in C) und F) gezeigt.

Mittels Pixelanalyse der topographischen Aufnahmen ist in Abb. 4.24 die Proteinbelegung der Membran in Abhängigkeit des PIP₂-Gehalts dargestellt. Die Ergebnisse stehen in gutem Einklang zu denen, die mit der QCM-Technik erzielt wurden. Bei einer PIP₂-Konzentration von 0,5 und 1 mol% tritt eine fast identische Proteinbelegung auf. Mit steigendem PIP₂-Gehalt in der Membran erhöht sich die Proteinbelegung der Oberfläche bis zu einem Maximum von 70 %.

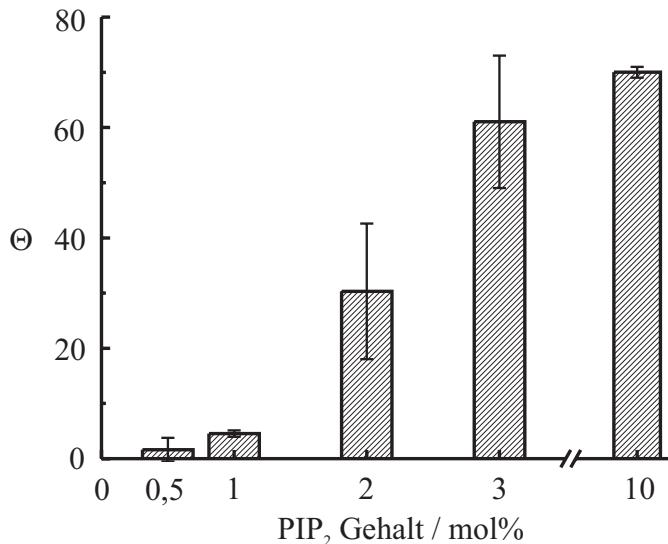


Abb. 4.24 Durchschnittliche Ezrinbelegung der Membran in Abhängigkeit des PIP₂-Gehalts. Die einzelnen Mittelwerte wurden durch Pixelanalyse von mindestens vier Aufnahmen ermittelt.

Reversibilität der Ezrin Adsorption

Als ein Membran-Zytoskelett verknüpfendes Protein spielt Ezrin eine entscheidende Rolle bei der Bindung von Aktinfilamenten an die Plasmamembran. Zur Ausübung einer solchen Funktion ist die Reversibilität der Bindung ein ausschlaggebender Faktor. Aus diesem Grund erfolgte eine detaillierte Untersuchung der Reversibilität der Ezrinadsorption durch QCM und SFM. Um den Gehalt von PIP₂ in natürlichen Membranen zu reflektieren, wurde bei den nachfolgenden Messungen mit einem PIP₂-Gehalt von 3 mol% gearbeitet. Abb. 4.25 zeigt exemplarisch eine durch die QCM ermittelte zeitaufgelöste Adsorption und Desorption, die aus der Zugabe von 0,3 µM Ezrin zu einer festkörperunterstützten POPC / PIP₂ (97:3)-Membran in 20 mM Trsi/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4 resultiert. Die Proteinzugabe (A) führt zu einer Erniedrigung der Resonanzfrequenz um (39 ± 1) Hz und zeigt so die erfolgreiche Adsorption von Ezrin an die Membran an. Nach 1100 Sekunden wurde das gesamte System mit reinem Puffer gespült (B), um die Ezrindesorption zu initiieren. Der beobachtete Desorptionsprozess, gekennzeichnet durch einen Anstieg der Resonanzfrequenz offenbart, dass Ezrin teilweise an der Membran gebunden bleibt. Die Betrachtung mehrerer Desorptionsexperimente lieferte das Ergebnis, dass bei gleicher Ezrinkonzentration unterschiedliche Mengen an Protein adsorbiert wie desorbiert wurden. Beispielsweise ergab eine Zugabe von 0,1 µM Ezrin eine Änderung der Resonanzfrequenz im Bereich von 23 bis 32 Hz, während die durch die Desorption verursachten Frequenzänderungen Werte von 4 bis

17 Hz annahmen. Aufgrund der Tatsache, dass PIP_2 homogen in der Membran verteilt ist, also keine Lipiddomänen existieren, wurde angenommen, dass der irreversibel gebundene Proteinanteil durch eine positiv kooperative, laterale Interaktion der Ezrinmoleküle mit der Membran hervorgerufen wird.

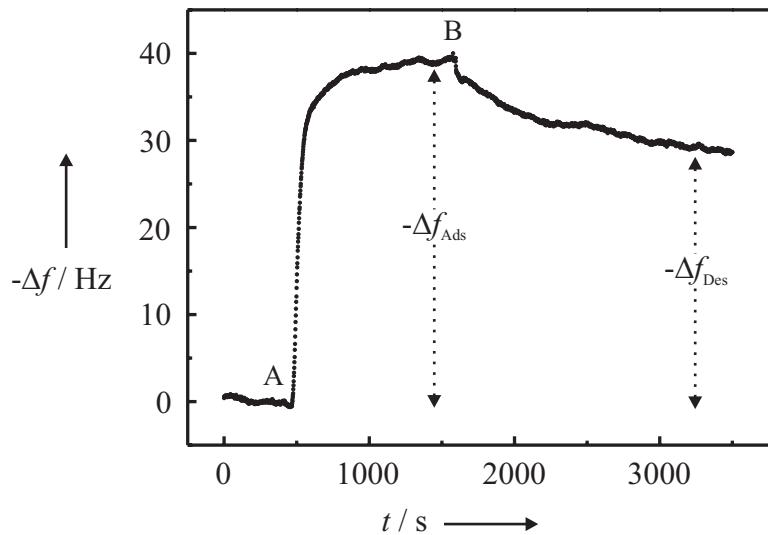


Abb. 4.25 QCM-Messung an einer festkörperunterstützten POPC / PIP_2 (97:3)-Membran in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN_3 , pH 7,4 nach Zugabe von 0,3 μM Ezrin (A) und anschließender Desorption des Proteins (B). Die durch die Proteinadsorption hervorgerufene Frequenzänderung $-\Delta f_{\text{Ads}}$ beträgt (39 ± 1) Hz. Der durch die Desorption resultierende Endwert $-\Delta f_{\text{Des}}$ ist (29 ± 1) Hz.

Zur weiteren Verifizierung wurden zeitaufgelöste SFM-Messungen durchgeführt. In Abb. 4.26 sind die resultierenden topographischen Aufnahmen zusammengefasst. Hierbei ist anzumerken, dass die Ezrinhonzentration nach einer Inkubationszeit von zwölf Stunden von 0,35 μM auf 1,5 μM erhöht wurde. Insgesamt lässt sich beobachten, dass es ausgehend von einigen Proteindomänen zu einer Ausbildung einer vollständigen Ezrinmonoschicht kommt, bedingt durch intermolekulare attraktive Kräfte der Proteine auf der Membran.

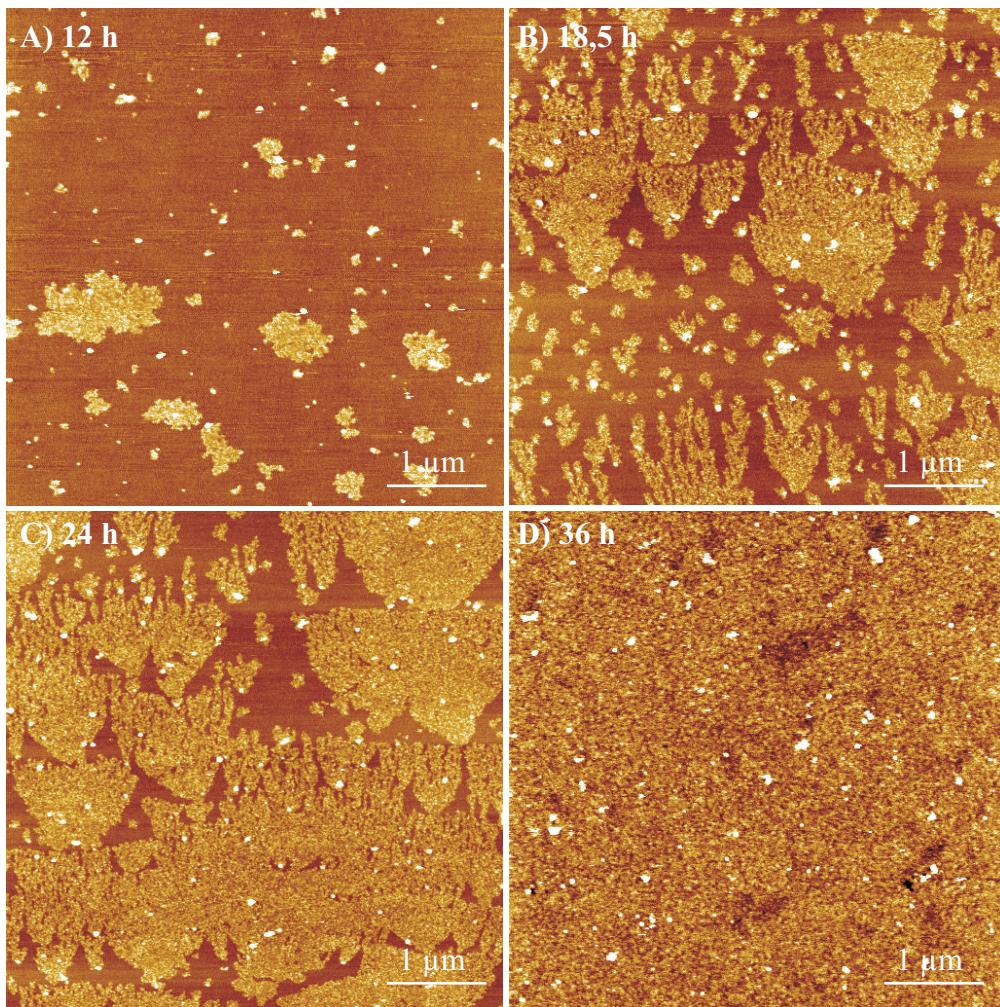


Abb. 4.26 Zeitaufgelöste SFM-Aufnahmen (*TappingMode*), welche die Topographie von POPC / PIP₂ (97:3)-Membranen nach der Zugabe von Ezrin zeigen. **A)** 12 Stunden nach der Applikation von 0,35 μM Ezrin. Aufnahmen nach **B)** 18,5 Stunden, **C)** 24 Stunden und **D)** 36 Stunden Inkubationszeit mit 1,5 μM Ezrin.

Basierend auf den erzielten Resultaten wurden im Folgenden die durch die QCM gemessenen Adsorptions- und Desorptionskinetiken mittels des von Minton entwickelten kooperativen Modells beschrieben. Eine theoretische Beschreibung des Modells findet sich in Abschnitt 4.2. Abb. 4.27 A) bis C) zeigt repräsentative Zeitverläufe, wobei im oberen Teil die experimentellen Daten, im unteren Teil die simulierten Kurven dargestellt sind. Die durch die QCM gemessenen Zeitverläufe wurden alle unter Verwendung festkörperunterstützter POPC / PIP₂ (97:3)-Membranen in Ezrinpuffer ermittelt. Der Zeitpunkt, an welchem das System mit Puffer gespült wurde, ist durch den Buchstaben A gekennzeichnet. Um die experimentellen Daten mit den simulierten vergleichen zu können, ist es notwendig die Frequenzänderungen der QCM in die Oberflächenbelegung umzurechnen. Dies wurde erreicht, indem die mit dem Rasterkraftmikroskop maximal erzielte

Oberflächenbelegung von 70 % gleich der maximal detektierten Resonanzfrequenzänderung von -43 Hz gesetzt wurde. Durch die Variation der Parameter c^* , k_{1b} , U_c , k_{2f}^0 und J wurden solange Kurven simuliert bis eine gute Übereinstimmung mit den experimentell gemessenen Kurven resultierte. Um die positive Kooperativität der Ezrinadsorption zum Ausdruck zu bringen, nahm U_c für alle Simulationen einen Wert von $-5RT$ ein. Basierend auf den SFM-Messungen, welche die Ausbildung einer Proteinmonoschicht zeigen, wurde zunächst keine *piggyback*-Anlagerung erlaubt, also der Parameter $J=0$ gesetzt. Die Variation der anderen Parameter lieferte die in Abb. 4.27 A) und B) gezeigten Kurven. Dabei wurden für Kurve A) $c^* = 13$, $k_{1b} = 3,5 \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$, $k_{2f}^0 = 0,015\text{ s}^{-1}$ und für Kurve B) $c^* = 200$, $k_{1b} = 10 \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$, $k_{2f}^0 = 0,025\text{ s}^{-1}$ verwendet. Man erkennt deutlich, dass die simulierten Kurven gut mit den experimentellen Daten übereinstimmen. Aufgrund dessen eignet sich das gewählte Modell zur Beschreibung der Adsorption und Desorption von Ezrin. Bei einigen QCM-Messungen konnte ein linearer Ansteig der Oberflächenbelegung während des Adsorptionsprozesses beobachtet werden (C)), der durch Spülen der Messzelle mit Puffer gestoppt werden konnte. In diesen Fällen ließen sich die experimentellen Daten am besten mit simulierten Kurven beschreiben, bei denen ein geringer Teil des Domänenwachstums über die *piggyback* Anlagerung zugelassen wurde. Durch die Verwendung von $c^* = 5$, $k_{1b} = 7 \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$, $k_{2f}^0 = 0,08\text{ s}^{-1}$ und mit einem relativ kleinen Wert von $5 \cdot 10^{-4}$ für J resultiert die in Abb. 4.27 C) dargestellte simulierte Kurve.

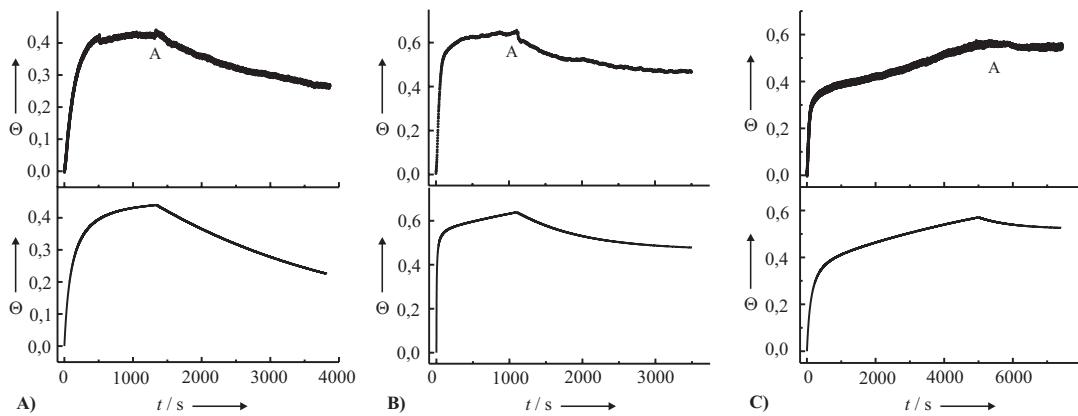


Abb. 4.27 Repräsentative Adsorptions- und Desorptionszeitverläufe von Ezrin im Vergleich mit simulierten Kurven. Die experimentellen Daten wurden durch QCM-Messungen an festkörperunterstützten POPC / PIP₂ (97:3)-Membranen in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4 gewonnen. Dabei betrug die Ezrinkonzentration **A**) 0,06 µM, **B**) 0,30 µM und **C**) 0,07 µM. Die Desorption wurde durch Spülen mit Puffer initiiert (A). Die gemessenen Frequenzänderungen wurden in die Proteinbelegung der Oberfläche umgerechnet unter der Annahme, dass eine maximale Frequenzänderung von -43 Hz einer maximalen Belegung von 0,7 entspricht. Der jeweils obere Graph zeigt die experimentellen Daten, der untere die simulierten Daten unter Verwendung der folgenden Parameter: $U_c = -5RT$ und **A)** $c^* = 13$, $k_{2f}^0 = 0,015 \text{ s}^{-1}$, $J = 0$, $k_{1b} = 3,5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; **B)** $c^* = 200$, $k_{2f}^0 = 0,025 \text{ s}^{-1}$, $J = 0$, $k_{1b} = 10 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; **C)** $c^* = 5$, $k_{2f}^0 = 0,08 \text{ s}^{-1}$, $J = 5 \cdot 10^{-4}$, $k_{1b} = 7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Zur weiteren Validierung des gewählten Modells wurde eine Gleichgewichtsadsorptionsisotherme generiert, indem die Proteinkonzentration der Lösung unter Konstanthaltung der anderen Parameter ($k_{1b} = 9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $k_{2f}^0 = 0,05 \text{ s}^{-1}$, $K_1^{\text{Ads}} = 10^8 \text{ M}^{-1}$, $U_c = -5RT$, $J = 0$) variiert wurde. In Abb. 4.28 ist die so erhaltene, simulierte Isotherme zusammen mit den durch die QCM experimentell ermittelten Gleichgewichtsfrequenzänderungen bei verschiedenen Proteinkonzentrationen dargestellt. Dabei wurde die Adsorptionsisotherme unter Verwendung von POPC / PIP₂ (97:3)-Membranen in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4 gemessen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der kinetischen Simulationen, war hier ebenfalls eine *piggyback*-Anlagerung untersagt, also $J = 0$ und, um den kooperativen Charakter der Bindung zu repräsentieren, $U_c = -5RT$ gesetzt. Zudem befinden sich die Werte der anderen Parameter in derselben Größenordnung wie die durch die kinetischen Simulationen ermittelten. Dabei wurden die Gleichgewichtswerte aus den Simulationen zu denselben Adsorptionszeitpunkten ermittelt, wie die aus den experimentellen Kurven. Der Vergleich der in Abb. 4.28 dargestellten, aus dem Minton Modell simulierten Kurve,

mit den experimentellen Daten unterstreicht eindeutig, dass eine kooperative Interaktion zwischen den Ezrinmolekülen dem Adsorptionsprozess zugrunde liegt.

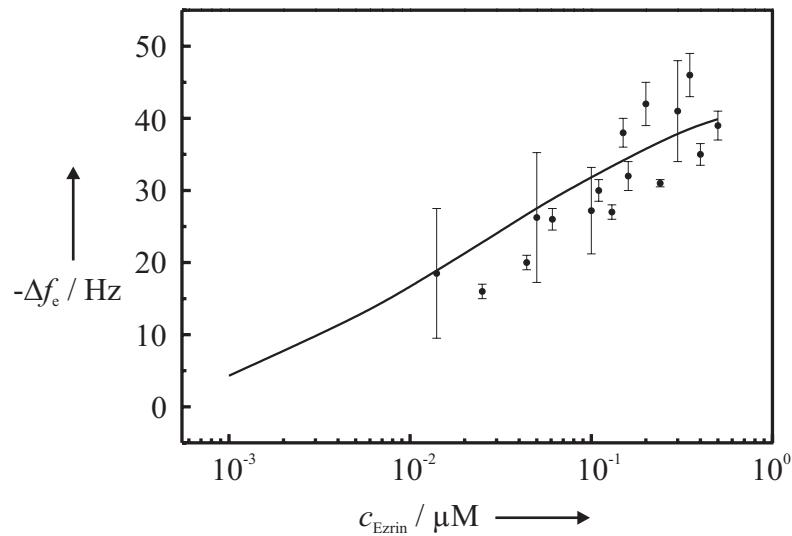


Abb. 4.28 Experimentelle (•) und simulierte (—) Adsorptionsisotherme von Ezrin. Die Adsorption erfolgte auf festkörperunterstützte POPC / PIP₂ (97:3)-Membranen in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4. Simulationsparameter: $k_{1b} = 9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $k_{2f}^0 = 0,05 \text{ s}^{-1}$, $K_1^{\text{Ads}} = 10^8 \text{ M}^{-1}$, $U_c = -5RT$, $J = 0$.

4.5 Interaktion von Ezrin mit S100P

Durch die intramolekulare Assozierung der N-terminalen (N-ERMAD) mit der C-terminalen (C-ERMAD) Domäne liegt Ezrin in einer inaktiven, auch als *dormant state* bezeichneten Konformation vor. In dieser Form ist die Bindungsstelle für die Aktinfilamente, die sich in C-ERMAD befindet, maskiert und Ezrin ist somit nicht befähigt, F-Aktin zu binden. Eine Dissozierung der beiden Domänen und eine damit einhergehende Aktivierung von Ezrin kann durch die Bindung von Ezrin an PIP₂ mit anschließender Phosphorylierung erfolgen⁴⁸. Dabei wird ein Threoninrest an Position 567 im C-terminalen Ende von Ezrin phosphoryliert. Eine erst kürzlich postulierte, alternative Aktivierung könnte aus der Ca²⁺-abhängigen Interaktion von Ezrin mit dem S100P Homodimer resultieren²⁹. S100P, das erstmals aus menschlicher Plazenta isoliert wurde^{101; 102}, ist ein Mitglied der S100 Proteinfamilie, die eine Klasse strukturell gut charakterisierter, relativ kleiner Proteine umfasst, für die das Auftreten zweier EF-Hand Ca²⁺-Bindungsstellen typisch ist³⁰. Die beiden EF-Hand-Bindungsstellen des S100P weisen unterschiedliche Affinitäten in Bezug auf die Ca²⁺-Bindung auf. Dabei besitzt die N-terminale EF-Hand-Bindungsstelle einen K_D-Wert von 0,8 mM, während die hoch affine Bindungsstelle im C-Terminus einen K_D-Wert von 1,6 μM aufweist¹⁰¹. Durch die Bindung der Ca²⁺-Ionen wird eine Konformationsänderung induziert, welche hydrophobe Bereiche an die Oberfläche des Proteins exponieren und sich verantwortlich für die Bindung von Interaktionspartnern zeigen¹⁰³. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wechselwirkung von Ezrin bzw. N-ERMAD mit S100P durch Vesikelpelletierungsassays und mikrogravimetrisch nachgewiesen werden und eine mögliche Aktivierung des Proteins untersucht werden.

4.5.1 Wechselwirkung von N-ERMAD mit S100P

Zunächst sollte die Interaktion von S100P mit N-ERMAD analysiert werden, da die Bindungsstelle für S100P in der N-terminalen Domäne von Ezrin lokalisiert ist. Dazu wurden Vesikelassays durchgeführt, um eine mögliche Copelletierung der beiden Proteine mit den Vesikeln zu untersuchen. In Anlehnung an die untersuchten Membranbindungeigenschaften von N-ERMAD wurden in allen Vesikelassays multilamellare, mit 3 mol% PIP₂ dotierte POPC-Vesikel verwendet. Da beide Proteine Ca²⁺-abhängig interagieren, wurde im Vergleich zu den vorangegangenen

Abschnitten ein leicht modifizierter Puffer verwendet, der statt EDTA 0,5 mM CaCl₂ enthielt, also folgende Zusammensetzung hatte: 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,5 mM CaCl₂, 1 mM NaN₃, pH 7,4. Dabei entspricht die gewählte Ca²⁺-Konzentration von 0,5 mM derjenigen, mit welcher die Interaktion von N-ERMAD und S100P dokumentiert wurde²⁹. In Abb. 4.29 A) ist das Ergebnis eines Vesikelassays dargestellt, bei dem jeweils 50 µg / mL N-ERMAD und S100P zeitgleich mit 0,5 mg / mL Vesikeln 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubierten. Nachfolgend wurde zentrifugiert, der Überstand abgenommen (\ddot{U}_1) und das Pellet mit Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Im Anschluss erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt und eine Analyse des resultierenden Pellets (P) sowie des Überstands (\ddot{U}_2) erfolgte mittels SDS-PAGE. Zur Identifizierung der Proteinproben sind reine N-ERMAD- bzw. S100P-Proben aufgetragen. Man erkennt deutlich, dass sich bei N-ERMAD die größte Intensität der Proteinbande im Pellet befindet, während S100P ausschließlich in den beiden Überständen detektierbar ist. Unter den gegebenen Bedingungen kann somit keine Interaktion zwischen N-ERMAD und S100P beobachtet werden. In einem weiteren Ansatz sollte überprüft werden, ob eine Copelletierung von S100P erreicht werden kann, wenn membrangebundenes N-ERMAD angeboten wird. Das Ergebnis dieses Vesikelassays wurde durch SDS-PAGE analysiert und ist in Abb. 4.29 B) dargestellt. Hier wurde zunächst N-ERMAD mit einer Konzentration von 0,1 mg / mL an 0,5 mg / mL MLV in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH 7,4 gebunden. Im Anschluss wurde der Überstand (\ddot{U}_1) entnommen und das resultierende Pellet mit Puffer gewaschen. Im Überstand des Waschvorgangs (\ddot{U}_2), sowie im ersten Überstand ist jeweils eine schwach ausgeprägte Bande, die N-ERMAD zugeordnet werden kann, zu erkennen. Das Vesikelpellet wurde im Folgenden in 0,5 mM Ca²⁺-haltigem Puffer resuspendiert, die Vesikellösung mit 0,1 mg / mL S100P 20 Minuten inkubiert und im Anschluss zentrifugiert. Im resultierenden Überstand (\ddot{U}_{1Ca}) und im Waschschritt (\ddot{U}_{2Ca}) tritt N-ERMAD in geringer, im Pellet (P_{Ca}) in hoher Intensität auf, was auf eine Bindung des Proteins an die MLV hinweist. Im Gegensatz hierzu ist S100P nur im Überstand bzw. im Waschschritt zu erkennen. Insgesamt ist sowohl an gelöstem, als auch an membrangebundenem N-ERMAD keine Interaktion mit S100P detektierbar.

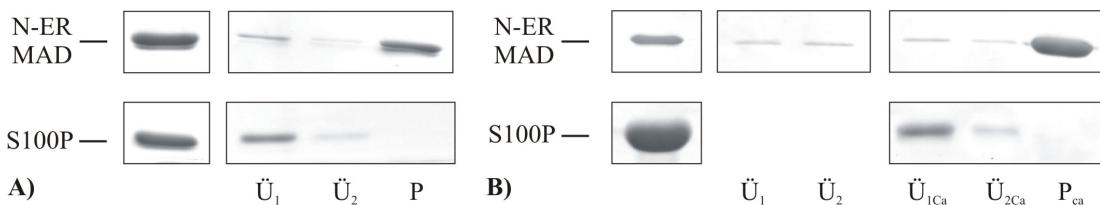


Abb. 4.29 SDS-PAGE Analyse eines Vesikelcopelletierungsassays zwischen N-ERMAD und S100P. **A)** Inkubation von N-ERMAD, S100P und MLV in 0,5 mM CaCl₂-haltigem Puffer. Ü₁: Überstand nach Zentrifugation. Ü₂: Überstand nach Waschschrift. P: Pellet. **B)** Zuerst erfolgte die Bindung von N-ERMAD an MLV in 0,1 mM EDTA haltigem Puffer. Ü₁: Überstand nach Zentrifugation. Ü₂: Überstand nach Waschschrift. Im Anschluss wurde auf 0,5 mM CaCl₂ haltigen Puffer gewechselt und die Vesikelsuspension mit S100P inkubiert. Ü_{1Ca}: Überstand nach Zentrifugation. Ü_{2Ca}: Überstand nach Waschschrift. P_{Ca}: Pellet.

Um einen möglichen Einfluss der relativ hohen Ca²⁺-Konzentration von 0,5 mM auf die Wechselwirkung von N-ERMAD mit S100P auszuschließen, wurden Vesikelassays durchgeführt, bei welchen der Puffer statt 0,5 mM 50 µM CaCl₂ enthielt. Dazu wurde zunächst 0,05 mg / mL N-ERMAD mit 0,5 mg / mL MLV in Ca²⁺-freiem Puffer (20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 50 µM CaCl₂, 1 mM NaN₃, pH 7,4) für 20 Minuten inkubiert, zentrifugiert und der resultierende Überstand (Ü₁) sowie der Überstand nach dem Waschschrift (Ü₂) mittels SDS-PAGE analysiert (Abb.4.30). Im ersten Überstand ist eine Bande mit sehr geringer Intensität erkennbar, während sich im zweiten Überstand kein Protein befindet. Im Anschluss wurde die in Ca²⁺-haltigem Puffer (20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 50 µM CaCl₂, 1 mM NaN₃, pH 7,4) resuspendierte Vesikellösung mit 0,05 mg / mL S100P versetzt, 20 Minuten inkubiert und zentrifugiert. In den Überständen nach den Zentrifugationen (Ü_{1Ca}, Ü_{2Ca}) ist kein N-ERMAD detektierbar. Stattdessen befindet sich im ersten Überstand eine deutliche S100P Proteinbande. Im Gegensatz zu S100P, das im Pellet (P_{Ca}) nicht auftritt, hat nahezu das gesamte eingesetzte N-ERMAD, erkennbar an der prägnant ausgeprägten Bande im Pellet, an die MLV gebunden. Somit kann auch bei einer Ca²⁺-Konzentration von 50 µM keine Interaktion von N-ERMAD mit S100P beobachtet werden.

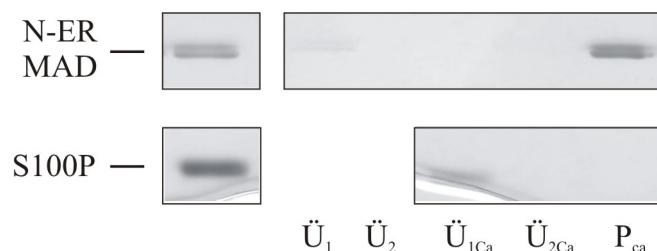


Abb. 4.30 SDS-PAGE-Analyse eines Vesikelcopelletierungsassays zwischen N-ERMAD und S100P. Zuerst erfolgte die Bindung von N-ERMAD an MLV in 0,1 mM EDTA haltigem Puffer. Ü₁: Überstand nach Zentrifugation. Ü₂: Überstand nach Waschschnitt. Im Anschluss wurde auf 50 µM CaCl₂-haltigen Puffer gewechselt und die Vesikel suspension mit S100P inkubiert. Ü_{1Ca}: Überstand nach Zentrifugation. Ü_{2Ca}: Überstand nach Waschschnitt. P_{ca}: Pellet.

Um die Wechselwirkung von N-ERMAD mit S100P nachzuweisen wurde im Folgenden die Quarzmikrowaage verwendet. Im Unterschied zu den Vesikelassays werden hier planare Modellmembranen eingesetzt. Möglicherweise könnte durch die Krümmung und den multilamellaren Charakter der Vesikel die Interaktion der beiden Interaktionspartner gestört worden sein. Neben diesen Aspekten bietet die QCM-Technik einen weiteren Vorteil, der darauf beruht, dass mit diesem System auch reversible Proteinwechselwirkungen detektiert werden können.

In einem ersten Schritt wurde dabei die Interaktion von membrangebundenem N-ERMAD mit S100P untersucht. Die Adsorption der Proteine erfolgte an eine festkörperunterstützte POPC / PIP₂ (97:3)-Membran. Um zu gewährleisten, dass die detektierten Resonanzfrequenzänderungen ausschließlich auf einer Protein-Protein-Interaktion beruhen, musste sichergestellt werden, dass keine unspezifische Adsorption von S100P an die Membran auftrat. Zu diesem Zweck wurde die Änderung der Resonanzfrequenz nach Zugabe von 0,14 µM (A) und anschließender Erhöhung auf 0,28 µM (B) S100P in 50 µM CaCl₂-haltigem Puffer verfolgt (Abb. 4.31). Nach der ersten Proteinzugabe ist eine Frequenzänderung von etwa -2 Hz beobachtbar, während nach der zweiten Zugabe kein weiterer Abfall der Resonanzfrequenz erfolgt. Es kann demzufolge eine unspezifische Adsorption von S100P an die Membran ausgeschlossen werden.

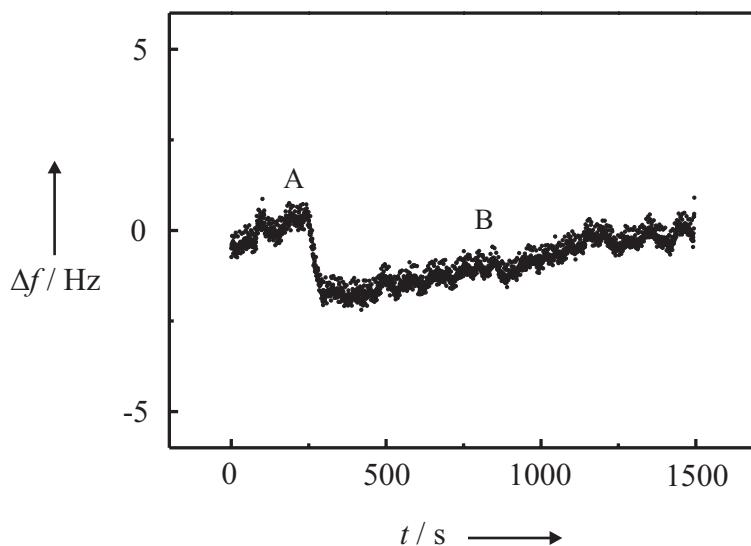


Abb. 4.31 QCM-Messung der Adsorption von S100P an eine festkörperunterstützte POPC / PIP₂ (97:3)-Membran in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 50 µM CaCl₂, 1 mM NaN₃, pH 7,4. Die Zugabe von 0,14 µM (A) und 0,28 µM S100P liefert keine signifikanten Frequenzänderungen.

In Abb. 4.32 ist der zeitliche Verlauf der Resonanzfrequenzänderung nach Zugabe von 0,09 µM N-ERMAD (A), anschließender Pufferspülung (B) und Addition von 0,37 µM S100P (C) in 0,5 mM CaCl₂-haltigem Puffer dargestellt. Die beobachtete Frequenzänderung von etwa -18 Hz zeigt die erfolgte Adsorption von N-ERMAD an die Membran an. Durch Spülen des Systems mit Puffer kommt es zu einem geringen Anstieg der Frequenz um 1 – 2 Hz, sodass gewährleistet ist, dass der größte Teil des Proteins an der Membran gebunden ist und sich kein Protein mehr in Lösung befindet. Die anschließende Zugabe von S100P resultiert in keiner wesentlichen Änderung der Resonanzfrequenz. Neben dem gezeigten Frequenzverlauf konnte in einigen Fällen auch ein mehr oder weniger starker linearer Abfall der Resonanzfrequenz nach der S100P-Zugabe beobachtet werden, ohne dass ein Endwert erreicht wurde. Insgesamt konnte aber unter den gewählten Bedingungen keine Interaktion von N-ERMAD mit S100P detektiert werden.

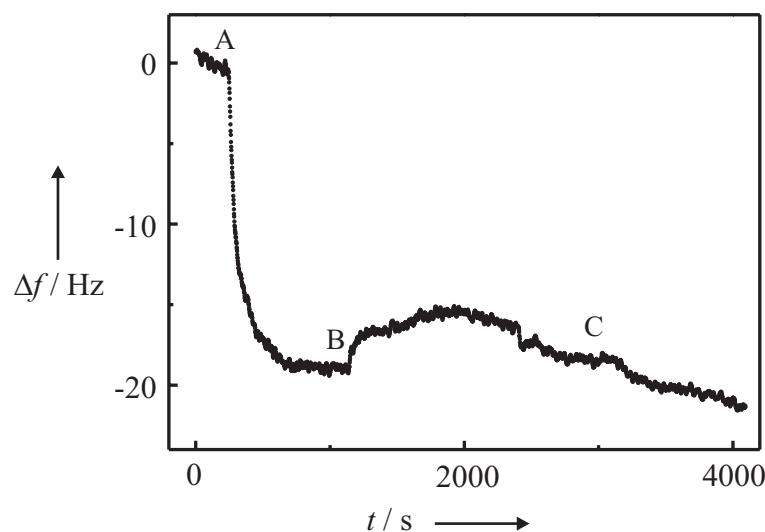


Abb. 4.32 QCM-Messung der Adsorption von S100P zu membrangebundenem N-ERMAD. Zu einer POPC / PIP₂ (97:3)-Membran wurde 0,09 μM N-ERMAD (A) in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,5 mM CaCl₂, 1 mM NaN₃, pH 7,4 gegeben. Nicht gebundenes Protein wurde durch Spülen aus dem System entfernt (B) und anschließend S100P in einer Konzentration von 0,37 μM appliziert.

Eine mögliche Ursache dafür, dass mit den durchgeführten Messungen keine Bindung zwischen N-ERMAD und S100P detektierbar war, könnte darin begründet sein, dass durch die Interaktion von N-ERMAD mit PIP₂ die Bindungstelle für S100P blockiert wird. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde im Folgenden zuerst S100P auf einer DOPC / Ni-NTA-DOGS (9:1)-Membran immobilisiert und anschließend N-ERMAD als Bindungspartner angeboten. Die Fixierung der S100P-Proteine an die Oberfläche erfolgte mittels der spezifischen Bindung des 6 × Histidin-*Tags* des Proteins an Ni-NTA-DOGS. Somit kann die Messung in einem PIP₂-freien System durchgeführt werden. Im Gegensatz zu S100P, wurde bei dem in diesen Versuchen eingesetzten N-ERMAD der Affinitäts-*Tag* proteolytisch durch Thrombin abgespalten. Dieser Schritt war notwendig, um eine Beeinflussung der Frequenzänderung durch Histidin getaggetes N-ERMAD auszuschließen.

In Abb. 4.33 A) ist das Ergebnis einer QCM-Messung dargestellt, bei welcher eine festkörperunterstützte Membran aus OT und DOPC / Ni-DOGS (9:1) in 0,5 mM Ca²⁺-haltigem Puffer eingesetzt wurde. Die Zugabe von 1,12 μM S100P (A) resultiert in einer Änderung der Resonanzfrequenz um -19 Hz und zeigt die Adsorption des Proteins auf die Oberfläche an. Eine Erhöhung der S100P-Konzentration auf 3,36 μM (B) liefert eine weitere Erniedrigung um etwa 2 Hz und führt zu einer

Frequenzänderung von -21 Hz. Nach dieser zweiten Proteinzugabe kann von einer maximalen Belegung der Oberfläche mit Protein ausgegangen werden. Um unspezifisch gebundenes und noch in Lösung befindliches Protein zu entfernen, wurde mit Puffer gespült (C), was einen geringen Anstieg der Frequenz um etwa $2\text{--}3$ Hz hervorruft. Die Applizierung von $0,01 \mu\text{M}$ N-ERMAD (D) und eine spätere Erhöhung auf $0,03 \mu\text{M}$ N-ERMAD (E) resultiert in keinem signifikanten Abfall der Resonanzfrequenz. Es ist also auch unter diesen Versuchsbedingungen keine Wechselwirkung von N-ERMAD mit S100P detektierbar.

Um die von Koltzscher et al. beschriebene spezifische Bindung von N-ERMAD und S100P nachzuweisen, wurden für die in Abb. 4.33 B) gezeigte QCM-Messung dieselben Puffersubstanzen verwendet, d.h. der eingesetzte Puffer war wie folgt zusammengesetzt: 30 mM HEPES , 25 mM Imidazol , 150 mM NaCl , 1 mM MgCl_2 , $0,5 \text{ mM CaCl}_2$, pH 7,3. Durch diesen Schritt sollte der Einfluss des Puffers auf die Interaktion von N-ERMAD mit S100P untersucht werden. Eine Zugabe von $1,76 \mu\text{M}$ S100P (A) zu einer DOPC / Ni-DOGS (9:1)-Membran führt zu einer Abnahme der Resonanzfrequenz um etwa -40 Hz und zeigt so die erfolgreiche Adsorption des Proteins an. Durch Spülen des Systems mit Puffer (B) konnte eine geringe Desorption von S100P von der Oberfläche beobachtet werden, angezeigt durch einen Anstieg der Resonanzfrequenz um $3\text{--}4$ Hz. Die Applizierung von $0,02 \mu\text{M}$ N-ERMAD (C) und eine spätere Erhöhung der Konzentration auf $0,03 \mu\text{M}$ (D) resultiert in einem linearen Abfall der Resonanzfrequenz, der im betrachteten Zeitfenster keinen Endwert erreichte. Interessanterweise konnte der aufgetretene Drift durch Spülen des Systems mit Puffer (B) gestoppt werden. Die hier erzielten Resultate zeigen, dass es keinen Unterschied macht, welche Spezies membrangebunden vorlag und welche als Ligand angeboten wurde. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit den hier dargestellten Methoden und Puffersystemen keine eindeutige Interaktion zwischen N-ERMAD und S100P nachgewiesen werden konnte.

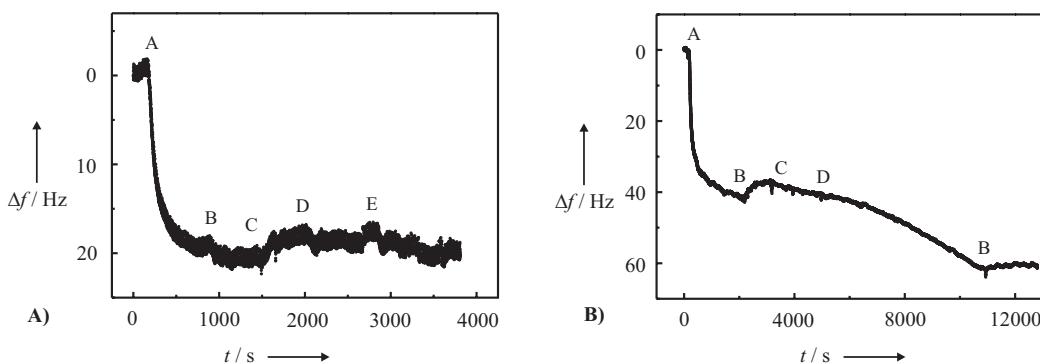


Abb. 4.33 QCM-Messungen der Adsorption von N-ERMAD an auf einer DOPC / Ni-DOGS (9:1)-Membran gebundenem S100P. **A)** Nach der Adsorption von 1,12 μ M S100P (A) und 3,36 μ M S100P (B) in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,5 mM CaCl₂, 1 mM NaN₃, pH 7,4 wurde nicht gebundenes Protein durch Spülen mit Puffer (C) entfernt. Im Anschluss wurde 0,01 μ M (D) und 0,03 μ M N-ERMAD (E) appliziert. **B)** Zuerst wurde 1,76 μ M S100P (A) in 30 mM HEPES, 25 mM Imidazol, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂, pH 7,4 adsorbiert. Nach Spülen der Messzelle mit Puffer (B) wurde 0,02 μ M (C) und 0,03 μ M N-ERMAD (D) zugegeben und im Anschluss das System erneut mit Puffer gespült (B).

4.5.2 Wechselwirkung von Ezrin mit S100P

Da eine Interaktion von N-ERMAD mit S100P nicht nachgewiesen werden konnte, wurde bei den folgenden Messungen das ERM-Protein Ezrin eingesetzt, um etwaige Unterschiede in der Wechselwirkung mit S100P zu untersuchen. In einem ersten Ansatz sollte mittels Vesikelassays eine Kopelletierung der Proteine mit den Vesikeln analysiert werden. Basierend auf den Ergebnissen der Membranbindungseigenschaften von Ezrin wurden POPC-Membranen, die mit 3 mol% PIP₂ dotiert waren verwendet. In Analogie zu den in Abschnitt 4.5.1 beschriebenen Vesikelassays wurde hier ebenfalls zuerst mit einer Ca²⁺-Konzentration von 0,5 mM im Puffer gearbeitet. In Abb. 4.34 A) ist das Ergebnis eines Vesikelassays dargestellt, bei welchem 0,05 mg / mL Ezrin und 0,05 mg / mL S100P für 20 Minuten mit 0,5 mg / mL MLV bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Im Anschluss wurde zentrifugiert, der Überstand (\ddot{U}_1) abgenommen und das Pellet zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine mit Puffer gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand (\ddot{U}_2) sowie das resultierende Pellet (P) mittels SDS-PAGE analysiert. In allen drei Fraktionen ist eine Ezrinbande detektierbar, wobei diese im ersten Überstand und im Pellet mit der größten Intensität auftritt. Dies zeigt, dass Ezrin an die PIP₂-haltigen Vesikel gebunden hat. Im Gegensatz dazu tritt die Proteinbande, die S100P zugeordnet werden kann, nur im

ersten Überstand auf, und es ist somit keine Copelletierung von Ezrin mit S100P nachzuweisen. In einem zweiten Experiment sollte die Interaktion von S100P mit membrangebundenem Ezrin untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Vesikelassays [Abb. 4.34 B)] durchgeführt, bei welchen zuerst 0,1 mg / mL Ezrin in Ca^{2+} -freiem Puffer an MLV gebunden wurde. Im Überstand (\ddot{U}_1) und im Waschritt (\ddot{U}_2) ist jeweils eine Ezrinbande geringer Intensität zu erkennen. Die pelletierten Vesikel wurden in 0,5 mM CaCl_2 -haltigem Puffer aufgenommen und die Vesikelsuspension 20 Minuten mit 0,05 mg / mL S100P inkubiert. Die Überprüfung des Überstands ($\ddot{U}_{1\text{Ca}}$), des Waschschriffts ($\ddot{U}_{2\text{Ca}}$) und des resultierenden Pellets (P_{Ca}) auf das Vorhandensein von Ezrin und S100P erfolgte mittels SDS-PAGE. Gemessen an den Bandenintensitäten in der Pelletfraktion sieht man eine deutliche Bindung von Ezrin an die Vesikel, während auf Höhe des S100P-Proteins keine Bande detektiert werden kann. Vielmehr ist S100P nahezu vollständig im ersten Überstand nach der Zentrifugation zu erkennen. Betrachtet man das Verhältnis von Ezrin in $\ddot{U}_{1\text{Ca}}$ und in P_{Ca} und vergleicht dieses mit jenen aus den Vesikelassays, die ohne Inkubation mit S100P durchgeführt wurden (siehe Abschnitt 4.4.2), so erkennt man keinen Unterschied. Dies zeigt, dass eine Wechselwirkung von Ezrin mit S100P in 0,5 mM CaCl_2 -haltigem Puffer nicht nachzuweisen ist.

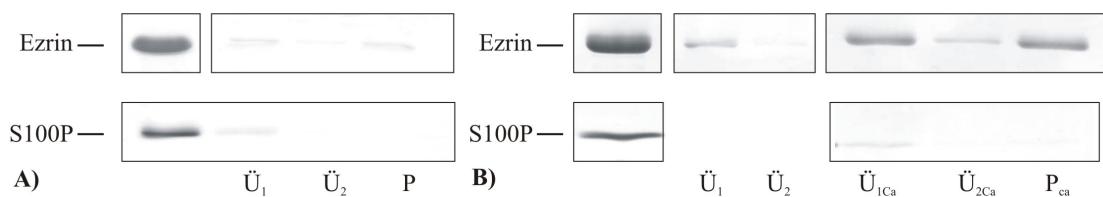


Abb. 4.34 SDS-PAGE-Analyse eines Vesikelcopelletierungsassays mit Ezrin und S100P. **A)** Inkubation von Ezrin, S100P und MLV in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 0,5 mM CaCl_2 , 1 mM NaN_3 , pH 7,4. \ddot{U}_1 : Überstand nach Zentrifugation. \ddot{U}_2 : Überstand nach Waschschritt. P : Pellet. **B)** Zuerst erfolgte die Bindung von Ezrin an MLV in 0,1 mM EDTA haltigem Puffer. \ddot{U}_1 : Überstand nach Zentrifugation. \ddot{U}_2 : Überstand nach Waschschritt. Im Anschluss wurde auf 0,5 mM CaCl_2 -haltigen Puffer gewechselt und die Vesikelsuspension mit S100P inkubiert. $\ddot{U}_{1\text{Ca}}$: Überstand nach Zentrifugation. $\ddot{U}_{2\text{Ca}}$: Überstand nach Waschschritt. P_{ca} : Pellet.

Da bei den obigen Versuchen keine positive Wechselwirkung zwischen Ezrin und S100P detektiert werden konnte, wurde in Analogie zu den Versuchen mit N-ERMAD und S100P ein Vesikelassay durchgeführt, bei welchem der Puffer eine Konzentration von 50 μM CaCl_2 aufwies. Dazu wurde Ezrin in Ca^{2+} -freiem Puffer an die MLV gebunden und durch Zentrifugation pelletiert. Sowohl im ersten Überstand (\ddot{U}_1) als auch im Überstand nach dem Waschschritt (\ddot{U}_2) ist im SDS-Gel eine Proteinbande erkennbar, die Ezrin entspricht. Im Anschluss wurde das Pellet in

50 μM CaCl₂-haltigem Puffer aufgenommen, die Vesikelsuspension 20 Minuten mit S100P inkubiert und anschließend zentrifugiert. Abb. 4.35 zeigt die SDS-PAGE Analyse des Überstandes ($\ddot{\text{U}}_{1\text{Ca}}$), des Waschschriffts ($\ddot{\text{U}}_{2\text{Ca}}$) und das Pellet (P_{Ca}). Im ersten Überstand sind zwei Banden unterschiedlicher Intensität erkennbar, wobei die intensiver ausgeprägte Bande S100P, die Bande geringerer Intensität Ezrin zugeordnet werden kann. Im Überstand des Waschschriffts lassen sich weder Ezrin, noch S100P detektieren, während in der Pelletfraktion ausschließlich eine deutliche Ezrinbande auftritt. Somit konnte mit Hilfe der Vesikelassays keine Interaktion zwischen Ezrin und S100P nachgewiesen werden.

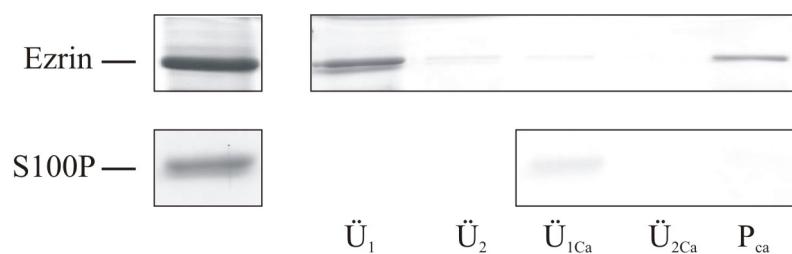


Abb. 4.35 SDS-PAGE-Analyse eines Vesikelcopelletierungsassays zwischen Ezrin und S100P. Zuerst erfolgte die Bindung von Ezrin an MLV in 0,1 mM EDTA-haltigem Puffer. $\ddot{\text{U}}_1$: Überstand nach Zentrifugation. $\ddot{\text{U}}_2$: Überstand nach Waschschrift. Im Anschluss wurde auf 50 μM CaCl₂ hältigen Puffer gewechselt und die Vesikelsuspension mit S100P inkubiert. $\ddot{\text{U}}_{1\text{Ca}}$: Überstand nach Zentrifugation. $\ddot{\text{U}}_{2\text{Ca}}$: Überstand nach Waschschrift. P_{Ca} : Pellet.

Um auszuschließen, dass die Messmethode (Vesikelassays) einen Einfluss auf die Ezrin–S100P-Interaktion hat, wurden Messungen an der Quarzmikrowaage durchgeführt. Der Vorteil der QCM-Technik besteht darin, dass die Interaktionsstudien an palnaren Membransystemen durchgeführt werden können. Zusätzlich können reversible Bindungen detektiert werden. Bei den folgenden Experimenten wurde jeweils eine festkörperunterstützte Membran bestehend aus einer OT-Monoschicht und einer zweiten POPC / PIP₂ (97:3)-Monoschicht eingesetzt. Um den von Koltzscher et al. verwendeten Bedingungen möglichst nahe zu kommen, wurde in einem ersten Ansatz mit den gleichen Puffersubstanzen und einem Ca²⁺-Gehalt von 0,5 mM gearbeitet. In Abb. 4.36 ist das Ergebnis einer QCM-Messung in 30 mM HEPES, 25 mM Imidazol, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂, pH 7,4 dargestellt. Die erfolgreiche Adsorption von 0,11 μM Ezrin (A) an die Membran zeigt sich durch eine Änderung der Resonanzfrequenz um etwa -18 Hz, wobei der Adsorptionsvorgang zum Zeitpunkt des Spülens (B) noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Nachdem sich wieder ein stabiles Frequenzniveau eingestellt hatte,

wurde $1,23 \mu\text{M}$ S100P (C) appliziert. Die beobachtete Abnahme der Resonanzfrequenz folgt einem nahezu linearen Verlauf relativ geringer Steigung, der jedoch im betrachteten Zeitfenster keinen Endwert erreichte. Somit konnte unter den gewählten Bedingungen keine Bindung zwischen Ezrin und S100P nachgewiesen werden.

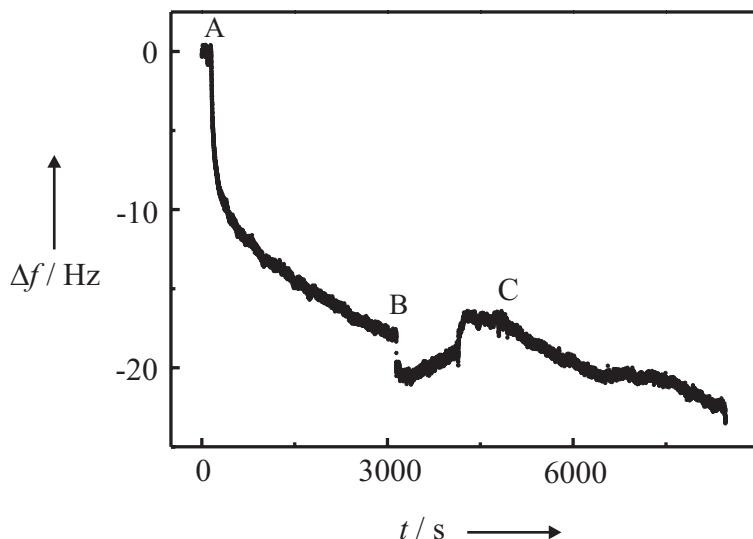


Abb. 4.36 QCM-Messung der Adsorption von S100P zu membrangebundenem Ezrin. Zuerst wurde $0,11 \mu\text{M}$ Ezrin (A) in 30 mM HEPES, 25 mM Imidazol, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , $0,5 \text{ mM}$ CaCl_2 , pH 7,4 adsorbiert. Nach Spülen der Messzelle mit Puffer (B) wurden $1,23 \mu\text{M}$ S100P zugegeben.

Analog zu den durchgeföhrten Experimenten mit N-ERMAD wurden auch bei der Untersuchung der Ezrin – S100P-Interaktion Puffer mit einem Gehalt von $50 \mu\text{M}$ CaCl_2 verwendet, um den Einfluss des Ca^{2+} -Gehaltes auf die Proteininteraktion zu untersuchen. Der für die nachfolgend beschriebenen Experimente verwendete Puffer setzte sich aus 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, $50 \mu\text{M}$ CaCl_2 , 1 mM NaN_3 , pH 7,4 zusammen. Abb. 4.37 A) zeigt das Ergebnis einer QCM-Messung. Die Zugabe von $0,25 \mu\text{M}$ Ezrin (A) resultiert in einer Abnahme der Resonanzfrequenz um etwa -48 Hz und zeigt so die erfolgte Adsorption des Proteins an die Membran an. Um nicht gebundenes Protein aus dem System zu entfernen, wurde die Messzelle mit Puffer gespült (B) und $3,5 \mu\text{M}$ (C), $6,9 \mu\text{M}$ (D) und $10,4 \mu\text{M}$ S100P (E) appliziert. Hier ist zu beobachten, dass nach der ersten Zugabe von S100P eine Abnahme der Resonanzfrequenz um -5 Hz auftritt, während die zweite Zugabe einen Abfall um -2 Hz hervorruft. Nach den beiden erfolgten Adsorptionen konnte ein Anstieg der Frequenz beobachtet werden, welcher auch durch die dritte Injektion von S100P

nicht gestoppt werden konnte. Schließlich wurde das System mit Puffer gespült (B), was in einem erneuten Anstieg der Resonanzfrequenz um etwa 8 Hz resultierte und bei -37 Hz einen stabilen Endwert erreichte. Somit lässt sich trotz einer anfänglich beobachteten Adsorption von S100P an membrangebundenes Ezrin keine eindeutige Interaktion zwischen den Proteinen nachweisen, zumal diese Messung nicht reproduziert werden konnte, sondern im Allgemeinen Ergebnisse erhalten wurden wie in Abb. 4.37 B) dargestellt sind. Die durch die Zugabe von $0,08\text{ }\mu\text{M}$ Ezrin (A) hervorgerufene Änderung der Resonanzfrequenz um ca. -43 Hz zeigt die Adsorption des Proteins an die Oberfläche. Nachdem das System mit Puffer gespült wurde (B), erfolgte die Applikation von $3,08\text{ }\mu\text{M}$ (C) und $6,15\text{ }\mu\text{M}$ (D) S100P. Durch keine der Proteinzugaben war eine signifikante Änderung der Resonanzfrequenz zu detektieren. Zusammenfassend konnte in Analogie zu den erzielten Resultaten mit N-ERMAD keine Interaktion von Ezrin mit S100P unter den untersuchten Bedingungen nachgewiesen werden.

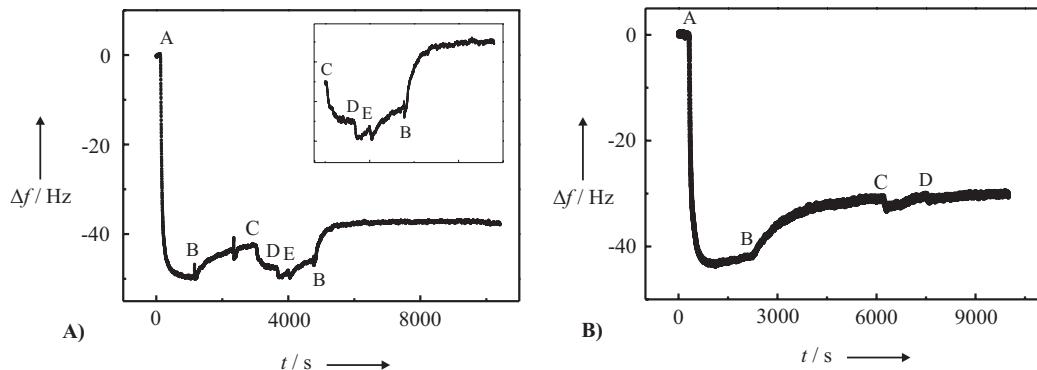


Abb. 4.37 QCM-Messungen der Adsorption von Ezrin an festkörperunterstützte POPC / PIP₂ (97:3)-Membranen und anschließender Applikation von S100P. **A)** Nach der Adsorption von $0,25\text{ }\mu\text{M}$ Ezrin (A) in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, $50\text{ }\mu\text{M}$ CaCl₂, 1 mM NaN₃, pH 7,4 wurde nicht gebundenes Protein durch Spülen mit Puffer (B) entfernt. Dann wurden $3,5\text{ }\mu\text{M}$ (C), $6,9\text{ }\mu\text{M}$ (D) und $10,4\text{ }\mu\text{M}$ S100P (E) zugegeben und im Anschluss mit Puffer gespült (B). Der eingesetzte Graph zeigt die einzelnen S100P-Zugaben. **B)** Zuerst wurde $0,08\text{ }\mu\text{M}$ Ezrin (A) in 20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, $50\text{ }\mu\text{M}$ CaCl₂, 1 mM NaN₃, pH 7,4 adsorbiert. Nach Spülen der Messzelle mit Puffer (B) erfolgte die Zugabe von $3,08\text{ }\mu\text{M}$ (C) und $6,15\text{ }\mu\text{M}$ (D) S100P.

4.6 Interaktion von Ezrin mit Aktin

Während durch die N-terminale Domäne von Ezrin die Membranbindung des Proteins vermittelt wird, befindet sich in C-ERMAD eine Bindungsstelle für Aktinfilamente. Diese ist allerdings nur zugänglich, wenn Ezrin in seiner aktivierten Form vorliegt, also die intramolekulare Assoziation von N-ERMAD und C-ERMAD gelöst wurde. Eine Möglichkeit, das Protein zu aktivieren, besteht in der Phosphorylierung von Threonin an Position 567 in der C-terminalen Domäne von Ezrin. Eine alternative Aktivierung von Ezrin könnte durch die Bindung des Proteins an das Phospholipid PIP₂ hervorgerufen werden. Zur Verifizierung dieser Hypothese wurde die Interaktion von Ezrin mit F-Aktin mittels Ellipsometrie, QCM und Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

4.6.1 Untersuchung der Interaktion von Ezrin mit Aktin mittels Ellipsometrie

Zur Quantifizierung der Wechselwirkung von Ezrin mit F-Aktin wurden ellipsometrische Messungen durchgeführt, durch welche die Bestimmung der Schichtdicke von adsorbierten Filmen ermöglicht wird. Die Zugabe der Vesikel bzw. der Proteine erfolgte direkt in die Messzelle. Nach der Applikation des Analyten wurde kurz gerührt, um eine vollständige Verteilung zu gewährleisten. Es handelt sich folglich um einen raten- wie diffusionskontrollierten Adsorptionsprozess. Basierend auf der Schichtdickenbestimmung der adsorbierten Proteine können Aussagen über mögliche Proteinwechselwirkungen getroffen werden. Die Aktinfilamente wurden in F-Puffer (20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM ATP, pH 7,4) bei 4 °C über Nacht polymerisiert.

Zunächst wurde die Ausbildung der festkörperunterstützten Membran untersucht. Als Substrat für die durchgeführten Messungen fungierte ein Siliziumplättchen mit einer dünnen, hydrophilisierten Siliziumdioxidschicht. Auf diesem wurde die Vesikellösung appliziert und der Spreitvorgang mittels Ellipsometer verfolgt. Am Beispiel der Membranbildung soll das verwendete Modell erklärt werden, mit welchem die Schichtdickenbestimmung durchgeführt wurde.

Prinzipiell lässt sich aus den bei einer ellipsometrischen Messung ermittelten Werten von Δ und Ψ sowohl die Schichtdicke als auch der Brechungsindex der zu untersuchenden Schicht bestimmen. Allerdings ist im Grenzfall kleiner

Schichtdicken die exakte Bestimmung beider Parameter aufgrund einer ungünstigen Fehlerfortpflanzung schwierig. Dieses Problem ist behoben, wenn ein Parameter bekannt ist. In der Praxis wird oft der Brechungsindex der entsprechenden Schicht aus anderen Quellen ermittelt, was dann eine genaue Bestimmung der Schichtdicke ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Brechungsindizes für die untersuchten Schichten vorgegeben (siehe Abschnitt 3.3.3.3). Grundsätzlich basiert die Bestimmung der Schichtdicke also auf den beiden gemessenen Winkeln Δ und Ψ sowie dem vorgegebenen Brechungsindex des Materials. Exemplarisch ist in Abb. 4.38 A) der Spreitvorgang von POPC / PIP₂ (9:1)-Vesikeln in F-Puffer, welchem 1 mM CaCl₂ zugesetzt wurde, auf einer SiO₂-Schicht dargestellt. Bei Betrachtung von mehr als einer Schicht ist es für die Kalkulation der Schichtdicke des Films erforderlich, dass die Schichtdicken der unterliegenden Filme bekannt sind. In diesem Beispiel musste so zuerst die Schichtdicke der SiO₂-Schicht (Brechungsindex: 1,4571) bestimmt werden, bevor die Applikation der Vesikel erfolgte. Unter Annahme eines Brechungindex von 1,4840 für die Doppelschicht wird eine Kurve simuliert (durchgezogene Linie), die in Abhängigkeit der Parameter Δ und Ψ die Schichtdicke repräsentiert. Dabei stellt jedes Segment der Kurve eine Änderung der Schichtdicke um 1 nm dar. Die gemessenen Winkel Δ und Ψ sind als Punkte dargestellt. Um eine möglichst verlässliche Aussage über die Schichtdicke treffen zu können, ist es erforderlich, dass die Messwerte gut mit der simulierten Kurve übereinstimmen. In einer anderen Darstellung sind die beiden Winkel Δ und Ψ gegen die Schichtdicke aufgetragen [Abb. 4.38 B)]. Hier erkennt man ebenfalls, dass die ermittelten Datenpunkte gut mit den simulierten Kurven übereinstimmen. Zusätzlich ist ein weiteres Charakteristikum, das bei geringen Filmdicken auftritt, zu erkennen. Der Winkel Δ ist nahezu proportional zur Schichtdicke, während die Änderung der Schichtdicke nur einen sehr geringen Einfluss auf Ψ hat. Dies bedeutet, dass die Dicke von dünnen Schichten fast ausschließlich durch Δ beschreiben wird.

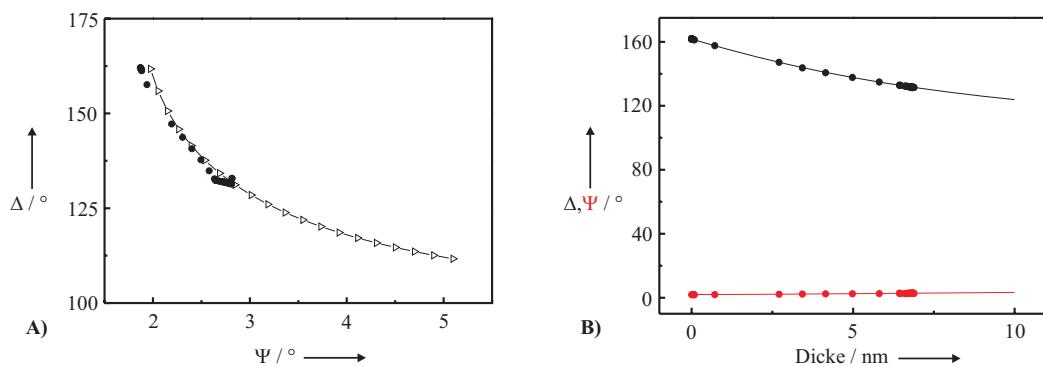


Abb. 4.38 **A)** Simulierte Kurve, welche die Änderung der Schichtdicke in Abhängigkeit der Parameter Δ und Ψ zeigt, wobei jedes Segment einer Änderung um 1 nm entspricht. Die experimentellen Datenpunkte resultieren aus der Zugabe von POPC / PIP₂ (9:1)-Vesikeln zu einer SiO₂-Schicht. **B)** Darstellung der Schichtdickenänderung in Abhängigkeit von Δ und Ψ . Die Linien repräsentieren simulierte Kurven, während die Punkte die gemessenen Daten darstellen (n_{Si} : 3,8816, n_{SiO_2} : 1,4571, d_{SiO_2} : 3,5421 nm, $n_{Membran}$: 1,4840)

In Abb. 4.39 ist die zeitliche Schichtdickenänderung dargestellt, die aus der Zugabe von 0,35 mg / mL POPC / PIP₂ (9:1)-Vesikeln (A) zu einem SiO₂-Substrat resultiert. Dabei wurde F-Puffer verwendet, welchem 1 mM CaCl₂ zugesetzt wurde, um den Spreitvorgang zu beschleunigen. Man erkennt, dass sich bereits nach 10 Minuten eine konstante Filmdicke von 6,8 nm eingestellt hat. Nachdem die Messküvette mit Puffer gespült wurde (B), resultiert eine Schichtdicke von 6,4 nm, woraus geschlossen werden kann, dass sich die Membran vollständig ausgebildet hat. Aus 10 unabhängigen Ellipsometriemessungen wurde die Schichtdicke einer POPC / PIP₂ (9:1)-Membran in F-Puffer zu $(6,1 \pm 1,1)$ nm bestimmt.

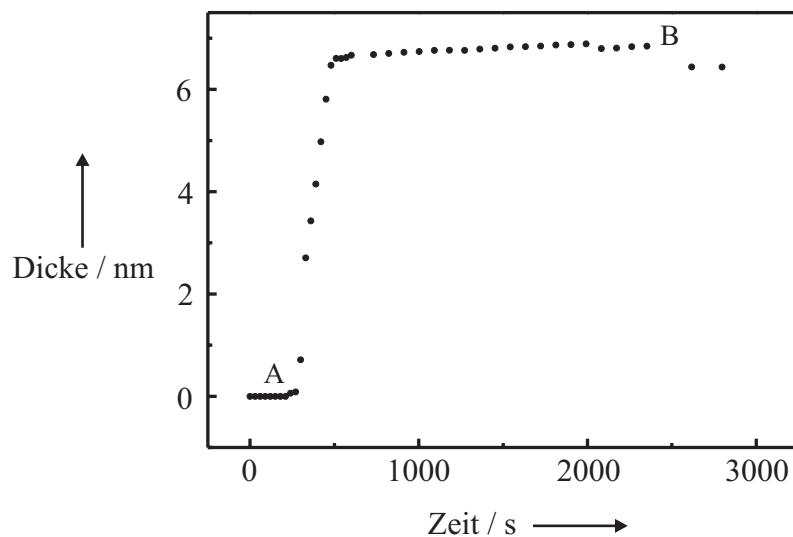


Abb. 4.39 Typischer Verlauf des Spreitvorgangs von POPC / PIP₂ (9:1)-Vesikeln in 1 mM CaCl₂-haltigem F-Aktinpuffer. Die Zugabe der Vesikel (A) resultiert in einem Anstieg der Schichtdicke auf 6,8 nm, die sich nach Spülen der Messzelle mit Puffer (B) auf 6,4 nm erniedrigt (n_{Si} : 3,8816, n_{SiO_2} : 1,4571, d_{SiO_2} : 2,4959 nm; $n_{Membran}$: 1,4840).

Untersuchung der G- / F-Aktinadsorption

Es wurde in einem ersten Schritt das Bindungsverhalten von Aktin mittels Ellipsometriemessungen untersucht. Dazu wurde sowohl G- als auch F-Aktin an DOPC / DOTAP (6:4)-Membranen adsorbiert. Um die elektrostatische Wechselwirkung mit dem negativ geladenen Aktin ($pI \sim 5,4$) zu favorisieren und so eine Anbindung an die Membran zu erreichen, wurde gezielt das positiv geladene Lipid DOTAP verwendet. In Abb. 4.40 A) ist das Adsorptionsverhalten von 70 µg / mL F-Aktin (A) an eine DOPC / DOTAP (6:4)-Membran in F-Puffer dargestellt. Man erkennt einen deutlichen Anstieg der Schichtdicke um 4,4 nm, welche auf die erfolgte Adsorption der Filamente an die Membran zurückzuführen ist. Dabei wird der Endwert der Schichtdickenzunahme nach etwa 3000 Sekunden erreicht. Auch nach einem längeren Inkubationszeitraum über Nacht konnte keine weitere Zunahme der Schichtdicke detektiert werden. Im Folgenden wurde die Messzelle mit F-Puffer gespült (B). Dabei änderte sich die Schichtdicke nicht, woraus geschlossen werden kann, dass die Aktinfilamente irreversibel an die Membran adsorbiert sind. Zum Vergleich ist in Abb. 4.40 B) die Adsorption von monomerem G-Aktin zu einer DOPC / DOTAP (6:4)-Membran in G-Puffer dargestellt. Dabei wurde 70 µg / mL G-Aktin (A) appliziert. Bedingt durch die

Adsorption des Proteins an die Membran steigt die Schichtdicke um 2,7 nm. Im Gegensatz zu der Adsorption des filamentösen Aktins wird hier eine geringere Schichtdicke erzielt, die bereits nach etwa 400 Sekunden einen konstanten Endwert erreicht. Die unterschiedlichen Adsorptionskinetiken beweisen, dass die gewählten Polymerisationsbedingungen zur Bildung von F-Aktin führen. Die ermittelten Schichtdickenunterschiede deuten ebenfalls darauf hin, dass monomeres (2,7 nm) bzw. polymeres (4,4 nm) Aktin vorliegt. Zur Überprüfung der Reversibilität des Adsorptionsprozesses wurde die Messküvette mit Puffer gespült (B), wodurch eine geringe Desorption des monomeren G-Aktins um 0,6 nm erfolgte. Zusammenfassend betrachtet konnte gezeigt werden, dass G- und F-Aktin mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten an eine positiv geladene Oberfläche adsorbieren und dass die erzielten Schichtdicken von F-Aktin um 1–2 nm über denen von G-Aktin liegen.

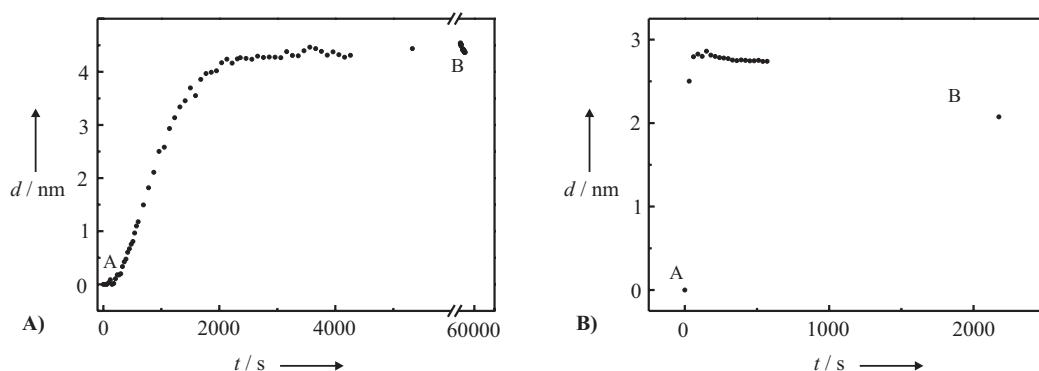


Abb. 4.40 Ellipsometriemessungen der Bindung von Aktin an DOPC / DOTAP (6:4)-Membranen, wobei der eingesetzte Graph die Ausbildung der Membran zeigt. **A)** Adsorption von 70 µg / mL F-Aktin (A) in F-Puffer und anschließende Pufferspülung (B) ($n_{\text{Si}}: 3,8816$, $n_{\text{SiO}_2}: 1,4571$, $d_{\text{SiO}_2}: 1,9877 \text{ nm}$; $n_{\text{Membran}}: 1,4840$, $d_{\text{Membran}}: 5,3487 \text{ nm}$, $n_{\text{Aktin}}: 1,5000$). **B)** Adsorption von 70 µg / mL G-Aktin (A) in G-Puffer. Im Anschluss wurde das System mit Puffer gespült (B) ($n_{\text{Si}}: 3,8816$, $n_{\text{SiO}_2}: 1,4571$, $d_{\text{SiO}_2}: 3,1185 \text{ nm}$; $n_{\text{Membran}}: 1,4840$, $d_{\text{Membran}}: 4,6695 \text{ nm}$, $n_{\text{Aktin}}: 1,5000$).

Untersuchung der Ezrin – F-Aktin-Interaktion

Weiterhin sollte der Einfluss von PIP_2 auf die Aktivierbarkeit von Ezrin untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden in Analogie zu den QCM-Messungen Membranen verwendet, die eine Adsorption von Ezrin an PIP_2 ermöglichen. In Abb. 4.41 ist eine Ellipsometriemessung dargestellt, welche die Interaktion von F-Aktin mit membrangebundenem Ezrin zeigt. Um eine möglichst vollständige Belegung der Oberfläche mit Ezrin zu erzielen, wurde hierbei eine festkörperunterstützte POPC-Membran verwendet, die einen Anteil von 10 mol% PIP_2 aufwies. Nachdem der Spreitvorgang der Vesikel abgeschlossen war, wurden überschüssige Vesikel durch

Spülen mit Puffer aus der Messzelle entfernt. Im Anschluss wurde $0,4 \mu\text{M}$ Ezrin (A) in die Messküvette appliziert. Eine Zunahme der Schichtdicke um $2,1 \text{ nm}$ signalisiert die erfolgreiche Adsorption von Ezrinmolekülen an die Membran. Zur Ablösung reversibel gebundener Proteine sowie zur Entfernung überschüssigen Proteins aus der Lösung wurde die Messzelle mit Puffer gespült (B), was zu einer Änderung der Schichtdicke um $0,4 \text{ nm}$ führte. Im Anschluss wurde $14 \mu\text{g} / \text{mL}$ F-Aktin (C) und $28 \mu\text{g} / \text{mL}$ F-Aktin (D) appliziert. Die Zugabe der Aktinfilamente resultierte in keiner signifikanten Änderung der Schichtdicke. Erst nach einer Inkubation über Nacht konnte nach erneutem Spülen (B) eine Erhöhung der Schichtdicke um $0,5 \text{ nm}$ detektiert werden. Verglichen mit der elektrostatisch bedingten Schichtdickenerhöhung von F-Aktin auf DOTAP-haltigen Membranen ist der hier erzielte Wert relativ klein. Ein weiterer Unterschied ergibt sich bei der Betrachtung des Adsorptionszeitraums. Auf DOTAP-dotierten Membranen war die Adsorption der Filamente bereits nach etwa 3000 Sekunden abgeschlossen, während bei der hier gezeigten Messung keine Änderung der Schichtdicke über einen Zeitraum von 15000 Sekunden detektiert werden konnte.

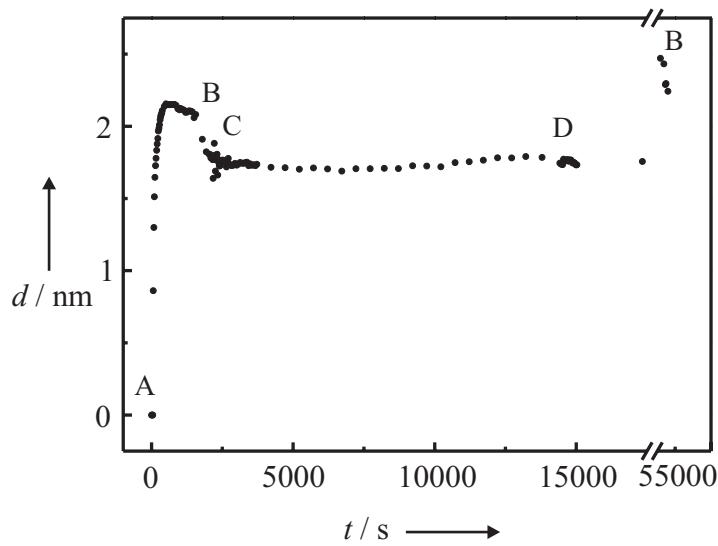


Abb. 4.41 Ellipsometriemessungen zur Untersuchung der Ezrin – F-Aktin Interaktion. Die Messungen wurden in F-Puffer durchgeführt. Adsorption von $0,4 \mu\text{M}$ Ezrin (A) an eine POPC / PIP₂ (9:1)-Membran, gefolgt von Pufferspülung (B) und Zugabe von $14 \mu\text{g} / \text{mL}$ (C) und $28 \mu\text{g} / \text{mL}$ F-Aktin (D). Anschließend wurde die Messzelle erneut mit Puffer gespült (B) ($n_{\text{Si}}: 3,8816$, $n_{\text{SiO}_2}: 1,4571$, $d_{\text{SiO}_2}: 2,6652 \text{ nm}$; $n_{\text{Membran}}: 1,4840$, $d_{\text{Membran}}: 4,8964 \text{ nm}$, $n_{\text{Ezrin}}: 1,5000$, $d_{\text{Ezrin}}: 1,8075 \text{ nm}$, $n_{\text{Aktin}}: 1,5000$).

Allgemein muss in Bezug auf die Ellipsometriemessungen konstatiert werden, dass diese teilweise sehr unreproduzierbare Ergebnisse lieferten. Zudem konnte durch

technische Probleme nur eine geringe Anzahl von Messungen durchgeführt werden. Die Betrachtung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (siehe Abschnitt 4.6.3) zeigt deutlich, dass es sich bei den adsorbierten Aktinfilamenten keineswegs um eine gleichmäßige, homogene Schicht handelt, was aber eine wichtige Voraussetzung für die Ellipsometrie wäre.

4.6.2 Mikrogravimetrische Untersuchung der Interaktion von Ezrin mit F-Aktin

Aufgrund technischer Probleme konnte nur eine begrenzte Zahl an Ellipsometriemessungen durchgeführt werden. Deshalb wurden im Folgenden Messungen mit der QCM durchgeführt, um die Wechselwirkung von Ezrin mit F-Aktin zu quantifizieren. Zu diesem Zweck fand eine Untersuchung von Ezrin und der beiden Mutanten Ezrin T567D und Ezrin T567A statt, wobei der Austausch von Threonin gegen Glutamat eine konstitutiv aktive, der Austausch gegen Alanin eine konstitutiv inaktive Mutante simuliert. Bei allen durchgeführten Messungen wurde Aktin in F-Puffer (20 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM ATP, pH 7,4) über Nacht bei 4 °C polymerisiert.

In Abb. 4.42 A) und B) sind zwei QCM-Messungen dargestellt, bei denen die Adsorption von F-Aktin an membrangebundenes Ezrin untersucht und dabei jeweils eine festkörperunterstützte POPC-Membran mit 3 mol% PIP₂ verwendet wurde. Im ersten Fall (A)) verursachte die Zugabe von 0,20 µM Ezrin (A) eine Abnahme der Resonanzfrequenz um etwa –33 Hz und zeigt so die Adsorption des Proteins an die Membran an. Um nicht-gebundenes Protein aus der Lösung zu entfernen, wurde mit reiner Pufferlösung gespült (B), was eine Erhöhung der Resonanzfrequenz um 3 bis 4 Hz hervorrief. Die Injektion von 5,6 µg / mL F-Aktin (C) resultierte in einer drastischen Abnahme der Frequenz um ca. 500 Hz. Durch Spülen mit Puffer (B) wird die Ablösung von gebundenen Aktinfilamenten initiiert, was sich in einer Zunahme der Frequenz um etwa 30 Hz zeigt. Allerdings folgt der Desorptionsverlauf einem linearen Anstieg, der im betrachteten Zeitfenster keinen Endwert erreicht. In der unter B) dargestellten QCM-Messung konnte ein anderer Adsorptionsverlauf beobachtet werden. Nach der Adsorption von 0,20 µM Ezrin (A) und der Entfernung von überschüssigem Protein aus dem System (B), resultierte die Zugabe von 5,6 µg / mL F-Aktin (C) und die Erhöhung der Aktinkonzentration auf 10,8 µg / mL

(D) in einem linearen Abfall der Resonanzfrequenz, der im beobachteten Zeitfenster einen Wert von ca. –30 Hz erreicht. Anschließend wurde das System mit Puffer gespült (B). Dabei erhöhte sich die Resonanzfrequenz um 2 – 3 Hz. Obwohl der Adsorptionszeitraum der Aktinfilamente ähnlich zu der unter A) gezeigten Messung ist ($t \sim 5000$ s), erkennt man hier einen deutlichen Unterschied in der Menge an adsorbiertem Protein. Die beschriebene Messung in A) liefert eine ca. 17-fach höhere Abnahme der Resonanzfrequenz. Neben den hier dargestellten Messergebnissen konnten bei analog durchgeführten Experimenten zum Teil fast keine bis stark schwankende Änderungen der Frequenz detektiert werden. Die geringe Reproduzierbarkeit der QCM-Messungen bezog sich dabei nicht nur auf die Aktinadsorption, sondern auch auf den Desorptionsprozess. So wurden Messungen durchgeführt, bei denen fast keine Desorption stattfand, während bei anderen Messungen nahezu das gesamte Aktin wieder abgelöst werden konnte.

Um die Spezifität der Bindung von Ezrin mit F-Aktin zu verifizieren, wurden zusätzlich zu den oben beschriebenen Versuchen QCM-Messungen durchgeführt, bei denen der Adsorptionsprozess von monomerem, globulärem Aktin verfolgt wurde. Zur Unterbindung einer spontanen Polymerisierung von Aktin, wurde in einem Puffer niedriger Ionenstärke gearbeitet, d.h. in 5 mM Tris/HCl, 0,2 mM CaCl₂, pH 8,0 (G-Puffer). Hierbei konnte keine Änderung der Resonanzfrequenz bei Zugabe von G-Aktin zu membrangebundenem Ezrin beobachtet werden. Somit kann eine Interaktion von Ezrin mit monomerem G-Aktin ausgeschlossen werden.

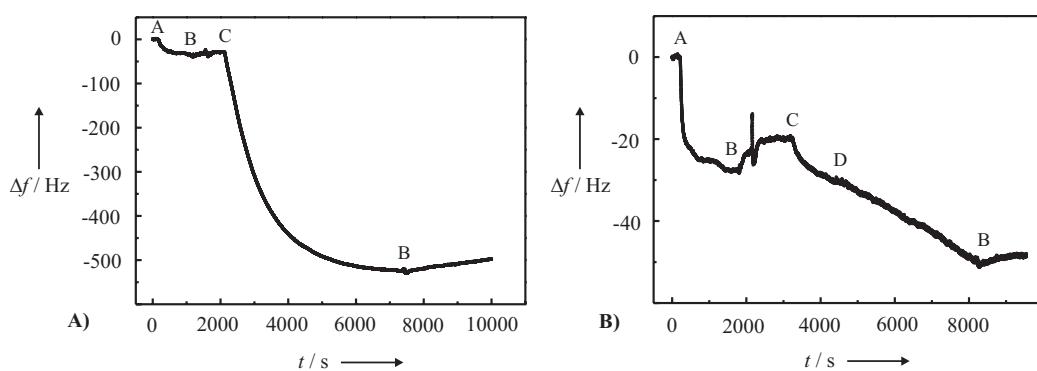


Abb. 4.42 QCM-Messungen unter Verwendung festkörperunterstützter POPC / PIP₂ (97:3)-Membranen in F-Puffer. **A)** Nach der Adsorption von 0,20 µM Ezrin (A) wurde das System mit Puffer gespült (B). Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 5,6 µg / mL F-Aktin (C). Nach Beendigung der Adsorption wurde die Messzelle erneut mit Puffer gespült (B). **B)** Zuerst wurden 0,20 µM Ezrin adsorbiert (A). Nach Spülen mit Puffer (B) wurden 5,6 µg / mL (C) und 10,8 µg / mL F-Aktin appliziert und anschließend das System mit Puffer gespült (B).

Neben den QCM-Messungen, welche mit dem Wildtyp-Ezrin durchgeführt wurden, sollte zudem die Wechselwirkung von F-Aktin mit den beiden Ezrin Mutanten Ezrin T567D und Ezrin T567A untersucht werden. Dabei simuliert Ezrin T567D eine daueraktive Form, welche unabhängig von der verwendeten Membran Aktinfilamente bindet, während die andere Ezrinmutante eine inaktivierbare Form darstellt. Dabei zeigte sich jedoch, dass insbesondere bei Ezrin T567A die Wechselwirkung mit dem Rezeptorlipid PIP₂ stark beeinträchtigt war. So konnte nahezu keine Adsorption des Proteins auf festkörperunterstützte POPC / PIP₂ (97:3)-Membranen mit der QCM detektiert werden. Infolgedessen wurden für die weiteren Untersuchungen mit dieser Mutante nur noch Membranen mit einem PIP₂-Gehalt von 5 mol% eingesetzt. Trotz dieser Maßnahme blieb die Bindung von Ezrin T567A sehr unreproduzierbar und der Bindungsprozess an die Membran folgte keinem einheitlichen Verlauf. Abb. 4.43 A) zeigt eine QCM-Messung, bei welcher 0,05 µM Ezrin T567A (A) an eine POPC / PIP₂ (19:1)-Membran adsorbiert wurde. Dabei folgt der Adsorptionsprozess einem annähernd linearen Verlauf und resultiert in einer Frequenzänderung um etwa –27 Hz, wobei im betrachteten Zeitfenster kein Endwert erreicht wurde. Durch Spülen mit Puffer (B) konnte ein Teil des gebundenen Proteins wieder abgelöst werden, was in einer Resonanzfrequenzänderung von ca. 10 Hz zum Ausdruck kommt. Danach wurden 5,3 µg / mL F-Aktin (C) zugegeben, worauf eine Änderung der Frequenz um etwa –150 Hz resultiert und so eine deutliche Adsorption von F-Aktin auf membrangebundenes Ezrin T567A zu erkennen ist. Da es sich bei Ezrin T567A um die konstitutiv inaktive Mutante handelt, welche die F-Aktinbindung unterbinden sollte, besteht die Möglichkeit, dass das Protein durch die Mutation der Aminosäure nicht mehr in seiner nativen Konformation vorliegt, was auch die ungenügende Bindung an die Membran erklären würde. Eine weiterführende Untersuchung dieser Hypothese wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Im Anschluss an den Adsorptionsprozess von F-Aktin wurde mit Puffer gespült, was in einer Resonanzfrequenzänderung von etwa 140 Hz resultierte. Dies bedeutet, dass praktisch das gesamte F-Aktin wieder desorbierte. In einer zweiten Messung mit Ezrin T567A wurde ein ähnliches Bindungsverhalten der F-Aktinfilamente beobachtet. Da jedoch bei beiden Messungen keineswegs eine vollständige Belegung der Membran mit Ezrin T567A gewährleistet war, ist eine finale Beurteilung der beobachteten Reversibilität nicht möglich. Zum Vergleich ist in Abb. 4.43 B) eine QCM-Messung dargestellt, bei welcher 0,06 µM Ezrin T567D

(A) an eine POPC / PIP₂ (97:3)-Membran in F-Puffer adsorbierte. Die erfolgte Bindung an die Membran wird durch eine Frequenzabnahme von etwa -27 Hz angezeigt. Durch anschließendes Spülen des System mit Puffer (B), konnte eine Erhöhung der Frequenz um ca. 5 Hz beobachtet werden. Dann wurde F-Aktin mit einer Konzentration von 5,4 µg / mL (C) appliziert, wobei die resultierende Änderung der Resonanzfrequenz um nahezu -170 Hz auf die Adsorption des Proteins auf die Oberfläche hindeutet. Die Desorption des gebundenen Proteins wurde durch Spülen mit Puffer (B) initiiert und führte zu einer Erhöhung der Resonanzfrequenz um 3 Hz. Allerdings konnte die hier dargestellte Irreversibilität der F-Aktinadsorption in analog durchgeführten Messungen nicht bestätigt werden. So wurden Messungen durchgeführt, bei denen das gebundene F-Aktin durch die Pufferspülung wieder komplett abgelöst wurde, also vollständig reversibel gebunden hatte. Ähnlich zu den durchgeführten QCM-Messungen mit Ezrin ist auch bei den beiden untersuchten Mutanten keine Reproduzierbarkeit in Bezug auf die F-Aktinbindung vorhanden. Aufgrund dessen wurden im weiteren Verlauf der Arbeit keine Messungen mehr mit den beiden Ezrinmutanten durchgeführt.

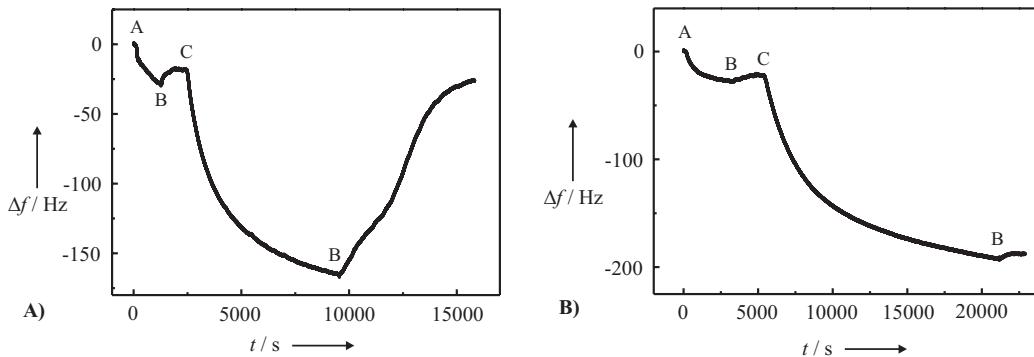


Abb. 4.43 QCM-Messungen zur Untersuchung der Wechselwirkung von F-Aktin mit Ezrinmutanten. **A)** Nach der Adsorption von 0,06 µM Ezrin T567D (A) an eine festkörperunterstützte POPC / PIP₂ (97:3)-Membran in F-Puffer, wurde nicht gebundenes Protein durch Spülen mit Puffer (B) entfernt. Dann wurden 5,4 µg / mL F-Aktin (C) zugegeben und im Anschluss mit Puffer gespült (B). **B)** Zuerst wurden 0,05 µM Ezrin T567A (A) an eine festkörperunterstützte POPC / PIP₂ (19:1)-Membran in F-Puffer adsorbiert. Nach Spülen der Messzelle mit Puffer (B) erfolgte die Zugabe von 5,3 µg / mL F-Aktin (C) und eine erneute Pufferspülung (B).

Um einen möglichen Einfluss von PIP₂ auf die Aktivierung von Ezrin zu untersuchen, wurden QCM-Messungen durchgeführt, bei denen Ezrin an PIP₂-freie Membranen gebunden wurde. Zu diesem Zweck fanden DOPC / Ni-DOGS (9:1)-Membranen Verwendung, die eine Bindung von Ezrin über dessen fusionierten His-Tag erlauben. Falls PIP₂ eine entscheidende Rolle beim Aktivierungsprozess von

Ezrin spielt, sollte in diesem Fall keine Interaktion mit Aktinfilamenten detektierbar sein. Abb. 4.44 A) zeigt eine solche Messung, welche in F-Puffer durchgeführt wurde. Die Zugabe von $0,12 \mu\text{M}$ Ezrin (A) resultiert in einer Änderung der Resonanzfrequenz um (-49 ± 2) Hz und zeigt so die Adsorption des Proteins an die Oberfläche an. Der Desorptionsprozess wurde durch Spülen des Systems mit Puffer (B) initiiert, wobei eine Erhöhung der Frequenz um etwa 2 Hz beobachtet werden kann. Man kann somit im Falle der Adsorption von Ezrin an Ni-DOGS-haltige Membranen von einer nahezu irreversiblen Bindung ausgehen. Im Folgenden wurden $4,6 \mu\text{g} / \text{mL}$ F-Aktin (C) appliziert, wobei keine Bindung beobachtet werden konnte. Vielmehr resultierte ein geringer, linearer Abfall der Resonanzfrequenz. Ein erneutes Spülen der Messzelle (B) führte zu keiner weiteren Desorption. In einem analog durchgeführten Experiment zeigte sich ein ähnliches Bindungsverhalten, wenngleich ein stärkerer linearer Abfall der Resonanzfrequenz nach der Aktinzugabe zu beobachten war. Insgesamt lässt sich keine eindeutige Bindung zwischen F-Aktin und über His-Tag gebundenes Ezrin beobachten und favorisiert so die Möglichkeit einer Aktivierung von Ezrin durch PIP_2 . Die auftretenden, sprunghaften Änderungen der Resonanzfrequenz an den Punkten B und C sind auf das Umschalten des Pumpystems zurückzuführen.

Um zu verifizieren, ob die bei den mikrogravimetrischen Untersuchungen beobachteten Änderungen der Resonanzfrequenz nach der Aktinzugabe auf einer Bindung zwischen Ezrin und F-Aktin beruhen, wurden QCM-Messungen durchgeführt, bei denen F-Aktin zu einer reinen POPC / PIP_2 (97:3)-Membran appliziert wurde. Alle durchgeführten Messungen zeichneten sich durch eine sehr geringe Reproduzierbarkeit aus. Nach der Zugabe von F-Aktin waren Änderungen der Resonanzfrequenz von wenigen Hertz bis zu einigen hundert Hertz zu beobachten. Exemplarisch ist in Abb. 4.44 B) eine QCM-Messung in F-Puffer dargestellt, bei welcher $5,1 \mu\text{g} / \text{mL}$ F-Aktin (A) zu einer POPC / PIP_2 (97:3)-Membran gegeben wurden. Die Adsorption der Aktinfilamente wird durch den starken Abfall der Resonanzfrequenz um nahezu -550 Hz angezeigt. Durch Spülen des Systems mit Puffer (B) kommt es zu einer Desorption von gebundenem Protein, erkennbar an der Zunahme der Resonanzfrequenz um ca. 410 Hz, welche jedoch im betrachteten Zeitfenster keinen Endwert erreicht. Im Unterschied zu den QCM-Messungen, bei denen zuerst Ezrin bzw. die Ezrinmutanten adsorbiert wurden,

konnte bei Aktinzugabe zu einer reinen Membran immer ein reversibles Bindungsverhalten festgestellt werden.

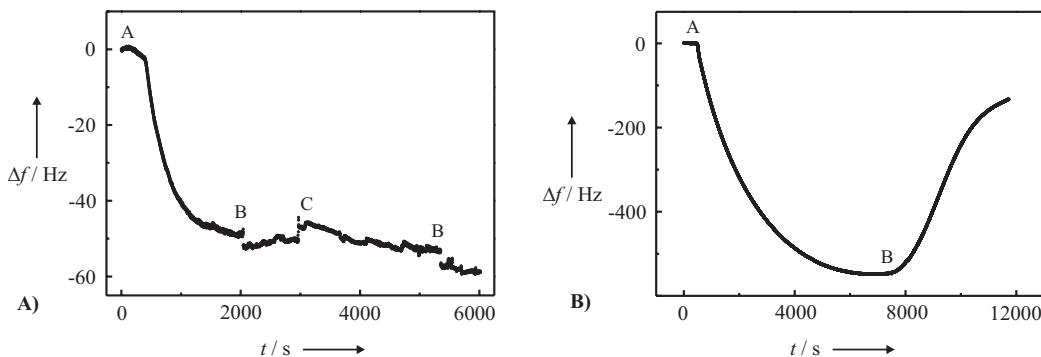


Abb. 4.44 QCM-Messungen, die in F-Puffer durchgeführt wurden. **A)** Adsorption von $0,12 \mu\text{M}$ Ezrin (A) an eine DOPC / Ni-DOGS (9:1)-Membran. Nach Spülen mit Puffer (B) erfolgte die Zugabe von $4,6 \mu\text{g} / \text{mL}$ F-Aktin (C). Im Anschluss wurde die Messzelle erneut mit Puffer gespült (B). **B)** Zugabe von $5,1 \mu\text{g} / \text{mL}$ F-Aktin zu einer reinen POPC / PIP₂ (97:3)-Membran mit anschließender Pufferspülung (B).

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die QCM-Technik keine geeignete Methode zur Untersuchung der Ezrin – F-Aktin Interaktion darstellt. Ein Hauptproblem dieser Technik stellt hierbei der Pumpkreislauf dar. Sowohl die Rollen der Peristaltikpumpe als auch die geringen Durchmesser der Schläuche führen zu einer nicht unerheblichen mechanischen Agitation der Aktinfilamente und könnten somit die Ursache dafür sein, dass die Filamente brechen. Dies würde die großen Unterschiede in der Aktinadsorption erklären, die möglicherweise auf einer unspezifischen Sedimentation der Filamente beruht. Sowohl bei der Ellipsometrie als auch bei der QCM-Technik handelt es um integrale Messmethoden, die entweder über einen Messfleck bzw. die Elektrodenfläche mitteln. Die beobachteten Unterschiede im Bindungsverhalten von F-Aktin könnten demzufolge auch eine Ursache einer heterogenen Oberfläche der Probe sein.

4.6.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Ezrin – F-Aktin-Interaktion

Da weder die QCM noch die Ellipsometrie reproduzierbare Ergebnisse bezüglich der Wechselwirkung von F-Aktin mit Ezrin lieferten, wurde die Interaktion beider Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Ein Vorteil dieser Methode im Vergleich zur QCM-Technik liegt darin, dass die Bindungsstudien in einem offenen System durchgeführt werden können und damit eine mechanische Agitation

der Aktinfilamente minimiert werden kann. Zusätzlich betrachtet man bei der Fluoreszenzmikroskopie einen lokalen Abschnitt der Probe und mittelt nicht über einen Bereich wie bei der Ellipsometrie oder der QCM-Technik.

Zur Visualisierung des F-Aktins macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass sich Phalloidin, das Gift des weißen Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, selektiv an F-Aktinfilamente anlagert. Durch Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Phalloidin ist es demnach möglich, Aktinfilamente mittels des Fluoreszenzmikroskops zu detektieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Alexa Fluor® 488 Phalloidin verwendet. Für alle durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde Aktin zwei Stunden bei Raumtemperatur polymerisiert. Durch einen PIP₂-Gehalt von 10 mol% wurde gewährleistet, dass die Membran möglichst vollständig mit Ezrin belegt war. Als Substrat für die festkörperunterstützten Membranen wurden hydrophilisierte Siliziumplättchen mit einer ~100 nm dicken Siliziumdioxidschicht verwendet.

In einem ersten Schritt sollte verifiziert werden, dass nach einer einstündigen Inkubationszeit mit den entsprechenden Vesikeln eine Membran resultiert. Um den Spreitvorgang zu initiieren und zu beschleunigen, wurde dem Puffer 1 mM CaCl₂ zugesetzt und zur Visualisierung der Membran das fluoreszenzmarkierte Lipid Texas Red® DHPE eingesetzt. Zur Entfernung überschüssiger Vesikel aus der Lösung wurde die Probe im Anschluss intensiv mit Puffer gespült. In Abb. 4.45 A) und B) sind typische Aufnahmen einer POPC / PIP₂ (9:1)-Membran mit einem Texas Red® DHPE-Gehalt von 0,5 mol% dargestellt. Man erkennt deutlich die Ausbildung einer homogenen Membran, wobei im zweiten Bild die Kante zwischen der festkörperunterstützten Membran und dem nicht fluoreszierenden Probenschälchen zu sehen ist.

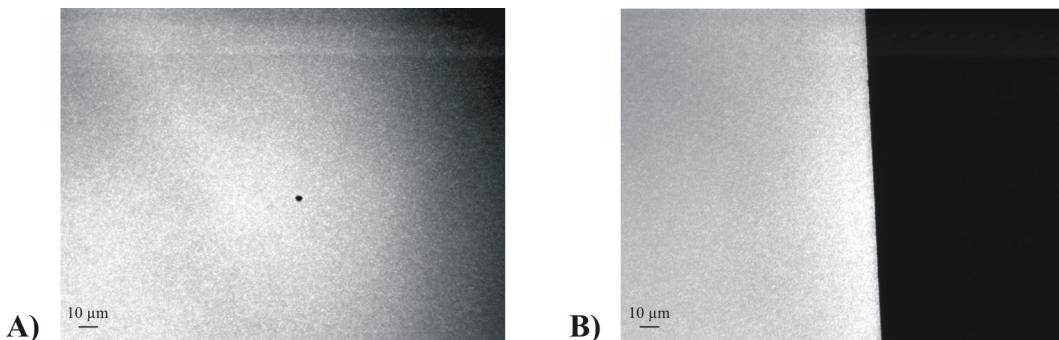


Abb. 4.45 Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer mit 0,5 mol% Texas Red® DHPE markierten POPC / PIP₂ (9:1)-Membran. **A)** Homogene, komplettete Belegung des Substrats mit der Membran. **B)** Kante zwischen der Membran (links) und dem Probenschälchen (rechts).

Um verlässliche Aussagen über die Ezrin – F-Aktin-Interaktion treffen zu können, ist es notwendig auszuschließen, dass Aktin unspezifisch an die Membran adsorbiert. Zu diesem Zweck erfolgte eine zweistündige Inkubation von F-Aktin bzw. G-Aktin mit einer POPC / PIP₂ (9:1)-Membran. Im Anschluss wurde die Probe vorsichtig mit der entsprechenden Pufferlösung gespült, um nicht-gebundenes Protein aus der überstehenden Lösung zu entfernen. Um eine mechanische Agitation der Filamente zu verhindern erfolgte der Austausch der Pufferlösung immer vom Rand der Probe aus. Abb. 4.46 A) zeigt eine typische Aufnahme, welche nach der Inkubation der Membran mit F-Aktin in F-Puffer zu beobachten war. Es wurde keine Fluoreszenz detektiert. Dies bedeutet, dass F-Aktin nicht unspezifisch an die Membran adsorbiert, was eine wichtige Voraussetzung für die nachfolgenden Experimente ist. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern die POPC / PIP₂ (9:1)-Membran befähigt ist, die Polymerisation von F-Aktin zu induzieren. In Abb. 4.46 B) ist ein repräsentativer Abschnitt einer Membran dargestellt, die mit G-Aktin in G-Puffer inkubiert wurde. Es sind keine fluoreszierenden Partikel erkennbar. Da Phalloidin selektiv F-Aktin markiert, ist eine Aussage, ob G-Aktin unspezifisch an die Membran adsorbiert nicht möglich. Allerdings ist deutlich zu sehen, dass die Membran keine Polymerisation von G-Aktin induziert, was ebenso eine wichtige Erkenntnis für die folgenden Versuche war.

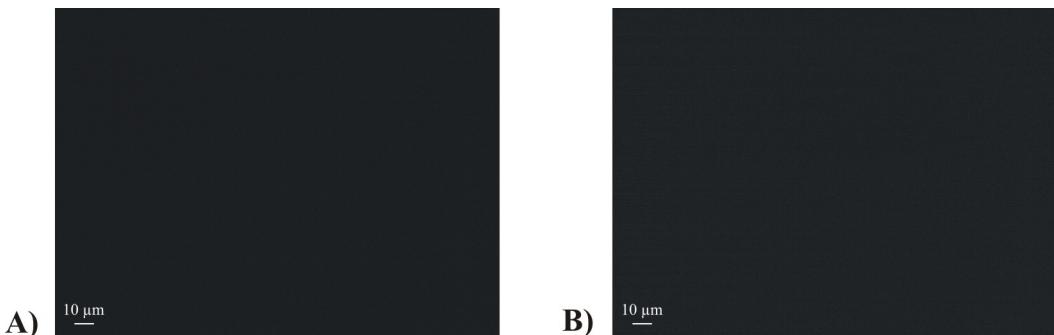


Abb. 4.46 Repräsentative Aufnahmen einer POPC / PIP₂ (9:1)-Membran, welche mit **A)** F-Aktin in F-Puffer und mit **B)** G-Aktin in G-Puffer inkubiert wurde.

Um die Spezifität des fluoreszenzmarkierten Phalloidins für F-Aktin zu verifizieren, erfolgten Messungen, bei welchen der Fluorophor mit einer reinen Membran und mit membrangebundenem Ezrin inkubiert wurde. Zu diesem Zweck wurden 0,24 µM Ezrin in Anwesenheit von 5 µL Alexa Fluor® 488 Phalloidin zwei Stunden auf einer POPC / PIP₂ (9:1)-Membran in F-Puffer inkubiert. Nachdem die Probe gründlich mit Puffer gespült wurde, lässt sich keine Fluoreszenz detektieren [Abb. 4.47 A)]. Somit kann eine Bindung zwischen Ezrin und dem Fluorophor ausgeschlossen werden. Durch die Inkubation einer reinen POPC / PIP₂ (9:1)-Membran mit Alexa Fluor® 488 Phalloidin über zwei Stunden sollte untersucht werden, ob eine Wechselwirkung des Fluorophors mit der Membran, oder eine etwaige intermolekulare Aggregation des Phalloidins auftritt. In Abb. 4.47 B) ist ein typisches Bild eines solchen Experiments dargestellt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass, abgesehen von einem fluoreszierenden Staubpartikel, keine Fluoreszenz detektiert werden kann.

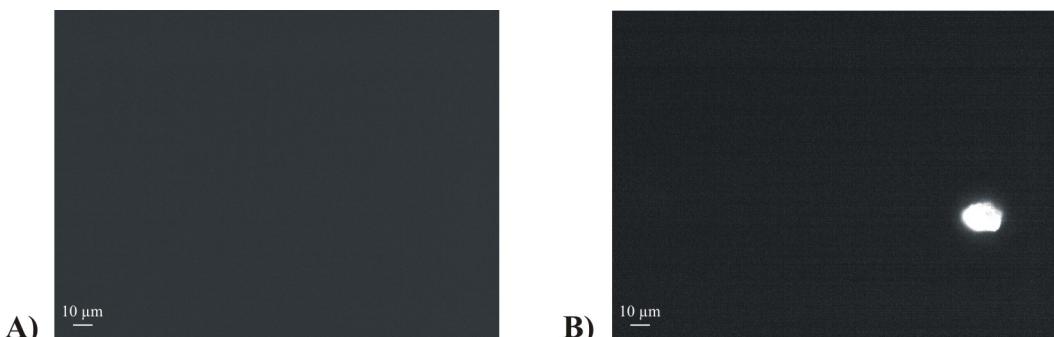


Abb. 4.47 Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von festkörperunterstützten POPC / PIP₂ (9:1)-Membranen in F-Puffer. **A)** Zugabe von Alexa Fluor® 488 Phalloidin zu membrangebundenem Ezrin. **B)** Inkubation der reinen Membran mit Alexa Fluor® 488 Phalloidin.

Neben der Eigenschaft von Ezrin, F-Aktin zu binden sollte untersucht werden, ob Ezrin auch in der Lage ist, die Bildung von Aktinfilamenten zu induzieren. Zuerst wurde $0,24 \mu\text{M}$ Ezrin auf eine POPC / PIP₂ (9:1)-Membran adsorbiert. Nachdem die Probe zur Entfernung überschüssigen Proteins mit G-Puffer gespült wurde, erfolgte die Inkubation mit $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ G-Aktin und $5 \mu\text{L}$ Fluorophor. Nach 1,5 Stunden wurde vorsichtig mit G-Puffer gespült und die Probe fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Exemplarische Aufnahmen sind in Abb. 4.48 A) und B) gezeigt. Da auf der gesamten Fläche keine Fluoreszenz detektierbar ist, erfolgte demzufolge keine Bildung von Aktinfilamenten. Membrangebundenes Ezrin ist somit nicht befähigt, monomeres Aktin zu polymerisieren.

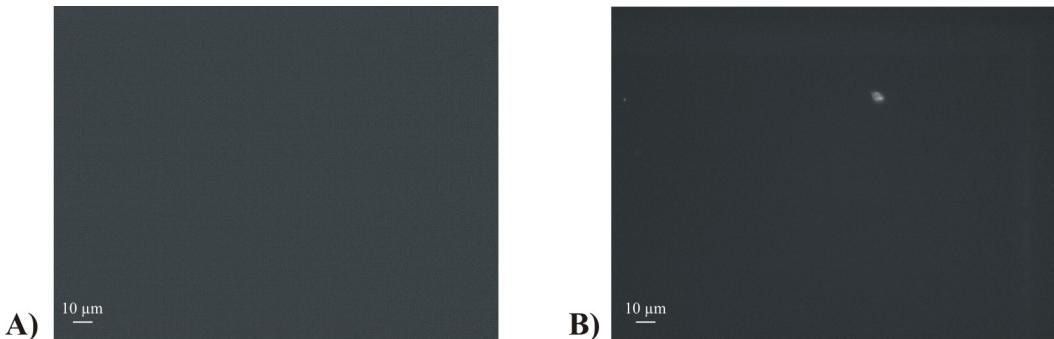


Abb. 4.48 Typische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, die zeigen, dass an eine POPC / PIP₂ (9:1)-Membran adsorbiertes Ezrin nicht in der Lage ist, die Polymerisierung von Aktin zu induzieren.

Anschließend sollte der Einfluss von PIP₂ auf die Aktivierung von Ezrin untersucht werden. Die Interaktion des Lipids mit Ezrin könnte in einer intramolekularen Dissoziation der N-terminalen und der C-terminalen Domäne resultieren und somit den Aktinfilamenten einen Zugang zu der in C-ERMAD lokalisierten Aktinbindungsstelle bieten. Durch die Möglichkeit die Aktinfilamente mittels Phalloidin zu markieren und somit zu visualisieren, sollte die Fluoreszenzmikroskopie in diesem Fall einen eindeutigen Nachweis der Ezrin – F-Aktin-Interaktion erlauben. Zu diesem Zweck wurde zuerst $0,24 \mu\text{M}$ Ezrin an festkörperunterstützte POPC / PIP₂ (9:1)-Membranen adsorbiert, die basierend auf den QCM und Ellipsometriemessungen eine vollständige Belegung der Oberfläche mit Protein garantiert. Die Entfernung nicht-gebundenen Proteins erfolgte durch gründliches Spülen mit F-Puffer aus der Lösung. Im Anschluss wurde die Probe für zwei Stunden mit $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ F-Aktin, welches durch Alexa Fluor® 488 Phalloidin markiert war, inkubiert. Um einer Zerstörung der Filamente vorzubeugen, wurde die

Probe vorsichtig mit F-Puffer gespült und anschließend mittels dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. In Abb. 4.49 A) bis F) sind typische Aufnahmen aus verschiedenen Probenpräparationen dargestellt, wobei die Durchführung exakt gleich war. Bei allen Proben tritt deutlich Fluoreszenz auf, die durch die Adsorption von F-Aktin an membrangebundenes Ezrin bedingt wird. Es fällt auf, dass der Aufbau und die Form des Aktins sehr heterogen ist. Zum einen konnten stäbchenartige bzw. filamentartige Proteine beobachtet werden [A), C), D)], die teilweise eine nahezu homogene Proteinschicht ausbildeten [E), F)], zum anderen waren relativ große netzwerkartige Strukturen erkennbar [A), B)]. Typischerweise betrug die Länge des stäbchenförmigen Aktins 1 – 2 μm und das Protein war in einer Ebene lokalisiert [C'), D') vergrößerte Bereiche von C) und D)]. Im Gegensatz dazu ragten die gerüstartigen Aktinstrukturen bis weit in die überstehende Pufferlösung ein und erreichten teilweise Ausmaße von mehreren hundert Mikrometern [C)]. Das kombinierte Auftreten dieser beiden Aktinspezies ist besonders gut in Bild A) zu beobachten: Eine Schicht stäbchenförmiger Aktinfilamente befindet sich in der Membranebene, während größere, netzwerkartige Aktinstrukturen an dieser adsorbiert sind. Neben diesen beiden Aktinspezies konnte noch eine dritte Form der Aktinadsorption beobachtet werden, die wahrscheinlich auf einer dichteren Packung der Aktinfilamente beruht. Wie insbesondere in Bild E) erkennbar, bildete Aktin eine lateral homogene, nahezu vollständige Proteinschicht auf dem membrangebundenem Ezrin aus. Aufnahme F) zeigt den Übergang dieser Proteinschicht zu einem Bereich der Probe, auf welchem keine Aktinadsorption auftrat. Insgesamt lässt sich zweifelsfrei eine Wechselwirkung von membrangebundenem, PIP₂-aktiviertem Ezrin mit F-Aktin nachweisen. Da Ezrin nur in seiner aktivierte Form befähigt ist, Aktinfilamente zu binden, sprechen die hier dargestellten Ergebnisse für einen entscheidenden Einfluss von PIP₂ auf den Aktivierungsprozess.

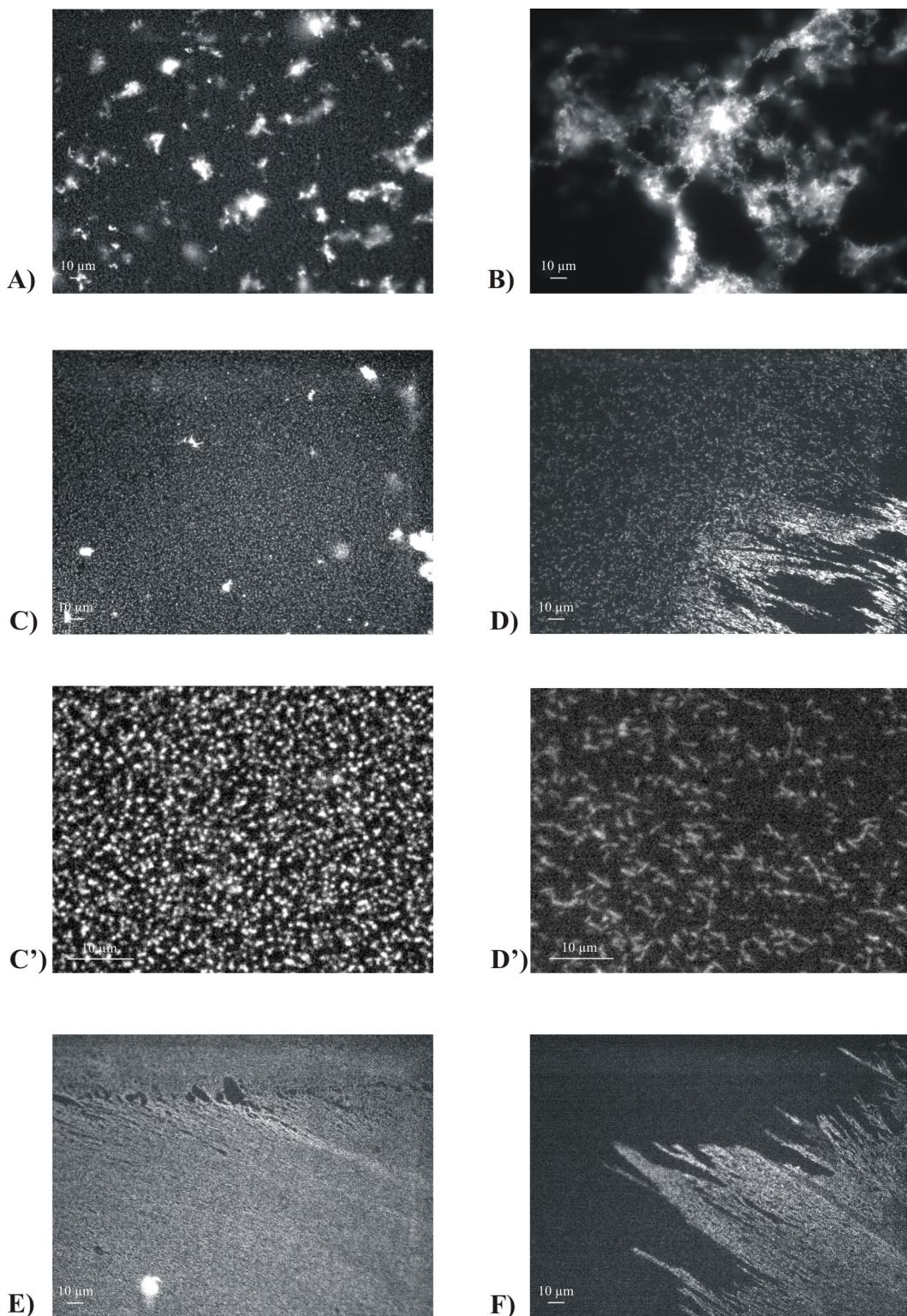


Abb. 4.49 Typische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von membrangebundenem Ezrin, welches mit fluoreszenzmarkiertem F-Aktin inkubiert wurde. Bei allen Messungen wurden festkörperunterstützte POPC / PIP₂ (9:1)-Membranen in F-Puffer eingesetzt. A), C), D) Ausbildung stäbchenartiger Aktinfilamente. C'), D') Vergrößerte Bereiche von C) und D). A), B) Ausbildung großer, gerüstartiger Aktinaggregate. E), F) Ausbildung einer nahezu homogenen Aktinschicht.

Da die Polymerisierung von G-Aktin zu F-Aktin ein reversibler Prozess ist, folgte der Versuch, die an Ezrin adsorbierten Aktinfilamente durch einen Wechsel des

Puffers wieder in monomeres G-Aktin zu überführen. Dazu wurde die Probe vorsichtig mit G-Puffer gespült, um eine Depolymerisierung der Filamente zu induzieren. Im Anschluss wurde die Probe erneut fluoreszenzmikroskopisch untersucht. In Abb. 4.50 A) und B) sind typische Ergebnisse nach dem Spülvorgang dargestellt. Insgesamt lässt sich eine deutliche Verringerung der Fluoreszenzintensität detektieren, was auf einen Abbau des polymeren Proteins in seine Monomere zurückzuführen ist, da an diese der eingesetzte Fluorophor nicht binden kann. Allerdings konnte keine vollständige Depolymerisierung der Aktinfilamente erreicht werden. So wechselten sich Bereiche auf der Probe in denen nahezu keine Fluoreszenz detektierbar war [A)] mit Bereichen höherer Fluoreszenz [B)] ab.

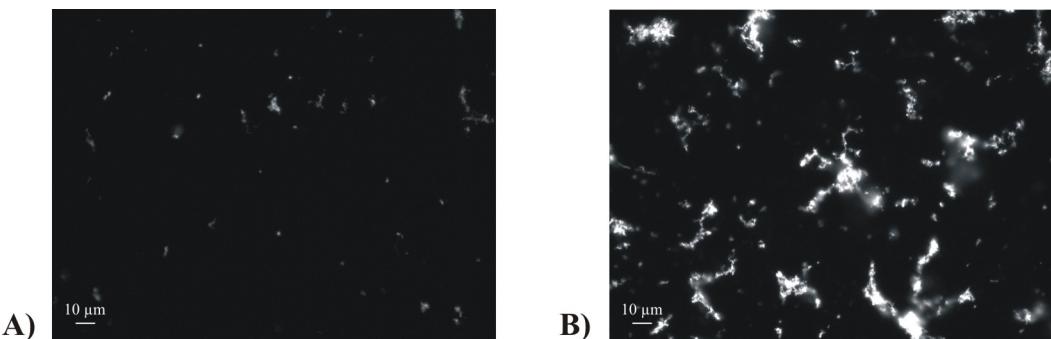


Abb. 4.50 Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen von Proben, die nach erfolgter F-Aktinadsorption an membrangebundenes Ezrin mit G-Puffer gespült wurden. **A)** Bereich niedriger Fluoreszenz. **B)** Bereich höherer Fluoreszenz.

Um einen eindeutigen Beweis zu liefern, dass PIP₂ der entscheidende Faktor bei der Aktivierung von Ezrin ist, wurde in Analogie zu den QCM- und Ellipsometriemessungen Ezrin über seinen His-Tag an eine Ni²⁺-Lipid-haltige Membran fixiert. Da dieser Adsorptionsprozess an eine PIP₂-freie Membran erfolgt, sollte eine Aktivierung von Ezrin auf diesem Weg nicht möglich sein. In Analogie zu den oben durchgeführten Fluoreszenzmessungen wurde zunächst überprüft, inwieweit eine unspezifische Adsorption von F-Aktin an DOPC / Ni-DOGS (9:1)-Membranen stattfindet. Ebenso wurde verifiziert, dass die Membran nicht die Polymerisierung von G-Aktin zu Aktinfilamenten induziert. Beide Messungen wurden unter identischen Bedingungen, wie sie bei den PIP₂-haltigen Membranen vorlagen, durchgeführt. In beiden Fällen konnte keine Fluoreszenz auf der Probe

detektiert werden. Es findet also weder eine unspezifische Adsorption von F-Aktin, noch eine Induzierung der Filamentbildung statt.

Für die Untersuchung, ob Ezrin auch PIP₂-unabhängig Aktinfilamente binden kann, wurde zuerst 0,24 µM Ezrin auf eine DOPC / Ni-DOGS (9:1)-Membran adsorbiert. Durch QCM und Ellipsometriemessungen konnte gezeigt werden, dass diese Lipidkomposition eine fast vollständige Belegung der Oberfläche mit Ezrin garantiert. Nachdem überschüssiges Protein durch Spülen mit F-Puffer entfernt wurde, erfolgte die Zugabe von 50 µg / mL fluoreszenzmarkiertem F-Aktin. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurde die Probe vorsichtig mit Puffer gespült und im Anschluss fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Abb. 4.51 A) und B) zeigen exemplarisch typische Aufnahmen der Proben. Es ist neben vereinzelt auftretenden fluoreszierenden Partikeln nahezu keine Fluoreszenz detektierbar. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass keine Interaktion zwischen über His-Tag adsorbiertem Ezrin und den Aktinfilamenten stattfindet und unterstreicht die Rolle von PIP₂ in Bezug auf den Aktivierungsprozess von Ezrin.

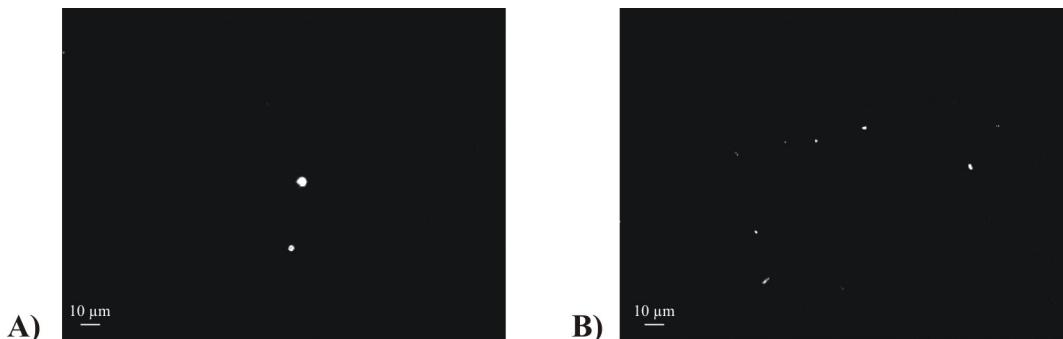


Abb. 4.51 Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer DOPC / Ni-DOGS (9:1)-Membran, an welche Ezrin in F-Puffer adsorbiert und fluoreszenzmarkiertes F-Aktin appliziert wurde. **A), B)** In beiden Fällen ist nur eine geringe Intensität der Fluoreszenz detektierbar.

Um den Unterschied der F-Aktinadsorption zwischen PIP₂-gebundenem und Ni-DOGS-gebundenem Ezrin zu quantifizieren, wurde die Oberflächenbelegung der Aktinfilamente mittels einer auf Helligkeitsunterschiede basierenden Pixelanalyse bestimmt. Dabei resultiert ein Belegungsgrad des F-Aktins von $(24 \pm 18)\%$ für die PIP₂-dotierte Membran, während sich für die Ni-DOGS-dotierte Membran ein Wert von $(0,3 \pm 0,2)\%$ ergibt (Abb. 4.52). Die relativ hohen Fehler sind auf den heterogenen Belegungsgrad innerhalb der Proben zurückzuführen. Insgesamt belegen

die ermittelten Werte eindeutig den Einfluss von PIP_2 auf den Aktivierungsprozess von Ezrin.

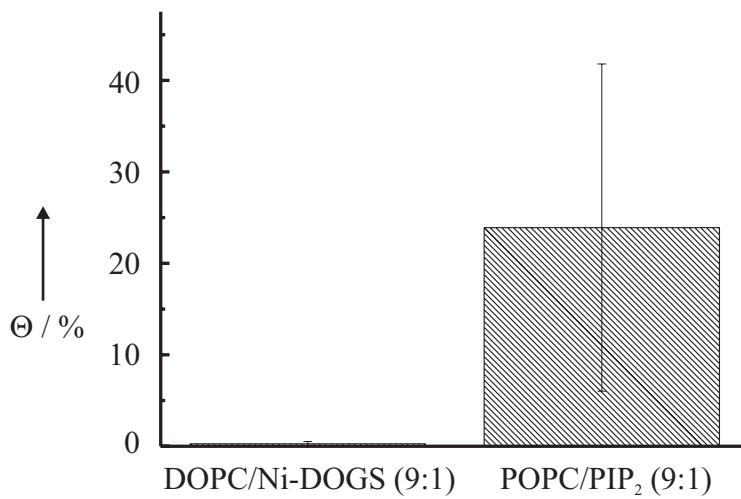


Abb. 4.52 Vergleich des Belegungsgrades von F-Aktin auf membrangebundenem Ezrin. Die dargestellten Ergebnisse für die DOPC / Ni-DOGS (9:1)-Membran basieren auf 4 unabhängigen Messungen, von denen insgesamt 15 Probenstellen in die Auswertung eingeflossen sind. Der Mittelwert, der sich für die POPC / PIP_2 (9:1)-Membran ergibt, basiert auf 5 unabhängigen Aufnahmen, bei denen insgesamt 60 Probenstellen berücksichtigt wurden.

5 DISKUSSION

5.1 Diskussion der Proteinisolierungen

5.1.1 Isolierung der 6 × His-fusionierten Proteine N-ERMAD und Ezrin

N-EMRAD wurde nach einer Vorschrift von Koltzscher et al.²⁹ rekombinant in *E. coli* exprimiert und affinitätschromatographisch über eine Ni-NTA-Agarose Säule aufgereinigt. Dabei konnten mit einer Reinheit von über 95 % durchschnittlich 3,6 mg Protein aus 250 mL Kulturmedium isoliert werden. Um eine proteolytische Degradation des Protein zu unterbinden, wurden sämtliche Aufreinigungsschritte bei 4 °C durchgeführt. Die zusätzliche Verwendung von Proteaseinhibitoren garantierte eine hohe Reinheit des Proteins. Dies war daran zu erkennen, dass nahezu keine Proteinfragmente in den SDS-Gelen detektierbar waren und somit N-ERMAD komplett und in guter Ausbeute isoliert werden konnte.

Ezrin wurde nach einer Vorschrift von Koltzscher et al.²⁹ rekombinant in *E. coli* Bakterien exprimiert und affinitätschromatographisch über eine Ni-NTA-Agarose Säule aufgereinigt. Dabei konnten mit einer Reinheit von etwa 85 % durchschnittlich 4 mg Protein aus 200 mL Kulturmedium isoliert werden. Während des Aufreinigungsprozesses und der anschließenden Lagerung des Proteins musste darauf geachtet werden, dass die Protein-haltigen Lösungen immer einer Temperatur von 4 °C ausgesetzt waren und nicht eingefroren wurden. Dies ist wichtig, da bekannt ist, dass durch Einfrieren von Ezrin dessen Aktivität bzw. Aktivierbarkeit stark beeinträchtigt¹⁶ wird. Um dem proteolytischen Abbau des Proteins entgegenzuwirken, wurden alle Isolationsschritte bei 4 °C und unter Verwendung von Proteaseinhibitoren durchgeführt. In den SDS-Gelen war eine prägnante Proteinbande bei ~82 kDa zu erkennen, welche Ezrin entspricht. Die Position der Bande im Gel erscheint zunächst ungewöhnlich, da eine Summation der einzelnen Molekulargewichte der Aminosäuren einen Wert von ~70 kDa ergibt. Dieses Phänomen ist in der Literatur bekannt, weshalb Ezrin anfangs auch, aufgrund seiner Position in SDS-Gelen, als p81 bezeichnet wurde^{6; 7}. Durch Zentrifugationsexperimente konnte gezeigt werden, dass Ezrin parallel mit Proteinen, die ebenfalls ein Molekulargewicht von etwa 70 kDa aufweisen, sedimentiert⁶. Zusätzlich ist eine eindeutige Identifizierung des Proteins mittels

Immunopräzipitation mit Anti-Ezrin Serum beschrieben⁷. Die Diskrepanz zu der Position des Proteins im SDS-Gel wird durch die relative hohe Eigenladung, sowie durch die Heptaprolin-Sequenz im α -helikalen Teil des Proteins erklärt^{104; 105}.

Neben der Ezrinbande waren im SDS-Gel mehr oder weniger stark ausgeprägte niedermolekulare Verunreinigungen erkennbar. Auch ein wiederholter Aufreinigungsschritt über eine Ni-NTA-Agarose Säule führte nicht zu einer gewünschten Verminderung der Kontaminierungen. Mittels gegen den His-Tag gerichteter Antikörper konnte gezeigt werden, dass nahezu alle Verunreinigungen C-terminal verkürzte Ezrinfragmente sind. Somit war eine weitere Aufreinigung über eine Ni-NTA-Matrix nicht möglich. Stattdessen wurde versucht, aufgrund von eventuell vorhandenen Ladungsunterschieden der Proteinfragmente durch Ionenaustauschchromatographie die Verunreinigungen abzutrennen. Allerdings führte auch dieser Ansatz nicht zu einer höheren Reinheit von Ezrin, da alle an die Säule gebundenen Protein bei der gleichen Ionenstärke coeluierten. Da Ezrin jedoch den dominierenden Anteil der eluierten Proteinlösungen mit einer Reinheit von etwa 85 % darstellte, ist die Verwendung des Proteins für die biophysikalischen Untersuchungen gerechtfertigt.

Abschließend sollte noch geklärt werden, ob die Abbaubanden von Ezrin bereits in der Bakterienzelle vorlagen oder erst während der Isolierung entstanden sind. Zu diesem Zweck wurde Ezrin über einen Zeitraum von einer Stunde bei 37°C ohne Zusatz von Proteaseinhibitoren inkubiert. So konnte gezeigt werden, dass über den betrachteten Zeitraum keine weitere Intensivierung der Proteinfragmente auftrat. Dies legt den Schluss nahe, dass die beobachteten Verunreinigungen bereits in den *E. coli* Zellen vorlagen und nicht durch proteolytischen Abbau während der Isolierung entstanden.

5.1.2 Isolierung der GST-fusionierten Protein EzrinT567D, EzrinT567A und N-ERMAD

Die beiden Ezrinmutanten T567D und T567A wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und affinitätschromatographisch über eine Glutathion-Sepharose Säule aufgereinigt. Durch den Austausch des Threoninrests in der C-terminalen Domäne von Ezrin gegen Aspartat soll eine konstitutiv aktive Mutante, durch den Austausch gegen Alanin eine inaktive und inaktivierbare Mutante simuliert werden. Dabei konnten mit einer Reinheit von über 90 % durchschnittlich 0,5 mg EzrinT567D aus

250 mL Kulturmedium isoliert werden. Die Ausbeute an EzrinT567A betrug bei einer Reinheit von über 90 % durchschnittlich 0,2 mg pro 250 mL Kulturmedium. Da bei diesen beiden Mutanten das Problem der Deaktivierung durch Einfrieren nicht bestand, konnten zum Zellaufschluss Einfrier-Auftau Zyklen eingesetzt werden. Um einem proteolytischen Abbau der Proteine entgegenzuwirken, wurden alle Isolationsschritte bei 4 °C sowie unter Zusatz von Proteaseinhibitoren durchgeführt. Insgesamt konnten die beiden Mutanten nur in relativ geringer Ausbeute gewonnen werden.

N-ERMAD wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert und affinitätschromatographisch über eine Glutathion-Sepharose Säule aufgereinigt. Dabei konnten mit einer Reinheit von über 95 % durchschnittlich 3 mg Protein aus 250 mL Kulturmedium isoliert werden. Um einen möglicherweise störenden Einfluss des GST-*Tags* bei den durchgeföhrten Bindungsstudien auszuschließen, wurde dieser mittels proteolytischer Abspaltung durch Thrombin entfernt. Vor der Inkubation des an die Säulenmatrix fixierten Proteins mit Thrombin konnte im SDS Gel eine deutliche Bande mit einem Molekulargewicht von ~63 kDa nachgewiesen werden. Diese Proteinbande entspricht dem GST-fusionierten N-ERMAD. Nach der Inkubation des Proteins mit Thrombin wurde durch Zugabe des Proteaseinhibitors PMSF ein weiterer Abbau von N-ERMAD verhindert werden. Nach der Zentrifugation des Säulemmaterials konnte unfusioniertes N-ERMAD im Überstand als ~36 kDa Bande mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden und zeigt somit die erfolgreiche Abspaltung von GST an, ohne dass dabei N-ERMAD weiter proteolytisch abgebaut wurde.

5.1.3 Isolierung von 6 × His-fusionierten S100P

Die Genexpression in *E. coli* und die Aufreinigung von S100P wurden nach einer Vorschrift von Koltzscher et al.²⁹ durchgeführt. Dabei konnten mit einer Reinheit von über 99 % durchschnittlich 50 mg Protein aus 200 mL Kulturmedium isoliert werden. Die Isolierung des Proteins aus Primärgewebe (menschliche Plazenta) wurde erstmals von Becker et al.¹⁰¹ beschrieben. Um einen proteolytischen Abbau des Proteins während der Aufreinigungsschritte zu unterbinden, erfolgte der Zusatz von Proteaseinhibitoren, sowie die Einhaltung eines Temperaturmaximums von 4 °C. Zur Aufreinigung des aus den Bakterien isolierten dimeren S100P wurden zwei verschiedenen Säulenmatrices verwendet. In einem ersten Schritt wurde S100P mittels einer Phenylsepharose-Säule aufgereinigt, wobei man sich die

unterschiedlichen Konformationen des Proteins im Ca^{2+} beladenen, hydrophoberen und im Ca^{2+} freien, hydrophileren Zustand zu Nutze macht³⁰. Im Anschluss wurde das Protein affinitätschromatographisch über eine Ni-NTA-Agarose Säule aufgereinigt. Auf diese Weise konnte intaktes S100P in einer hervorragenden Ausbeute isoliert werden.

5.2 Diskussion der Membranbindungeigenschaften von Ezrin

Die Untersuchung der Wechselwirkung von Ezrin und N-ERMAD mit PIP₂ erfolgte sowohl mit Hilfe von Vesikelpelletierungsassays als auch mit der QCM-Technik, die sich als eine sensitive und zerstörungsfreie Messmethode zur Quantifizierung von Protein–Lipid Interaktionen bewährt hat^{78; 106; 107}. Da die Bindung von Ezrin an PIP₂ durch ein lysinreiches Bindungsmotif in der N-terminalen Domäne des Proteins vermittelt wird^{18; 20; 47}, wurde die Spezifität der PIP₂-Bindung sowohl für Ezrin als auch für N-ERMAD untersucht. Durch die Vesikelassays sowie durch die QCM-Messungen konnte gezeigt werden, dass Ezrin und N-ERMAD nicht an reine POPC-Membranen binden. Die Spezifität der Proteine für PIP₂ zeigte sich dadurch, dass mit steigendem PIP₂-Gehalt in den Vesikeln der Anteil des pelletierten Proteins anstieg, wobei bei einem PIP₂-Gehalt von 1 % nur N-ERMAD in detektierbaren Mengen an die Vesikel adsorbierte. Durch Messungen mit der QCM, welche die Detektion von Massenänderungen im Nanogramm-Maßstab erlaubt, wurde die Spezifität von Ezrin für PIP₂ bestätigt. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Untersuchungen von Niggli et al.⁴⁶, die eine Interaktion zwischen Ezrin bzw. der N-terminalen Domäne von Ezrin mit PIP₂ nachgewiesen haben. In dieser Studie wurde mittels Vesikelcopelletierungssassays nachgewiesen, dass Ezrin zwischen PIP₂ und anderen negativ geladenen Phospholipiden (PIP, PI, PS) diskriminiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass die PIP₂-Bindung über die N-terminalen Domäne vermittelt wird, da nur mit N-EMRAD eine Kopelletierung erfolgte, während mit C-EMRAD keine Interaktion mit PIP₂ beobachtet werden konnte. Einen weiteren Beweis, dass die Wechselwirkung von Ezrin mit PIP₂ über die N-terminalen Domäne vermittelt wird, liefern Barret et al., welche die Membranbindungeigenschaften von Ezrinmutanten untersuchten²⁰. Durch Mutation bestimmter Lysinreste zu Asparagin in der N-terminalen Domäne, wurde die Interaktion des Proteins mit PIP₂ drastisch reduziert. Durch Transfektion von A431- und COS1-Zellen mit den Ezrinmutanten konnte gezeigt werden, dass die Ezrinmutanten im Cytosol verbleiben und nicht an Zellmembranen lokalisiert sind. Die Fähigkeit von Ezrin bzw. N-ERMAD mit PIP₂-dotierten Membranen zu interagieren ist vergleichbar mit den nah verwandten Proteinen Talin und Protein 4.1, bei welchen ebenfalls eine Wechselwirkung über den N-terminalen Rest mit sauren Phospholipiddoppelschichten beobachtet wurde^{108; 109}. Dies verdeutlicht den konservierten Aufbau der N-terminalen Domäne innerhalb

der Proteinfamilie und unterstreicht die Bedeutung der FERM-Domäne bei der Wechselwirkung mit Membranen. Entsprechend dem Anteil von PIP₂ in natürlichen Zellen^{32; 110}, wurden alle nachfolgenden Untersuchungen an POPC-Membranen, die einen PIP₂-Gehalt von 3 mol% aufwiesen, durchgeführt. Durch Ermittlung der Resonanzfrequenzänderung im Gleichgewichtzustand konnten sowohl für Ezrin als auch für N-ERMAD Adsorptionsisothermen aufgestellt werden, die bei N-ERMAD einen deutlichen, bei Ezrin einen tendenziellen Sättigungsverlauf zeigen. Bemerkenswerterweise konnte die Adsorptionsisotherme von Ezrin nicht mit einem auf Langmuir-basierenden Modell beschrieben werden, während dies bei N-EMRAD möglich war. Eine wichtige Voraussetzung für die Beschreibung der Daten mittels einer Langmuir-Isotherme besteht in der völligen Reversibilität der Bindung. Aus diesem Grund wurde die Reversibilität der Bindung von Ezrin und N-EMRAD an PIP₂-haltigen Membranen mittels QCM-Technik untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl bei Ezrin als auch bei N-EMRAD Desorption in geringem Maßstab stattfindet, jedoch der größte Teil des Proteins irreversibel an der Oberfläche gebunden bleibt. Aus diesem Grund ist eine Langmuir-basierende Beschreibung der Adsorption nicht gerechtfertigt.

Eine Möglichkeit, welche die Ausbildung einer irreversiblen Bindung erklären könnte, besteht darin, dass das Protein über mehrere PIP₂-Moleküle an die Membran gebunden wird (siehe Abb. 5.1). So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Ezrin an PIP₂ auf der Wechselwirkung spezifischer Lysinreste basiert, welche in den Subdomänen I bzw. III der N-terminalen Domäne des Proteins lokalisiert sind²⁰. Durch atomare Modelle konnte demonstriert werden, dass die Bindung von nur einem Molekül PIP₂ eher unwahrscheinlich ist, sondern dass die Bindung von Ezrin an die Membran möglicherweise über mehrere PIP₂-Moleküle vermittelt wird⁴⁷. Somit könnte, obwohl eine einzelne Bindung einen reversiblen Charakter aufweist, dennoch insgesamt eine irreversible Bindung resultieren, die auf dem Vorhandensein multipler Bindungsstellen beruht. Ein weiteres Indiz, das diese Hypothese stützt, ergibt sich aus der Beobachtung, dass basische Aminosäuren in Proteinen PIP₂-Moleküle in den entsprechenden Membranbereichen anreichern¹¹¹. Ein prominentes Beispiel, das in dieser Weise fungiert ist MARCKS (*myristoylated alanine-rich C kinase substrate*). Durch elektrostatische Wechselwirkung ist dieses Protein in der Lage PIP₂ zu binden und in bestimmten Membranabschnitten anzureichern⁴⁵. Ein weiteres Beispiel, bei welchem eine kooperative, multivalente Bindung beobachtet

wurde, ist N-WASP (*neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*)¹¹². Dieses Protein besitzt einen ähnlichen Aufbau wie Ezrin und übt eine ähnliche Funktion aus. Analog zu Ezrin, liegt N-WASP in einer inaktiven Konformation vor, bei welcher die Bindungsstellen der einzelnen Domänen gegenseitig inhibiert werden. Durch Wechselwirkung mit PIP₂ und/oder der GTPase Cdc42 resultiert eine Aktivierung des Proteins und N-WASP kann die Aktinpolymerisation regulieren. Dabei wird die Bindung zu PIP₂, ähnlich wie bei Ezrin, über ~10 basische Aminosäuren vermittelt. Die Effekte der beiden beschriebenen Beispiele könnten auch bei Ezrin bzw. N-ERMAD auftreten und dazu beitragen, dass PIP₂-Moleküle unter dem Protein angereichert werden und so multiple Bindungen ausgebildet werden könnten, welche die beobachtete Irreversibilität der Bindung erklären könnte. Dies würde die Membran in bestimmten Bereichen an PIP₂ verarmen lassen und somit eine weitere Adsorption stark eingeschränken. Mittels SFM-Messungen wurde gezeigt, dass bei einem PIP₂-Gehalt von 3 mol% oder mehr, eine nahezu komplett Bedeckung der Oberfläche mit Protein resultiert. Berechnet man die theoretische Belegung der Oberfläche mit Ezrin unter der Annahme, dass ein PIP₂-Molekül eine Fläche von 70 Å² einnimmt¹¹³ und jeweils ein Ezrinmolekül bindet, welches eine Fläche von etwa 5000 Å² bedeckt^{17; 18}, so ergibt sich eine komplett Belegung der Oberfläche bei einem PIP₂-Gehalt von 2 mol%. Verglichen mit einem Wert von ca. 30 %, der durch die statistische Auswertung der SFM-Daten bei einem PIP₂-Gehalt von 2 mol% ermittelt wurde, zeigt sich eine deutliche Abweichung zu dem theoretischen Wert. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte, neben experimentellen Unsicherheiten, die bevorzugte Lokalisierung von PIP₂-Molekülen unter Ezrinmolekülen sein. Auch bei den durchgeführten QCM-Messungen, bei denen Ezrin an Membranen mit unterschiedlichen PIP₂-Gehalten adsorbiert wurde, ist eine deutliche Zunahme der Resonanzfrequenzänderung zwischen 2 mol% PIP₂ und 3 mol% PIP₂ zu beobachten und stützt somit die postulierte Anreicherung von PIP₂-Molekülen unter dem Protein.

Der beobachtete reversibel adsorbierte Anteil von Ezrin und N-ERMAD könnte demnach dadurch zu erklären sein, dass diese Proteinspezies nur über ein einzelnes PIP₂-Molekül gebunden sind und durch die Spülung mit Puffer leicht von der Membran desorbieren. Während die Irreversibilität der Bindung bei Ezrin neben einer möglichen Bindung mehrerer PIP₂-Moleküle zusätzlich über die laterale, intermolekulare Interaktion der Proteine auf der Oberfläche zustande kommt, ist

diese Möglichkeit, wie weiter unten diskutiert, bei N-ERMAD weniger wahrscheinlich. In diesem Zusammenhang wären Studien von Interesse, bei welchen bei verschiedenen PIP₂-Gehalten der Belegungsgrad der Membran mit N-EMRAD ermittelt würde. Obwohl solche Messungen im Rahmen dieser Arbeit nicht bzw. nicht detailliert genug durchgeführt wurden, deuten die bisher erzielten Ergebnisse dennoch darauf hin, dass der irreversibel gebundene Anteil von N-ERMAD ausschließlich auf einer Wechselwirkung des Proteins mit mehreren PIP₂-Molekülen basiert.

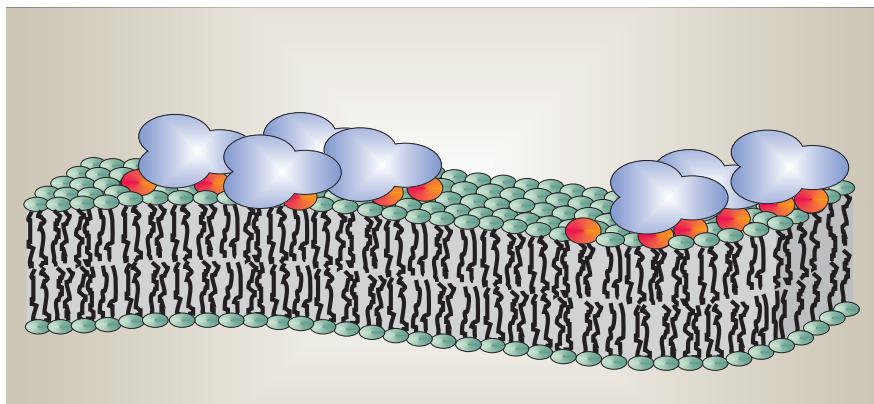


Abb. 5.1 Modell, welches den irreversiblen Bindungscharakter von N-EMRAD beschreibt. Es wird angenommen, dass die Irreversibilität durch multiple Bindungen des Proteins an PIP₂ bedingt wird. Dieser Effekt führt zu einer Verarmung von bestimmten Membranbereichen an PIP₂.

Neben der Möglichkeit, dass die beobachtete irreversible Bindung auf der Wechselwirkung mit mehreren PIP₂-Moleküle basiert, könnte dieses Phänomen auch durch eine positiv laterale Kooperativität bedingt werden. Um den beobachteten irreversibel gebundenen Protein-Anteil adäquat zu beschreiben, wurde versucht die Adsorptions- sowie die Desorptionverläufe mittels eines von Minton^{97; 98} entwickelten kinetischen Modells nachzustellen. Die Kernidee des Modells besteht in der Ausbildung von Proteindomänen, sowie deren Wachstum durch Anlagerung von adsorbierten Proteinmolekülen. Durch das Modell wurden Adsorptions- und Desorptionskurven von Ezrin simuliert, die mit denen durch die QCM ermittelten Kurvenverläufen korrespondieren und so die Idee einer positiv kooperativen Bindung von Ezrin an PIP₂-dotierte Membranen favorisieren. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass das teilweise irreversible Bindungsverhalten ein Resultat der intermolekularen Wechselwirkung der adsorbierten Ezrinmoleküle ist. Im Gegensatz dazu war es nicht möglich, die Daten korrekt mit einer auf Langmuir-basierenden

Kinetik zu beschreiben. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der während der Proteinadsorption manchmal auftretende „lineare“ Anstieg der Oberflächenbelegung einer *piggyback*-Anlagerung auf bestehenden Proteindomänen zugeschrieben werden kann. In der Literatur finden sich viele Beispiele, bei welchen eine positive Kooperativität auftritt. So konnte ein kooperatives Bindungsverhalten von Annexin A5 an festkörperunterstützte Membranen¹⁰⁷, bei der Adsorption von Lysozym an Si(Ti)O₂-Oberflächen¹¹⁴, bei der Adsorption von Ferritin und Fibrinogen auf hydrophile sowie hydrophobe Siliziumplättchen¹¹⁵ und selbst für Antigen–Antikörper Wechselwirkungen¹¹⁶ beobachtet werden.

Während die Kinetik der Ezrinadsorption und –desorption gut mit Hilfe des Minton-Modells simuliert werden konnte, traf dies für die Daten der N-EMRAD-Bindungskinetiken nicht zu. Bei N-ERMAD konnte zwar in einigen Fällen mit den gewählten Parametern der Adsorptionsprozess korrekt simuliert werden, wohingegen unter Verwendung derselben Parameter eine vernünftige Beschreibung der Desorption nicht möglich war. Bei anderen Messkurven trat genau der entgegengesetzte Fall auf. Dort stimmte die simulierte Kurve gut mit dem Desorptionsprozess überein, während der Adsorptionsprozess nur ungenügend beschrieben werden konnte. Im Gegensatz zu dem Wild-Typ Protein Ezrin war es also nicht möglich, ein kooperatives Bindungsverhalten von N-ERMAD an festkörperunterstützte PIP₂-dotierte Membranen mittels des Minton Modells nachzuweisen. Eine Erklärung, weshalb es nicht möglich war mittels des Minton-Modells den Bindungsprozess von N-EMRAD adäquat zu beschreiben, könnte darin liegen, dass die Irreversibilität ausschließlich auf der bereits diskutierten Interaktion mit multiplen PIP₂-Molekülen beruht und im Gegensatz zu Ezrin nicht durch eine laterale Protein-Protein-Interaktion bedingt wird. Durch die spezifische Wechselwirkung von Ezrin mit PIP₂ könnte eine konformativ Änderung des Proteins resultieren, bei welcher bisher maskierte Bindungsstellen exponiert würden. Auf diese Art und Weise könnte Ezrin konformativ aktiviert werden, was in einer Verstärkung der Protein – Protein Interaktion resultiert, während diese Intensivierung bei der Interaktion von N-ERMAD mit PIP₂ nicht oder nur vermindert auftritt. Basierend auf der Tatsache, dass Ezrin nach der Adsorption auf PIP₂-haltige Membranen in der Lage ist Aktinfilamente zu binden, stellt PIP₂ allem Anschein nach einen entscheidenden Faktor im Aktivierungsprozess von Ezrin dar. Durch die Dissoziierung der N-terminalen und der C-terminalen Domäne aufgrund der PIP₂-

Aktivierung, besteht die Möglichkeit, dass der C-terminale Teil des Proteins einen Einfluss auf die Kooperativität in der Art und Weise ausübt, dass die intermolekulare, laterale Interaktion nicht über die N-terminalen Proteindomänen erfolgt, sondern vor allem über eine Verknüpfung von N-ERMAD eines Proteins mit C-ERMAD eines benachbarten Proteins stattfinden könnte. Bei der Bildung von Ezrindimeren bzw. Ezrinoligomeren wurde diese Kopf zu Schwanz Assoziation bereits beschrieben^{16; 117}. Sollte die C-terminale Domäne ein wichtiger Faktor für die Kooperativität sein, könnte dies erklären, warum eine Beschreibung der Adsorption von N-ERMAD über das Minton Modell nicht möglich ist, da diesem Proteinfragment von Ezrin die C-terminale Domäne fehlt.

Weitere wichtige Indizien, welche die Hypothese einer kooperativen Adsorption von Ezrin an PIP₂-haltige Membranen unterstützen und somit das Minton-Modell validieren, ergaben sich aus SFM-Aufnahmen. Zur Untersuchung der lateralen Anordnung von membrangebundenem Ezrin und dessen Abhängigkeit vom PIP₂-Gehalt eignet sich die Rasterkraftmikroskopie, welche die Visualisierung von Membranen und membrangebundenen Proteinen im Nanometermaßstab erlaubt¹¹⁸⁻¹²¹. Hierbei zeigte sich, dass festkörperunterstützte, PIP₂-dotierte POPC-Membranen als glatte, homogene Oberflächen abgebildet werden. Die Bildung größerer Lipiddomänen, die bedingt durch die relativ große Kopfgruppe von PIP₂³⁶ und deren Orientierung in die wässrige Phase¹²² deutlich zu erkennen wären, wurde nicht beobachtet. Aufgrund dessen ist die Bildung von in die POPC-Matrix eingelagerten PIP₂-Domänen unter den verwendeten Bedingungen unwahrscheinlich, wenngleich die Ausbildung von Lipiddomänen, die nur aus wenigen PIP₂-Molekülen bestehen, nicht ausgeschlossen werden kann. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Ergebnissen von Denisov et al.¹¹¹, welcher die gleichmäßige Verteilung von sauren Lipiden wie Phosphatidylserin und PIP₂ in der Membran mittels Fluoreszenzmikroskopie nachwies. Zusammen mit dieser Beobachtung kann von einer gleichmäßigen Verteilung der Rezeptorlipide in der Membran ausgegangen werden. Im Unterschied zu den hier verwendeten Modellmembranen, konnte in Membranen, die aus A431 Zellen isoliert wurden, eine Anreicherung von PIP₂ in Triton-unlöslichen, Cholesterol-reichen Domänen beobachtet werden¹²³. Hier konnte festgestellt werden, dass etwa 50 % des gesamten zellulären PIP₂s in Mikrodomänen lokalisiert sind. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Methyl-β-cyclodextrin, einem Cholesterol-bindenden Molekül, zu einer

Delokalisierung von PIP₂ führt¹²⁴. Allerdings lässt sich, aufgrund der unterschiedlichen Membransysteme und Isolierungsmethoden, diese Studie schlecht auf die hier dargestellten Ergebnisse übertragen. Dennoch wäre es für nachfolgende Studien interessant, den Einfluss von Cholesterol auf die PIP₂-Verteilung in Modellmembranen zu untersuchen.

Die Zugabe von Ezrin zu POPC-Membranen, die 0,5 und 1 mol% PIP₂ enthielten, resultierte in der Bildung von Proteindomänen mit einer mittleren Höhe von (1,8 ± 0,2) nm, welcher einer monomolekularen Anordnung der Proteine entspricht. Im Vergleich mit der Höhe von ca. 4 nm der kristallinen N-terminalen Domäne von Ezrin¹⁷ fällt der Wert der gemessenen Höhe um die Hälfte geringer aus. Dieser Fehler ist wahrscheinlich auf die mechanische Deformation der Probe durch die Cantileverspitze zurückzuführen^{125; 126}. Bei einer höheren PIP₂-Konzentration in der Membran konnte die Ausbildung einer nahezu kompletten Proteinschicht beobachtet werden. Zusätzlich wurde durch zeitaufgelöste SFM-Aufnahmen gezeigt, dass ausgehend von Proteindomänen eine weitere Anlagerung von Ezrinmolekülen erfolgte. Aus der Kombination dieser Beobachtungen wurde postuliert, dass die Ausbildung der Proteindomänen das Resultat von lateralen Protein – Protein Wechselwirkungen ist, was im Einklang mit den simulierten Kinetiken des Minton-Modells steht. Gestützt wird dieses Postulat durch weitere experimentelle Befunde. Obwohl Ezrin in Lösung größtenteils als Monomer vorliegt^{6; 7}, ist Ezrin zur Bildung von Dimeren oder Oligomeren befähigt^{117; 127-129}. Höher geordnete Ezrinaddukte wurden in Extrakten von plazentalen Mikrovilli und in parietalen Magenzellen gefunden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von humanen, epidermalen Karzinomzellen mit Wachstumsfaktoren eine Bildung von Ezrinoligomeren induziert. Die hier beschriebene Dimerisierung und Oligomerisierung könnte ebenfalls das Resultat einer lateralen Protein-Protein-Interaktion sein, die aus einer konformativen Aktivierung von Ezrin bedingt wird.

Neben der Bindungskinetik wurde die Oberflächenbelegung im Gleichgewichtszustand bei verschiedenen Ezrinhochkonzentrationen mittels des Minton-Modells simuliert. Dabei zeigte sich, dass die so erstellte Kurve sehr ähnlich zu der von den QCM-Daten abgeleiteten Kurve ist, und dass die Adsorptionskonstante K_1^{Ads} der Ezrinbindung an PIP₂ in Abwesenheit von lateralen Proteininteraktionen einen Wert von 10^8 M^{-1} einnimmt. Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass

die Adsorptionsisotherme aus den kinetischen Daten rekonstruiert wurde und somit die ermittelten Daten keine wirklichen Gleichgewichtswerte darstellen. Dies resultiert daraus, dass die ermittelten Frequenzänderungen alle zu einem bestimmten Zeitpunkt extrahiert wurden, der demjenigen entsprach, bei welchem die experimentellen Daten ermittelt wurden. Zum Teil war deshalb noch kein Gleichgewichtszustand erreicht, wenngleich der Adsorptionsprozess in allen Fällen zu mindestens 85 % abgeschlossen war.

Zusammenfassend lässt sich schließen, daß Ezrin hoch spezifisch mit PIP₂ interagiert, welches in den festkörperunterstützten POPC-Membranen gleichmäßig verteilt vorliegt und so zur kooperativen Ausbildung einer monomolekularen Proteinschicht auf der Oberfläche führt. Zusätzlich könnte die Interaktion mit PIP₂ zu einer konformativen Aktivierung von Ezrin führen, gleichbedeutend mit der Lockerung der intramolekularen Assoziation von N-ERMAD und C-ERMAD. Durch diese Aktivierung könnten die intermolekularen Wechselwirkungen auf der Oberfläche hervorgerufen werden, welche die kooperative Adsorption von Ezrin bedingen.

5.3 Diskussion der Ezrinaktivierung

Im Folgenden soll der Aktivierungsprozess von Ezrin diskutiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf zwei Wegen versucht eine Aktivierung von Ezrin zu induzieren: Zum einen durch die Interaktion von Ezrin mit S100P, zum anderen durch die Interaktion mit PIP₂.

5.3.1 Aktivierung von Ezrin über S100P

Die S100-Proteine, die bis dato ausschließlich in Vertebraten gefunden wurden, regulieren Ca²⁺-abhängig intra- und extrazelluläre Prozesse. Die große Mehrzahl der S100-Proteine existieren als antiparallel angeordnete Homodimere und sind in dieser biologisch aktiven Form befähigt andere Proteine zu binden^{30; 130}. Ein von Koltzscher et al. entdeckter Interaktionspartner von S100P ist Ezrin²⁹. Sie konnten mittels eines affinitätschromatographischen Ansatzes zeigen, dass Ezrin Ca²⁺-abhängig an S100P bindet. Zu diesem Zweck wurde sowohl dimeres S100P¹⁰³ als auch monomeres S100P F15A, welches durch den Austausch von Phenylalanin zu Alanin nicht befähigt ist Dimere auszubilden¹³¹, via ihrer His-Tags an eine Ni-NTA-Säulenmatrix fixiert und Ezrin als Ligand angeboten. Nur das funktionell aktive S100P war in der Lage Ezrin aus einem Plazentaextrakt Ca²⁺-abhängig zu binden. Bedingt durch die Interaktion von Ezrin mit S100P wurde zudem eine Aktivierung von Ezrin beobachtet, die Ezrin befähigt mit Aktinfilamente zu interagieren. Basierend auf diesen Resultaten sollte im Rahmen dieser Arbeit die Ezrin – S100P-Interaktion quantifiziert werden, um detailliertere Informationen über die Funktionalität dieser Proteine an der Membran-Zytoskelett Grenzfläche zu erhalten.

Da die Bindungsstelle von S100P in der N-terminalen Domäne von Ezrin lokalisiert ist²⁹, wurde sowohl die Wechselwirkung von S100P mit N-ERMAD als auch mit Ezrin mittels Vesikelassays unter Verwendung von POPC / PIP₂ (97:3)-Vesikeln untersucht. Da S100P zwei EF-Hand Bindungsstellen mit verschiedenen Ca²⁺-Affinitäten besitzt, wurde hierbei auch der Einfluss der Ca²⁺-Konzentration auf die Bindung untersucht. Die verwendeten Ca²⁺-Konzentrationen betrugen 0,5 mM und 50 µM, wobei die Besetzung der höher affinen C-terminalen Bindungsstelle ($K_D = 1,6 \mu M^{101}$) in beiden Fällen gewährleistet ist. In allen durchgeföhrten Vesikelassays konnte keine Interaktion zwischen Ezrin bzw. N-ERMAD mit S100P beobachtet werden. Um auszuschließen, dass die sphärische Gestalt der Vesikel

einen Einfluss auf das Bindungsverhalten ausübt und um eine höhere Sensitivität bezogen auf die Detektion der Protein-Protein-Interaktion zu erreichen, wurde versucht die Wechselwirkung der Proteine auf planaren POPC / PIP₂ (97:3)-Membransystemen mittels QCM-Technik zu detektieren. Die Zugabe des Liganden S100P zu der mit Ezrin bzw. N-ERMAD funktionalisierten Membran führte zu keinen wesentlichen Frequenzänderungen. Allenfalls konnte eine mehr oder weniger starke lineare Abnahme nach der S100P Zugabe detektiert werden. In einem weiteren Ansatz wurde, um möglichst genau den von Koltzscher et al.²⁹ beschriebenen Bedingungen zu entsprechen, ein identischer Puffer für die QCM-Messungen eingesetzt, der neben 0,5 mM CaCl₂ noch 1 mM MgCl₂ enthielt. Nach der erfolgreichen Adsorption von Ezrin an eine festkörperunterstützte POPC / PIP₂ (97:3)-Membran, resultierte die Zugabe von S100P zu einem geringen, linear verlaufenden Frequenzabfall, der keinen Endwert erreichte. Dieser Drift lässt bestenfalls auf eine unspezifische Bindung der beiden Proteine schließen, zeigte jedoch keinesfalls ein definiertes, reproduzierbares Bindungsverhalten. Möglicherweise beeinflusst die Bindung von N-ERMAD bzw. Ezrin an PIP₂ die Interaktion mit S100P, da sowohl die Bindungsstelle für PIP₂²⁰ als auch für S100P²⁹ in der N-terminalen Domäne von Ezrin lokalisiert sind und sich somit eventuell eine sterische Behinderung oder eine kinetische Hemmung ergibt. Neben dieser Möglichkeit könnte der Aktivierungsprozess, der durch die Bindung von PIP₂ initiiert wird, zu einer Konformationsänderung in der N-terminalen Domäne von Ezrin führen, welche die Bindung von S100P unterbindet. Durch den Vergleich der Kristallstrukturen von inaktivem Moesin²¹, mit der aktiven N-terminalen Domäne von Ezrin¹⁷ und von Radixin¹⁸ sind solche Konformationsänderungen detektiert worden. Unter Umständen führt eine durch PIP₂ induzierte Änderung der Konformation in der N-terminalen Domäne von Ezrin zu einer Maskierung oder Inaktivierung der Bindungsstelle für S100P. Zur Verifizierung dieser Hypothese wurden QCM-Messungen durchgeführt, bei welchen S100P über dessen His-Tag an eine festkörperunterstützte DOPC / Ni-DOGS (9:1)-Membran fixiert wurde und im Folgenden N-ERMAD als Ligand angeboten wurde. So konnte unter diesen Bedingungen, in Analogie zu den Studien von Koltzscher et al., ein möglicher Einfluss von PIP₂ ausgeschlossen werden. Um eine Bindung von N-ERMAD über seinen His-Tag an die Membran auszuschließen, wurde für diese Versuche nur N-ERMAD verwendet, dessen His-Tag durch Thrombin abgespalten wurde. Nach

erfolgreicher Adsorption von S100P an die Ni²⁺-Lipid funktionalisierte Membran führte die Zugabe von N-ERMAD zu keinen signifikanten Änderungen der Resonanzfrequenz. Somit konnte auch unter Verwendung PIP₂-freier Membransysteme keine Interaktion zwischen S100P und N-ERMAD nachgewiesen werden.

Neben der Bindung von Ca²⁺-Ionen ist S100P auch befähigt Mg²⁺-Ionen, wenn auch mit geringerer Affinität, zu binden. Dabei erfolgt die Bindung der Mg²⁺-Ionen an die N-terminale Bindungsstelle von S100P und führt zu einer Erhöhung der Affinität der C-terminalen Bindungsstelle für Ca²⁺-Ionen¹³². Zur Überprüfung ob das Vorhandensein von Mg²⁺-Ionen ein entscheidender Faktor für die S100P – N-ERMAD Wechselwirkung ist, wurden QCM-Messungen in einem Puffer durchgeführt, der neben 0,5 mM CaCl₂ auch 1 mM MgCl₂ enthielt. Auch hier wurde zunächst S100P an eine DOPC / Ni-DOGS (9:1)-Membran adsorbiert und anschließend N-ERMAD angeboten. Die hervorgerufene Frequenzänderung fiel stetig und folgte einem linearen Verlauf, der keinen Endwert erreichte und erst durch Spülen der Messzelle mit Puffer gestoppt werden konnte. Möglicherweise resultiert dieser kontinuierliche Frequenzabfall aus einer unspezifischen Adsorption, die zur Bildung von multiplen Proteinschichten führt. Dies würde auch erklären, warum der Adsorptionsprozess nach Spülen mit Puffer stoppte, da so keine weiter Anlagerung von Protein erfolgen kann. Zusammenfassend konnte mit den benutzten Methoden und unter den verwendeten Bedingungen keine spezifische Interaktion zwischen S100P und Ezrin bzw. N-ERMAD detektiert werden. Somit lässt sich auch keine Aussage über eine etwaige Aktivierung von Ezrin durch S100P treffen.

5.3.2 Aktivierung von Ezrin über PIP₂

Das cortikale Aktinzytoskelett der Zelle ist ein dynamisches Strukturelement, dessen Auf-, Um- und Abbau durch komplexe Regulationsmechanismen an der Zytoskelett – Membran Grenzfläche gesteuert wird^{57; 61}. In diesem Zusammenhang fungieren Mitglieder der ERM – Proteinfamilie als entscheidende Vermittler an dieser Verknüpfungsfläche^{2-5; 133}. Typischerweise erfolgt die Bindung des Proteins an die Membran über dessen N-terminale FERM-Domäne (*band four point one Ezrin Radixin Moesin*), während die C-terminale Domäne die Bindung an Aktinfilamente vermittelt^{1; 15}. Beide Proteindomänen sind in der zytosolischen Form des Moleküls intramolekular assoziiert, und resultieren so in einem inaktiven, auch als *dormant*

state bezeichneten Zustand des Proteins, in welchem die Aktinbindungsstelle maskiert ist. Eine Möglichkeit, die zu einer Dissoziation der beiden Proteindomänen und damit zu einer Aktivierung des Proteins führt, besteht in der Phosphorylierung bestimmter Aminosäurereste. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von ERM-Proteinen eine modifizierte Zellmorphologie sowie eine zelluläre Umverteilung des Proteins bedingen¹³⁴. Neben dieser Form der Aktivierung von Ezrin zeichnet sich zunehmend ein alternativer Aktivierungsprozess ab, der auf der Interaktion von Ezrin mit PIP₂ beruht. Die Bindung von Ezrin an PIP₂ erfolgt dabei über dessen N-terminale Domäne^{20; 38; 46; 135}. Zudem konnte einhergehend mit einer Überexpression von Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase (PI4P5) in Mausfibroblasten und in menschlichen HeLa-Zellen gezeigt werden, dass eine Anreicherung von Ezrin an der Plasmamembran und in Mikrovilli resultiert^{28; 136}. Da die PI4P5-Kinase verantwortlich für die PIP₂-Synthese ist, stellt dies ein weiteres Indiz für den Einfluss des Phospholipids PIP₂ auf die Aktivierung von Ezrin dar. In Kombination mit der in dieser Arbeit erstmals beschriebenen kooperativen Bindung von Ezrin an PIP₂-dotierte Membranen wird eine Aktivierung des Proteins durch PIP₂, d.h. eine Befähigung von Ezrin zur Bindung von Aktinfilamenten postuliert. Zur Verifizierung dieser Hypothese wurden QCM-, Ellipsometrie- und Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Um den Einfluss von PIP₂ auf den Aktivierungsprozess von Ezrin adäquat zu untersuchen, lag ein Schwerpunkt der Fragestellung auf dem Vergleich des Aktinbindungsverhaltens von PIP₂-gebundenem und Ni²⁺-Lipid-gebundenem Ezrin.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der alle Untersuchungen der Ezrin – Aktin Interaktion betrifft, ist die Verwendung einer geeigneten Isoform von Aktin. Aktin, eines der häufigsten Proteine in der eukaryotischen Zelle, wurde erstmals 1942 von Straub⁵⁸ aus Muskelzellen isoliert und existiert in Vertebraten in sechs verschiedenen Isoformen. Für die Interaktionsstudien von Ezrin mit Aktin wurde in dieser Arbeit ausschließlich nicht-muskuläres β-Aktin verwendet, dessen Isolierung erstmals 1966 von Hatano & Oosawa¹³⁷ beschrieben wurde. Allerdings wird die Isoformspezifität von Ezrin für β-Aktin kontrovers diskutiert. Je nach verwendetem Aktinassay und der Quelle, aus der Ezrin isoliert wurde und der damit einhergehenden möglichen Modifikationen des Proteins, sind Studien beschrieben bei denen eine unterschiedliche Isoformspezifität detektiert wurde. So konnten Shuster & Herman¹³⁸ eine spezifische Bindung zwischen Ezrin enthaltenden Zellextrakten und an einer

Matrix fixierten Aktinmolekülen nachweisen, die spezifisch für β -Aktin, aber nicht für muskuläres α -Aktin war. In Übereinstimmung hierzu beschrieben Yao et al.¹³⁹ die Bindung von Ezrin, das aus Hasenmucosa isoliert wurde, an β -Aktin aus Erythrozyten und zeigten, dass keine Interaktion von Ezrin mit α -Aktin stattfand. Im Gegensatz zu diesen Studien wurde eine Bindung von rekombinantem Ezrin sowohl an α - als auch an β -Aktin nachgewiesen¹⁴⁰. Allerdings wurden bei diesem Ansatz die Ezrinmoleküle auf Plastikoberflächen immobilisiert, welche möglicherweise die Bindungseigenschaften von Ezrin beeinflussten.

Um einen tieferen Einblick in den Vorgang der Aktinadsorption zu erhalten, sowie die Polymerisationsbedingungen zu verifizieren, wurde zunächst das Bindungsverhalten von Aktin auf positiv funktionalisierten Membranen mittels Ellipsometrie untersucht. Zu diesem Zweck wurden zwitterionische DOPC-Membranen als Matrix verwendet, die mit 40 % positiv geladenem DOTAP dotiert waren. Da Aktin unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) als Anion vorliegt ($pI \sim 5,4$)¹⁴¹, sollte Aktin unter den gewählten Bedingungen mittels elektrostatischer Wechselwirkungen an den positiv geladenen Membranen adsorbieren. Eine Bindung von Aktin an die Membran konnte sowohl bei monomerem G-Aktin als auch bei polymerem F-Aktin beobachtet werden. Dies steht im Einklang mit Studien, in welchen eine elektrostatische Adsorption von F-Aktin an Lipidschichten verschiedener Lipidzusammensetzungen beschrieben wurde, wobei bei monomerem G-Aktin eine Interkalation zwischen die Phospholipide erfolgt^{142; 143}. Die in dieser Arbeit mittels Ellipsometrie ermittelte Dicke der adsorbierten Proteinschicht lag dabei für G-Aktin bei 2,1 nm, für F-Aktin bei 4,4 nm. Ein Vergleich dieser Werte mit Kristallstrukturen bzw. Modellen von Aktin zeigt eine gewisse Diskrepanz. So liegt die mittels einer Kristallstruktur bestimmte Ausdehnung von G-Aktin bei $5,5 \text{ nm} \times 5,5 \text{ nm} \times 3,5 \text{ nm}$ ⁵⁷, während die auf einem atomaren Modell basierende Höhe von F-Aktin einen Wert von etwa 9 nm aufweist⁶⁴. Dieser Unterschied in den ermittelten Höhen könnte auf eine ungenügend vollständige Belegung der Oberfläche mit Aktin zurückzuführen sein und so zu der geringeren Höhe geführt haben. Eine weitere interessante Beobachtung ergibt sich bei Betrachtung der Kinetiken des Adsorptionsprozesses von F- und G-Aktin. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Adsorption von G-Aktin wesentlich schneller verlief als die von F-Aktin, wobei

in beiden Fällen zu Beginn der Aktinapplikation kurz gerührt wurde, um eine homogene Verteilung der Proteine in der Lösung zu gewährleisten, die Adsorption also teils raten-, teils diffusionskontrolliert abläuft. Die unterschiedliche Kinetik der Adsorption der beiden Aktinspezies könnte in der Molekülgröße und dem molekularen Arrangement auf der Oberfläche begründet sein. Bedingt durch die relativ großen und semi-elastischen Aktinfilamente (Persistenzlänge: $\sim 10 \mu\text{m}$)¹⁴⁴ könnte die Adsorption der polymeren Proteine im Vergleich zum monomerem Aktin verlangsamt sein. Zusätzlich beweist das unterschiedliche Adsorptionsverhalten der beiden Aktinspezies, dass F-Aktin als polymeres, relativ großes Protein vorliegt und zeigt, dass unter den gewählten Polymerisationsbedingungen F-Aktin generiert wird. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien, in welchen die Diffusionskoeffizienten von G- und F-Aktin bestimmt wurden. Durch FRAP-Messungen wurde für G-Aktin ein Diffusionskoeffizient von $7,15 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ in einem Puffer niedriger Ionenstärke ermittelt¹⁴⁵. Die Diffusionskoeffizienten, die in der Literatur für F-Aktin beschrieben sind, zeigen eine gewisse Variation je nach verwendeter Messmethode und der Länge der Aktinfilamente. Typische Werte, die für F-Aktin bestimmt wurden liegen in einer Größenordnung von etwa $10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ ¹⁴⁵; ¹⁴⁶. In diesem Zusammenhang ist die in dieser Arbeit beobachtete, langsamere Adsorption von F-Aktin erklärbar und beweist das Vorhandensein von Aktinfilamenten.

In einem ersten Ansatz sollte die Aktivierbarkeit von Ezrin durch PIP₂ und die anschließende Aktinbindung mittels der QCM-Technik untersucht werden. Zuerst wurde untersucht, inwieweit PIP₂-gebundenes Ezrin in der Lage ist zwischen monomerem und polymerem Aktin zu diskriminieren. Dabei zeigte sich, dass nach einer Zugabe von G-Aktin zu adsorbiertem Ezrin keinerlei Frequenzänderungen zu detektieren waren, also keine Bindung zwischen den beiden Proteinen erfolgte. Im Gegensatz hierzu konnte bei der Applikation von F-Aktin zu PIP₂-gebundenem Ezrin immer eine Änderung der Resonanzfrequenz beobachtet werden, die jedoch stark schwankte. In Übereinstimmung hierzu wiesen Pestonjamasp et al.¹⁴⁷ die selektive Bindung von Ezrin aus Rinder-Neutrophilen an ¹²⁵I markiertes F-Aktin nach, während keine Interaktion mit G-Aktin beobachtet werden konnte. Allerdings ist auch, durch Experimente mit Ezrinmutanten, eine Bindungsstelle für F- und G-Aktin

in der N-terminalen Region von Ezrin nachgewiesen worden, deren physiologische Bedeutung noch unklar ist¹⁴⁰.

Um den Einfluss von PIP₂ auf die Aktivierung von Ezrin zu überprüfen, wurde das Bindungsverhalten von F-Aktin an Ezrin, das auf einer DOPC / Ni-DOGS (9:1)-Membran fixiert war, untersucht. Hier konnte nach der Zugabe von Aktinfilamenten ein leichter, linearer Abfall der Resonanzfrequenz beobachtet werden. Insgesamt sind die Ergebnisse zu den Messungen mit den PIP₂-haltigen Membranen schlecht vergleichbar, da bei diesen keine reproduzierbaren Frequenzänderungen bestimmt werden konnten. Dennoch wurde im Folgenden versucht durch Verwendung der Ezrinmutanten T567D, die eine aktive Ezrinspezies und T567A, die eine inaktive Ezrinspezies symbolisieren soll, einen Unterschied in der Aktinbindung herauszustellen. Allerdings zeichneten sich die QCM-Messungen, bei denen die beiden Ezrinmutanten zum Einsatz kamen, durch eine sehr schlechte Reproduzierbarkeit aus und es konnte bei beiden Mutanten eine Aktinadsorption beobachtet werden. Eine mögliche Ursache dieser Beobachtung könnte darin liegen, dass durch die Aminosäuremutation die native Konformation des Proteins gestört ist (persönliche Mitteilung Prof. Gerke). Inwieweit diese Mutationen die Funktionalität der Proteine beeinflussen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Gautreau et al. beobachteten, dass die Transfektion von Epithelzellen mit Ezrin T567D eine Ausbildung von Lamellipodien und Mikrovilli induzierte, während T567A nur eine sehr gering ausgeprägte Colokalisierung mit Zytoskelettelementen zeigte¹⁴⁸. Eine entgegengesetzte Beobachtung ist von Chambers et al. beschrieben¹¹⁷. Sie konnten zeigen, dass die Mutation von Threonin zu Glutamat nur einen geringen Effekt auf die biochemische Aktivierung von Ezrin ausübt. Beispielsweise konnte durch einen Vergleich der Expression von Wild-Typ Ezrin und Ezrin T567D in verschiedenen Zelllinien keine phänotypischen Veränderungen in Bezug auf Anzahl der Mikrovilli, der Lokalisation des Proteins sowie der Aktinverteilung beobachtet werden.

Eine Aussage über die Reversibilität der Aktinbindung ist ebenfalls nicht möglich, da diese kein einheitliches Verhalten zeigte. So konnten bei analog durchgeföhrten QCM-Messungen sowohl reversible als auch irreversible Aktinbindungen detektiert werden. Selbst die Adsorption von Aktinfilamenten an reine POPC / PIP₂ (97:3)-Membranen wurde beobachtet und zeigte stark schwankende Frequenzänderungen, die von einigen wenigen Hertz bis zu mehreren Hundert Hertz reichten. Diese Resultate bestätigen die Vermutung einer unspezifischen Adsorption bzw.

Sedimentation der Aktinfilamente auf die Oberfläche. Insgesamt typisch für die durchgeführten QCM-Messungen war die geringe Reproduzierbarkeit, die sich in einer enormen Bandbreite der Frequenzänderungen nach erfolgter Aktinadsorption ausdrückte. Eine mögliche Ursache dieser starken Schwankungen könnte in der Struktur der Aktinfilamente begründet sein, die, wie auf den Fluoreszenzaufnahmen zu sehen, zum Teil Aggregate mit einem Durchmesser von 100 µm bildeten. Da die Schläuche, die bei den QCM-Messungen zum Einsatz kamen, einen Innendurchmesser von knapp 800 µm aufweisen und der Flüssigkeitszylinder über dem Quarz nur eine Höhe von 200 µm besitzt, besteht die Möglichkeit, dass hierdurch die Aktinfilamente brechen könnten. Ein weiteres Problem könnte die Flussgeschwindigkeit von 0,46 mL / min in den Schläuchen und die mechanische Agitation beim Durchlaufen der Peristaltikpumpe darstellen. Dadurch sind die fragilen Aktinfasern einer mechanischen Belastung ausgesetzt, die ebenfalls zu einem Brechen der Filamente führen könnten. Eine Möglichkeit diese, durch den Pumpkreislauf bedingten Probleme zu umgehen, wäre der Wechsel auf ein „offenes“ Flüssigkeitssystem. Hierbei treten allerdings Longitudinalwellen auf, die in Form periodischer Schwankungen die Resonanzfrequenz beeinflussen und somit keine reproduzierbaren QCM-Messungen ermöglichen⁷⁸.

Aufgrund dessen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit versucht, die postulierte Aktivierung von Ezrin durch PIP₂ mittels Ellipsometrie-Messungen nachzuweisen. Im Unterschied zu den QCM-Messungen erfolgte der Adsorptionsprozess der Aktinfilamente hier in einer offenen Messzelle, sodass eine mechanische Agitation der Filamente minimiert werden konnte. Bei allen durchgeführten Messungen wurde zuerst die korrekte Ausbildung der Membran überprüft. Die Schichtdicke der aus den gespreiteten Vesikeln resultierenden Membranen ist (6 ± 1) nm und steht in gutem Einklang mit der Dicke typischer Lipiddoppelschichten¹⁴⁹. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von 1 mM CaCl₂ den Spreitvorgang beschleunigt. Dieser Effekt wird durch die Ca²⁺-verbrückte Adsorption der Vesikel an die Oberfläche sowie den erhöhten osmotischen Druck bedingt, was die Vesikel auf der Oberfläche platzen und fusionieren lässt¹⁵⁰.

Zur Untersuchung der Aktivierung von Ezrin durch PIP₂, wurden Ellipsometriemessungen durchgeführt, bei welchen F-Aktin zu PIP₂-gebundenem und zu Ni-DOGS-gebundenem Ezrin appliziert wurde. In beiden Fällen war keine

signifikante Bindung der Aktinfilamente über einen dreistündigen Zeitraum detektierbar. Insgesamt muss deshalb in Hinblick auf die Ellipsometriemessungen konstatiert werden, dass diese, ähnlich wie die QCM-Messungen, sehr unreproduzierbare Ergebnisse lieferten. Aufgrund technischer Schwierigkeiten, welche die Messküvette betrafen, konnten zudem nur relativ wenig Messungen durchgeführt werden, so dass nicht genügend Daten für eine fundierte Aussage bezüglich der Aktivierung von Ezrin durch PIP₂ ermittelt werden konnten. Ein weiteres Problem dieser Messanordnung ist durch das Vorhandensein zweier aus verschiedenen Proteinen aufgebauten Schichten gegeben. Möglicherweise besitzen beide adsorbierten Proteinschichten unterschiedliche Brechungsindizes, was fehlerhafte Schichtdickenbestimmungen hervorrufen würde. Da keine definierten Werte für Ezrin und Aktin vorlagen, wurde in dieser Arbeit eine Brechungsindex von 1,5000⁹⁴ für beide Proteine angenommen. Neben dieser Ungenauigkeit stellt die mögliche Inhomogenität der adsorbierten Proteinschichten eine weitere Ursache für fehlerbehaftete Messungen dar. Da es sich bei der Ellipsometrie um eine integrale Messmethode handelt, wäre eine homogene Belegung der Membran mit Protein notwendig, um eine möglichst exakte Schichtdickenbestimmung zu gewährleisten.

Nachdem sich die QCM wie auch das Ellipsometer als ungeeignete Methoden zur Untersuchung der Ezrin – F-Aktin-Interaktion erwiesen hatten, wurde die vermutete PIP₂-Aktivierung von Ezrin mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Hier besteht der Vorteil gegenüber den QCM- und Ellipsometriemessungen darin, dass eine lokale Stelle der Probe betrachtet werden kann und nicht über einen Probenbereich gemittelt wird. Zusätzlich konnte hier, ähnlich wie bei den Ellipsometriemessungen eine mechanische Agitation der Aktinfilamente weitestgehend minimiert werden. Obwohl die Ausbildung der festkörperunterstützten Membranen bereits durch die Ellipsometriemessungen zweifelsfrei unter den gegebenen Bedingungen verifiziert wurde, erfolgte dennoch eine Markierung der Membran mit Texas Red® DHPE. Die so präparierten Membranen zeigten eine homogene Verteilung der Fluoreszenz. Dies steht in gutem Einklang mit den SFM-Messungen, die ebenfalls eine gleichmäßige, defektfreie Ausbildung der POPC / PIP₂ (97:3)-Membran zeigten. Nachfolgend wurde der Einfluss von PIP₂ auf die Aktivierung von Ezrin untersucht. Zu diesem Zweck wurde fluoreszenzmarkiertes F-Aktin mit membrangebundenem Ezrin inkubiert, wobei je nach Zusammensetzung der Membran signifikante Unterschiede

in der Aktinadsorption ermittelt wurden. Während bei PIP₂-haltigen Membranen eine deutliche Bindung zwischen Ezrin und den Aktinfilamenten visualisiert werden konnte, war bei Ni-DOGS-haltigen Membranen nahezu keine Interaktion zwischen den beiden Proteinen erkennbar. Durch dieses Ergebnis konnte eindeutig der Einfluss von PIP₂ auf die Aktivierung von Ezrin belegt werden. Zusätzlich zu dieser entscheidenden Erkenntnis konnte auch eine unterschiedliche Morphologie der Aktinfilamente beobachtet werden. Trotz identischer Polymerisationsbedingungen traten dabei neben relativ kurzen ~2 µm großen, stäbchenförmigen Aktinfilamenten, zum Teil bis zu mehrere Hundert Mikrometer große, gerüstartige Aktinstrukturen auf. Ähnliche Aktinstrukturen wurden von Kwon et al.¹⁵¹ beschrieben, die den Einfluss von Polykationen und des Salzgehalts auf die Morphologie von Aktinfilamenten untersuchten. Eine ebenfalls hohe morphologische Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit beobachteten Aktinfilamenten findet sich bei Johnson et al.¹⁵². Hier wurde durch Fluoreszenz- und SPR-Messungen die Bindung zwischen in festkörperunterstützte Membranen intergriertem Ponticulin und F-Aktin untersucht.

Die in dieser Arbeit beschriebene Aktivierung von Ezrin durch PIP₂ erlaubt in Kombination mit der kooperativen Adsorption von Ezrin die Postulierung eines umfassenden Modells bezüglich der Wechselwirkung von PIP₂, Ezrin und F-Aktin *in vivo* [Abb. 5.2 A)]. Durch eine lokale Anreicherung von PIP₂ in bestimmten Plasmamembranbereichen der Zelle, wird Ezrin an die Membran rekrutiert. Aufgrund des kooperativen Bindungscharakters von Ezrin, sollte in diesem Szenario die Ausbildung einer lokalen, mit Ezrin angereicherten, monomolekularen Proteinschicht resultieren. Bedingt durch die Adsorption von Ezrin an PIP₂ kommt es zu einer Aktivierung des Proteins, d.h. die Aktinbindungsstelle im C-terminalen Rest wird exponiert, welche dann als Ankerpunkt oder Anheftungsplattform für Aktinfilamente fungieren kann. Im Gegensatz hierzu wird postuliert, dass durch die Bindung von Ezrin an Ni-NTA-DOGS-haltige Membranen keine Aktivierung des Proteins resultiert, das Protein also in seinem „dormant state“ verbleibt [Abb 5.2 B)].

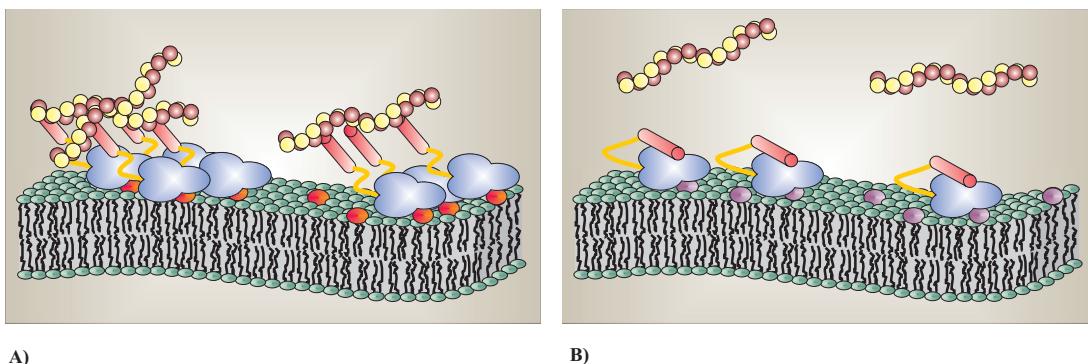


Abb. 5.2 Postuliertes Modell der Ezrin-F-Aktin-Interaktion. **A)** Durch die kooperative Adsorption von Ezrin an PIP₂-dotierte Membranen wird das ERM-Protein aktiviert und ist somit in der Lage Aktinfilamente zu binden. **B)** Ezrin adsorbiert an Ni-NTA-DOGS-haltige Membranen, wird nicht aktiviert und bindet somit kein F-Aktin.

Dass Ezrin die Verknüpfung der Membran mit dem Zytoskelett der Zelle bewerkstelligt ist schon seit längerem bekannt¹⁻⁴. Allerdings basiert die Regulierung *in vivo* auf einem komplexen Zusammenspiel mehrerer Faktoren und ist bis dato noch nicht vollständig verstanden. Durch spezifische extrazelluläre Signale, wie z.B. die Stimulierung von Zellen mit EGF, werden bestimmte GTPasen (Rho, Rac, Cdc42) aktiviert, welche über eine Signalkaskade die Organisation des Aktinzytoskelettes steuern und so charakteristische morphologische Änderungen der Zelle induzieren²⁴. In diesem Zusammenhang existieren verschiedene Studien, die den Einfluss von Ezrin auf die Ausbildung von Aktinstrukturen beschreiben. Hierbei spielt der Aktivierungszustand von Ezrin eine entscheidende Rolle, wobei die Art und Weise der Aktivierung kontrovers diskutiert wird. Insbesondere die Frage des Zusammenspiels von Phosphorylierungen und/oder der PIP₂-Interaktion von ERM-Proteinen ist noch nicht vollständig verstanden. So konnte durch Überexpression von Rho-Kinasen in COS7-Zellen eine verstärkte Mikrovilliausbildung an der Membran beobachtet werden. Einhergehend damit konnte gezeigt werden, dass Moesin durch die Rho-Kinase an Threonin558 phosphoryliert wird und eine Translokation des aktivierte Proteins zu den Mikrovilli erfolgte²⁶. Eine andere kürzlich erschienene Arbeit beschreibt den Einfluss und das Zusammenspiel der GTPase Rac1 und der Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-Kinase auf die Aktivierung und Verteilung von Ezrin in HeLa-Zellen. Durch den Einfluss beider Verbindungen konnte eine Kolokalisierung von Ezrin an der Zellperipherie und an Gürteldesmosomen (*adherens junction*) nachgewiesen werden; es fand also eine Aktivierung und eine Interaktion von Ezrin mit Aktinfilamenten statt. Interessanterweise konnte durch

Einsatz von konstitutiv aktivem Rac1 der Einfluss von konstitutiv inaktiver PIPK aufgehoben werden, was die Vermutung nahe legt, dass Rac1 der PIPK in der Regulierung der ERM-Proteine nachgeschaltet ist²⁸. Neben der in dieser Arbeit untersuchten Fähigkeit von Ezrin direkt über seinen N-Terminus mit PIP₂-dotierten Membran wechselzuwirken, kann die Membranbindung auch über andere Proteine vermittelt werden. Ein Mediator dieser Wechselwirkung ist das Membranglycoprotein CD44. Hirao et al.²⁵ konnten in *in vitro*-Experimenten zeigen, dass die Interaktion von ERM-Proteinen mit CD44 nur in Gegenwart von PIP₂ unter physiologischen Bedingungen mit hoher Affinität stattfindet. Dies unterstreicht nochmals, die in dieser Arbeit postulierte Aktivierung von Ezrin durch PIP₂. Ein weiterer Baustein, der diese Hypothese stützt, ergibt sich aus Studien, die von Yonemura et al.¹³⁵ durchgeführt wurden. Hier konnte gezeigt werden, dass in bestimmten Zelltypen, wie z.B. MDCK-Zellen, eine Injektion von Proteinkinase-Inhibitoren und Rho-Inaktivatoren nicht zu einer Rückbildung von Mikrovilli führt. Zum Teil konnte sogar eine Verlängerung dieser Strukturen beobachtet werden, wobei nicht-phosphorylierte ERM-Proteine in diesen Membranbereichen bevorzugt lokalisiert waren. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass nach Applikation von Neomycin, einem Antibiotikum, dass mit hoher Affinität an Polyphosphoinositide bindet, eine schnelle Dephosphorylierung der ERM-Proteine resultiert und in der Folge eine Translokation der Proteine von den Mikrovilli ins Zytoplasma stattfindet. In Übereinstimmung mit Auvinen et al.²⁸ zeigte eine Hochregulierung der PIPK eine Kolokalisierung von aktivierte ERM-Proteinen mit F-Aktinstrukturen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Aktivierung von ERM-Proteinen unabhängig von einer Phosphorylierung möglich ist. In einer weiteren Arbeit wird der Einfluss von PIP₂ auf die Aktivierung von ERM-Proteinen beschrieben. Hier konnte durch Kosedimentationsstudien nachgewiesen werden, dass Moesin und F-Aktin nur in Gegenwart von PIP₂, aber nicht in Gegenwart von Phosphatidylinositol interagieren. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass die zentrifugierte Menge an Protein in etwa derjenigen entspricht, die durch Inkubation von konstitutiv aktivem MoesinT558D mit F-Aktin erreicht wurde¹⁵³. Dies belegt, in Kombination mit den Ergebnissen, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, dass die Phosphorylierung nicht der einzige mögliche Weg ist, um eine Aktivierung von ERM-Proteinen zu erzielen. Neben den eben diskutierten Arbeiten wird auch eine sequentielle Aktivierung von ERM-Proteinen vorgeschlagen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden,

dass die Hochregulierung von PIPK in NIH3T3-Zellen zu einer Rekrutierung von ERM-Proteinen zur Plasmamembran führt, dort Rho-abhängig die Phosphorylierung erfolgt und Mikrovilli ausgebildet werden¹³⁶. Ein ähnlicher Aktivierungsmechanismus für Ezrin wird von Fievet et al.⁴⁸ vorgeschlagen. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Ezrinmutante, die nicht in der Lage ist PIP₂ zu binden, komplett im Zytoplasma der Zelle verteilt vorliegt und nicht im Bereich der Mikrovilli detektiert werden konnte. Durch Analyse der Proteine mit einem T567-Phosphat spezifischen Antikörper wurde eindeutig nachgewiesen, dass die PIP₂ negativ Mutante nicht phosphoryliert werden konnte. Somit wird von Fievet et al. ein Modell vorgeschlagen, in welchem PIP₂-gebundenes Ezrin eine Voraussetzung für die Phosphorylierung und die damit eingehorende Aktivierung von Ezrin darstellt. In Anbetracht der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Aktinbindung, die eine zweifelsfreie Aktivierung von Ezrin durch PIP₂ belegen, bleibt die Frage, welchen Einfluss die Phosphorylierung ausübt. Möglicherweise wird durch die Phosphorylierung in ERM-Proteinen der Aktivitätszustand des Proteins aufrechterhalten oder verlängert und so die Funktion des Proteins gesteuert. Ein weiterer Faktor, der Berücksichtigung finden muss, besteht darin, dass die diskutierten Studien fast ausnahmslos in Zellen durchgeführt wurden, in denen trotz Hochregulierung, Applikation oder Injektion von Substanzen ein komplexes Zusammenspiel der verschiedensten Parameter vorliegt. Im Gegensatz hierzu basieren die Resultate dieser Arbeit auf der genauen Untersuchung weniger Komponenten. Aus diesen ergibt sich das postulierte Modell, dass durch die kooperative Adsorption von Ezrin auf PIP₂-haltige Membranen eine aktivierte Proteinpopulation resultiert, die in der Lage ist als Anheftungspunkt für Aktinfilamente zu fungieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Adsorptionsverhalten von Ezrin an und seine laterale Organisation auf Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2)-haltigen Membranoberflächen mittels Quarzmikrowaage (QCM)-Technik und Rasterkraftmikroskopie (SFM) charakterisiert und quantifiziert. Für die QCM-Messungen wurden auf einer Goldelektrode eines 5 MHz-Schwingquarzes festkörperunterstützte Membranen, bestehend aus einer Oktanthiol (OT)-Monoschicht und einer zweiten 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC)-Monoschicht mit variierenden PIP_2 -Gehalten immobilisiert. So konnte zum einen die Spezifität von Ezrin für PIP_2 nachgewiesen werden, zum anderen adsorbierte, einhergehend mit einer höheren PIP_2 -Konzentration, eine größere Menge Protein an die Membran. Im Gegensatz hierzu konnte die Bindung an reine POPC-Membranen nicht beobachtet werden. Eine detaillierte Betrachtung der Kinetik und der Reversibilität der Ezrinadsorption zeigte, dass ein Großteil des Proteins irreversibel an die Membran adsorbiert. Auf topographischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass Ezrin in Form von zweidimensionalen Proteindomänen, die ein zeitabhängiges Wachstum zeigen, an die Membran bindet. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine laterale Interaktion der Ezrinmoleküle auf der Oberfläche postuliert. Unter der Annahme, dass der Bindungsprozess auf einer positiven Kooperativität der Ezrinmoleküle basiert, war es möglich, Adsorptions- und Desorptionskinetiken mittels eines von Allen P. Minton entwickelten Modells zu simulieren. Zusätzlich wurde aus den kinetischen Daten die Adsorptionsisotherme der Ezrinbindung generiert und daraus die Bindungskonstante $K_{\text{Ads}} = 10^8 \text{ M}^{-1}$ bestimmt.

Basierend auf diesen Resultaten wurden in einem zweiten Schritt mögliche Aktivierungswege von Ezrin untersucht. Hierbei wurde zunächst die Wechselwirkung von Ezrin mit S100P untersucht, das eine mögliche Aktivierung von Ezrin induzieren könnte. Allerdings war eine Interaktion der beiden Proteine mittels Vesikelassays und QCM-Messungen nicht nachzuweisen.

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Aktivierung von Ezrin nur durch die Interaktion des Proteins mit PIP_2 stattfinden

kann. Hierzu wurde Ezrin entweder an PIP₂-haltige oder, über dessen His-Tag, an Ni²⁺-1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-([N(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure] Succinyl) (Ni-NTA-DOGS)-haltige Membranen adsorbiert und mit fluoreszenzmarkierten Aktinfilamenten inkubiert. Nur auf den PIP₂-haltigen Membranen wurden fluoreszenzmarkierte Filamente beobachtet, was die Aktivierung von Ezrin durch PIP₂ beweist. Mittels Pixelanalyse wurde ein Belegungsgrad der Aktinfilamente von (24 ± 18) % für eine mit Ezrin belegte POPC / PIP₂ (9:1)-Membran und von (0,3 ± 0,2) % für eine mit Ezrin belegte DOPC / Ni-NTA-DOGS (9:1)-Membran bestimmt.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Algrain, M., Turunen, O., Vaheri, A., Louvard, D. & Arpin, M. (1993). Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *J. Cell Biol.* **120**, 129-139.
2. Bretscher, A. (1999). Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 109-116.
3. Bretscher, A., Edwards, K. & Fehon, R. G. (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 586-599.
4. Tsukita, S. & Yonemura, S. (1999). Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 34507-34510.
5. Mangeat, P., Roy, C. & Martin, M. (1999). ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol.* **9**, 187-192.
6. Bretscher, A. (1983). Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells. *J. Cell Biol.* **97**, 425-432.
7. Gould, K. L., Cooper, J. A., Bretscher, A. & Hunter, T. (1986). The protein-tyrosine kinase substrate, p81, is homologous to a chicken microvillar core protein. *Journal of Cell Biology* **102**, 660-669.
8. Tsukita, S., Hieda, Y. & Tsukita, S. (1989). A new 82-kD barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell-to-cell adherens junction: purification and characterization. *J. Cell Biol.* **108**, 2369-2382.
9. Lankes, W., Griesmacher, A., Grunwald, J., Schwartz-Albiez, R. & Keller, R. (1988). A heparin-binding protein involved in inhibition of smooth-muscle cell proliferation. *Biochem. J.* **251**, 831-842.
10. Chishti, A. H., Kim, A. C., Marfatia, S. M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S. C., Low, P. S., Rouleau, G. A., Mohandas, N., Chasis, J. A., Conboy, J. G., Gascard, P., Takakuwa, Y., Huang, S. C., Benz, E. J., Jr., Bretscher, A., Fehon, R. G., Gusella, J. F., Ramesh, V., Solomon, F., Marchesi, V. T., Tsukita, S., Tsukita, S., Hoover, K. B. & et al. (1998). The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 281-282.
11. Doi, Y., Itoh, M., Yonemura, S., Ishihara, S., Takano, H., Noda, T. & Tsukita, S. (1999). 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. *J. Biol. Chem.* **274**, 2315-2321.
12. Takeuchi, K., Sato, N., Kasahara, H., Funayama, N., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. & Tsukita, S. (1994). Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members. *J. Cell Biol.* **125**, 1371-1384.
13. Hughes, S. C. & Fehon, R. G. (2007). Understanding ERM proteins--the awesome power of genetics finally brought to bear. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 51-56.
14. Saotome, I., Curto, M. & McClatchey, A. I. (2004). Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. *Dev. Cell* **6**, 855-864.

15. Turunen, O., Wahlstrom, T. & Vaheri, A. (1994). Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *J. Cell Biol.* **126**, 1445-1453.
16. Gary, R. & Bretscher, A. (1995). Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1061-1075.
17. Smith, W. J., Nassar, N., Bretscher, A., Cerione, R. A. & Karplus, P. A. (2003). Structure of the active N-terminal domain of Ezrin. Conformational and mobility changes identify keystone interactions. *J. Biol. Chem.* **278**, 4949-4956.
18. Hamada, K. S., Toshiyuki; Matsui, Takeshi; Tsukita, Shoichiro; Tsukita, Sachiko; Hakoshima, Toshio. (2000). Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J.* **19**, 4449-4462.
19. Edwards, S. D. & Keep, N. H. (2001). The 2.7 Å crystal structure of the activated FERM domain of moesin: an analysis of structural changes on activation. *Biochemistry* **40**, 7061-7068.
20. Barret, C., Roy, C., Montcourrier, P., Mangeat, P. & Niggli, V. (2000). Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. *J. Cell Biol.* **151**, 1067-1080.
21. Pearson, M. A., Reczek, D., Bretscher, A. & Karplus, P. A. (2000). Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* **101**, 259-270.
22. Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S. & Tsukita, S. (1998). Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *Journal of Cell Biology* **140**, 647-657.
23. Simons, P. C., Pietromonaco, S. F., Reczek, D., Bretscher, A. & Elias, L. (1998). C-terminal threonine phosphorylation activates ERM proteins to link the cell's cortical lipid bilayer to the cytoskeleton. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **253**, 561-565.
24. Schmidt, A. & Hall, M. N. (1998). Signaling to the actin cytoskeleton. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **14**, 305-338.
25. Hirao, M., Sato, N., Kondo, T., Yonemura, S., Monden, M., Sasaki, T., Takai, Y. & Tsukita, S. (1996). Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J. Cell Biol.* **135**, 37-51.
26. Oshiro, N., Fukata, Y. & Kaibuchi, K. (1998). Phosphorylation of moesin by Rho-associated kinase (Rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvilli-like structures. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 34663-34666.
27. Shaw, R. J., Henry, M., Solomon, F. & Jacks, T. (1998). RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* **9**, 403-419.
28. Auvinen, E., Kivi, N. & Vaheri, A. (2007). Regulation of ezrin localization by Rac1 and PIPK in human epithelial cells. *Experimental Cell Research* **313**, 824-833.

29. Koltzscher, M., Neumann, C., Konig, S. & Gerke, V. (2003). Ca²⁺-dependent binding and activation of dormant ezrin by dimeric S100P. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 2372-2384.
30. Donato, R. (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **33**, 637-668.
31. Heizmann, C. W., Fritz, G. & Schafer, B. W. (2002). S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front. Biosci.* **7**, d1356-1368.
32. Zachowski, A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.* **294** (Pt 1), 1-14.
33. Gascard, P., Tran, D., Sauvage, M., Sulpice, J. C., Fukami, K., Takenawa, T., Claret, M. & Giraud, F. (1991). Asymmetric distribution of phosphoinositides and phosphatidic acid in the human erythrocyte membrane. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* **1069**, 27-36.
34. Berridge, M. J. & Irvine, R. F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**, 315-321.
35. Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 11-21.
36. McLaughlin, S. W., Jiayao; Gambhir, Alok; Murray, Diana. (2002). PIP2 and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **31**, 151-175.
37. Janmey, P. A. & Lindberg, U. (2004). Cytoskeletal regulation: rich in lipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 658-666.
38. Niggli, V. (2005). Regulation of Protein Activities by Phosphoinositide Phosphates. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 57-79.
39. Janmey, P. A. (1994). Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 169-191.
40. Raucher, D., Stauffer, T., Chen, W., Shen, K., Guo, S., York, J. D., Sheetz, M. P. & Meyer, T. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell* **100**, 221-228.
41. Rusten, T. E. & Stenmark, H. (2006). Analyzing phosphoinositides and their interacting proteins. *Nat. Methods* **3**, 251-258.
42. Haugh, J. M., Codazzi, F., Teruel, M. & Meyer, T. (2000). Spatial sensing in fibroblasts mediated by 3' phosphoinositides. *J. Cell Biol.* **151**, 1269-1280.
43. Myat, M. M., Anderson, S., Allen, L. A. & Aderem, A. (1997). MARCKS regulates membrane ruffling and cell spreading. *Curr. Biol.* **7**, 611-614.
44. Wang, J., Arbuzova, A., Hangyas-Mihalyne, G. & McLaughlin, S. (2001). The effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate binds strongly to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **276**, 5012-5019.
45. Gambhir, A., Hangyas-Mihalyne, G., Zaitseva, I., Cafiso, D. S., Wang, J., Murray, D., Pentyala, S. N., Smith, S. O. & McLaughlin, S. (2004). Electrostatic sequestration of PIP2 on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins. *Biophys. J.* **86**, 2188-2207.
46. Niggli, V., Andreoli, C., Roy, C. & Mangeat, P. (1995). Identification of a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-binding domain in the N-terminal region of ezrin. *FEBS Lett.* **376**, 172-176.
47. Niggli, V. (2001). Structural properties of lipid-binding sites in cytoskeletal proteins. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 604-611.

48. Fievet, B. T., Gautreau, A., Roy, C., Del Maestro, L., Mangeat, P., Louvard, D. & Arpin, M. (2004). Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J. Cell Biol.* **164**, 653-659.
49. http://cellix.imolbio.oeaw.ac.at/Images/Fig1_high.jpg.
50. Luders, J. & Stearns, T. (2007). Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 161-167.
51. Caviston, J. P. & Holzbaur, E. L. (2006). Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol.* **16**, 530-537.
52. Wittmann, T., Hyman, A. & Desai, A. (2001). The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat. Cell Biol.* **3**, E28-34.
53. Steinert, P. M. & Parry, D. A. (1985). Intermediate filaments: conformity and diversity of expression and structure. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 41-65.
54. Klymkowsky, M. W. (1995). Intermediate filaments: new proteins, some answers, more questions. *Current Opinion in Cell Biology* **7**, 46-54.
55. Kreplak, L. & Fudge, D. (2007). Biomechanical properties of intermediate filaments: from tissues to single filaments and back. *Bioessays* **29**, 26-35.
56. Pollard, T. D., Blanchard, L. & Mullins, R. D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **29**, 545-576.
57. Kabsch, W. & Vandekerckhove, J. (1992). Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 49-76.
58. Straub, F. B. (1942). Actin. *Studies from the Institute of Medical Chemistry, University of Szeged* **2**, 3-15.
59. Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F. & Holmes, K. C. (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44.
60. Rizvi, S. A., Tereshko, V., Kossiakoff, A. A. & Kozmin, S. A. (2006). Structure of Bistramide A-Actin Complex at a 1.35 .ANG. Resolution. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 3882-3883.
61. Korn, E. D. (1982). Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol. Rev.* **62**, 672-737.
62. Egelman, E. H. (1985). The structure of F-actin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **6**, 129-151.
63. Lorenz, M., Popp, D. & Holmes, K. C. (1993). Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *Journal of molecular biology* **234**, 826-836.
64. Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W. & Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44-49.
65. Frieden, C. (1985). Actin and tubulin polymerization: the use of kinetic methods to determine mechanism. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **14**, 189-210.
66. Staiger, C. J. & Blanchard, L. (2006). Actin dynamics: old friends with new stories. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 554-562.
67. Safer, D., Elzinga, M. & Nachmias, V. T. (1991). Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J. Biol. Chem.* **266**, 4029-4032.
68. Cooper, J. A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* **105**, 1473-1478.
69. Estes, J. E., Selden, L. A. & Gershman, L. C. (1981). Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of muscle actin. *Biochemistry* **20**, 708-712.

70. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
71. <http://www.expasy.org/>.
72. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
73. Ende, D. M., Klaus Michael. (1993). Electrochemical impedance spectroscopy. *Chemie in Unserer Zeit* **27**, 134-140.
74. Steinem, C., Janshoff, A., Ulrich, W. P., Sieber, M. & Galla, H. J. (1996). Impedance analysis of supported lipid bilayer membranes: a scrutiny of different preparation techniques. *Biochim. Biophys. Acta* **1279**, 169-180.
75. Sauerbrey, G. (1959). Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik* **155**, 206-222.
76. Nomura, T. & Okuhara, M. (1982). Frequency shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids. *Analytica Chimica Acta* **142**, 281-284.
77. Kanazawa, K. K. & Gordon, J. G., II. (1985). Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. *Analytical Chemistry* **57**, 1770-1771.
78. Janshoff, A., Galla, H.-J. & Steinem, C. (2000). Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors-an alternative to optical biosensors? *Angewandte Chemie, International Edition* **39**, 4004-4032.
79. Schumacher, R. (1990). Die Quarzmikrowaage: Eine neue Meßtechnik zur in-situ-Untersuchung des Phasengrenzbereichs fest/flüssig. *Angewandte Chemie* **102**, 347-360.
80. Kaspar, M., Stadler, H., Weiss, T. & Ziegler, C. (2000). Thickness shear mode resonators ("mass-sensitive devices") in bioanalysis. *Fresenius J. Anal. Chem.* **366**, 602-610.
81. Johannsmann, D. (2007). Studies of Viscoelasticity with the QCM. In *Piezoelectric Sensors* (Steinem, C. & Janshoff, A., eds.), Vol. 5, pp. 49-109. Springer, Berlin Heidelberg.
82. Martin, S. J., Granstaff Edwards, V. & Frye, G. C. (1991). Characterization of a quartz crystal microbalance with simultaneous mass and liquid loading. *Analytical Chemistry* **63**, 2272-2282.
83. Buttry, D. A. & Ward, M. D. (1992). Measurement of interfacial processes at electrode surfaces with the electrochemical quartz crystal microbalance. *Chemical Reviews (Washington, DC, United States)* **92**, 1355-1379.
84. Bandey, H. L., Martin, S. J., Cernosek, R. W. & Hillman, A. R. (1999). Modeling the Responses of Thickness-Shear Mode Resonators under Various Loading Conditions. *Analytical Chemistry* **71**, 2205-2214.
85. Lucklum, R. & Hauptmann, P. (2003). Transduction mechanism of acoustic-wave based chemical and biochemical sensors. *Measurement Science and Technology* **14**, 1854-1864.
86. Drude, P. (1887). Ueber die Gesetze der Reflexion und Brechung des Lichtes an der Grenze absorbirender Krystalle. *Annalen der Physik* **268**, 584-625.
87. Vedam, K. (1998). Spectroscopic ellipsometry: a historical overview. *Thin Solid Films* **313-314**, 1-9.
88. Azzam, R. M. A. & Bashara, N. M. (1977). *Ellipsometry and Polarized Light.*, North-Holland, Amsterdam.
89. Rothen, A. (1945). The ellipsometer, an apparatus to measure thicknesses of thin surface films. *Review of Scientific Instruments* **16**, 26-30.

90. Arwin, H. (2000). Ellipsometry on thin organic layers of biological interest: characterization and applications. *Thin Solid Films* **377-378**, 48-56.
91. <http://www.tcd.ie/Physics/Surfaces/ellipsometry2.php>.
92. Malitson, I. H. (1965). Interspecimen Comparison of the Refractive Index of Fused Silica. *Journal of the Optical Society of America* **55**, 1205-1209.
93. Jin, Y. L., Chen, J. Y., Xu, L. & Wang, P. N. (2006). Refractive index measurement for biomaterial samples by total internal reflection. *Phys. Med. Biol.* **51**, N371-N379.
94. Vörös, J. (2004). The Density and Refractive Index of Adsorbing Protein Layers. *Biophysical Journal* **87**, 553-561.
95. Schiebener, P., Straub, J., Levelt Sengers, J. M. H. & Gallagher, J. S. (1990). Refractive Index of Water and Steam as Function of Wavelength, Temperature and Density. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **19**, 677-714.
96. Galla, H. J. (1988). *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
97. Minton, A. P. (2000). Effects of excluded surface area and adsorbate clustering on surface adsorption of proteins I. Equilibrium models. *Biophys. Chem.* **86**, 239-247.
98. Minton, A. P. (2001). Effects of excluded surface area and adsorbate clustering on surface adsorption of proteins. II. Kinetic models. *Biophys. J.* **80**, 1641-1648.
99. Bain, C. D., Troughton, E. B., Tao, Y. T., Evall, J., Whitesides, G. M. & Nuzzo, R. G. (1989). Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *Journal of the American Chemical Society* **111**, 321-335.
100. Plant, A., L. (1993). Self -Assembled Phospholipid/Alkanethiol Biomimetic Bilayers on Gold. *Langmuir* **9**, 2764-2767.
101. Becker, T., Gerke, V., Kube, E. & Weber, K. (1992). S100P, a novel Ca(2+)-binding protein from human placenta. cDNA cloning, recombinant protein expression and Ca²⁺ binding properties. *Eur. J. Biochem.* **207**, 541-547.
102. Emoto, Y., Kobayashi, R., Akatsuka, H. & Hidaka, H. (1992). Purification and characterization of a new member of the S-100 protein family from human placenta. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **182**, 1246-1253.
103. Zhang, H., Wang, G., Ding, Y., Wang, Z., Barraclough, R., Rudland, P. S., Fernig, D. G. & Rao, Z. (2003). The Crystal Structure at 2 .ANG. Resolution of the Ca²⁺-binding Protein S100P. *Journal of Molecular Biology* **325**, 785-794.
104. Gould, K. L., Bretscher, A., Esch, F. S. & Hunter, T. (1989). cDNA cloning and sequencing of the protein-tyrosine kinase substrate, ezrin, reveals homology to band 4.1. *EMBO J.* **8**, 4133-4142.
105. Turunen, O., Winqvist, R., Pakkanen, R., Grzeschik, K. H., Wahlstrom, T. & Vaheri, A. (1989). Cytovillin, a microvillar Mr 75,000 protein. cDNA sequence, prokaryotic expression, and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* **264**, 16727-16732.
106. Janshoff, A. & Steinem, C. (2001). Quartz crystal microbalance for bioanalytical applications. *Sensors Update* **9**, 313-354.
107. Richter, R. P., Him, J. L. K., Tessier, B., Tessier, C. & Brisson, A. R. (2005). On the kinetics of adsorption and two-dimensional self-assembly of annexin A5 on supported lipid bilayers. *Biophysical Journal* **89**, 3372-3385.

108. Niggli, V., Kaufmann, S., Goldmann, W. H., Weber, T. & Isenberg, G. (1994). Identification of functional domains in the cytoskeletal protein talin. *European Journal of Biochemistry* **224**, 951-957.
109. Cohen, A. M., Liu, S. C., Lawler, J., Derick, L. & Palek, J. (1988). Identification of the protein 4.1 binding site to phosphatidylserine vesicles. *Biochemistry* **27**, 614-619.
110. Butikofer, P., Lin, Z. W., Chiu, D. T., Lubin, B. & Kuypers, F. A. (1990). Transbilayer distribution and mobility of phosphatidylinositol in human red blood cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 16035-16038.
111. Denisov, G., Wanaski, S., Luan, P., Glaser, M. & McLaughlin, S. (1998). Binding of basic peptides to membranes produces lateral domains enriched in the acidic lipids phosphatidylserine and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: an electrostatic model and experimental results. *Biophys. J.* **74**, 731-744.
112. Papayannopoulos, V., Co, C., Prehoda, K. E., Snapper, S., Taunton, J. & Lim, W. A. (2005). A polybasic motif allows N-WASP to act as a sensor of PIP(2) density. *Mol. Cell.* **17**, 181-191.
113. Nagle, J. F. & Tristram-Nagle, S. (2000). Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**, 159-195.
114. Ball, V. & Ramsden, J. J. (1997). Absence of surface exclusion in the first stage of lysozyme adsorption is driven through electrostatic self-assembly. *Journal of Physical Chemistry B* **101**, 5465-5469.
115. Nygren, H., Alaeddin, S., Lundstroem, I. & Magnusson, K.-E. (1994). Effect of surface wettability on protein adsorption and lateral diffusion. Analysis of data and a statistical model. *Biophysical Chemistry* **49**, 263-272.
116. Nygren, H. (1994). Kinetics of antibody binding to surface-immobilized antigen. Analysis of data and an empiric model. *Biophys. Chem.* **52**, 45-50.
117. Chambers, D. N. & Bretscher, A. (2005). Ezrin mutants affecting dimerization and activation. *Biochemistry* **44**, 3926-3932.
118. Richter, R. P. & Brisson, A. (2004). QCM-D on mica for parallel QCM-D-AFM studies. *Langmuir* **20**, 4609-4613.
119. Richter, R. P. & Brisson, A. R. (2005). Following the formation of supported lipid bilayers on mica: A study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. *Biophysical Journal* **88**, 3422-3433.
120. Dufrene, Y. F. & Lee, G. U. (2000). Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. *Biochim. Biophys. Acta* **1509**, 14-41.
121. Janshoff, A. & Steinem, C. (2001). Scanning force microscopy of artificial membranes. *Chembiochem* **2**, 798-808.
122. Bradshaw, J. P., Bushby, R. J., Giles, C. C. & Saunders, M. R. (1999). Orientation of the headgroup of phosphatidylinositol in a model biomembrane as determined by neutron diffraction. *Biochemistry* **38**, 8393-8401.
123. Pike, L. J. & Casey, L. (1996). Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J. Biol. Chem.* **271**, 26453-26456.
124. Pike, L. J. & Miller, J. M. (1998). Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* **273**, 22298-22304.

125. Bayburt, T. H., Carlson, J. W. & Sligar, S. G. (2000). Single Molecule Height Measurements on a Membrane Protein in Nanometer-Scale Phospholipid Bilayer Disks. *Langmuir* **16**, 5993-5997.
126. Menke, M., Gerke, V. & Steinem, C. (2005). Phosphatidylserine Membrane Domain Clustering Induced by Annexin A2/S100A10 Heterotetramer. *Biochemistry* **44**, 15296-15303.
127. Berryman, M., Gary, R. & Bretscher, A. (1995). Ezrin oligomers are major cytoskeletal components of placental microvilli: a proposal for their involvement in cortical morphogenesis. *J. Cell Biol.* **131**, 1231-1242.
128. Bretscher, A., Gary, R. & Berryman, M. (1995). Soluble ezrin purified from placenta exists as stable monomers and elongated dimers with masked C-terminal ezrin-radixin-moesin association domains. *Biochemistry* **34**, 16830-16837.
129. Zhu, L., Liu, Y. & Forte, J. G. (2005). Ezrin oligomers are the membrane-bound dormant form in gastric parietal cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**, C1242-54.
130. Donato, R. (1999). Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim. Biophys. Acta* **1450**, 191-231.
131. Koltzsch, M. & Gerke, V. (2000). Identification of hydrophobic amino acid residues involved in the formation of S100P homodimers in vivo. *Biochemistry* **39**, 9533-9539.
132. Gribenko, A. V. & Makhadze, G. I. (1998). Oligomerization and divalent ion binding properties of the S100P protein: a Ca²⁺/Mg²⁺-switch model. *J. Mol. Biol.* **283**, 679-694.
133. Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J. & Kawai, A. (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J. Cell Biol.* **126**, 391-401.
134. Bretscher, A. (1989). Rapid phosphorylation and reorganization of ezrin and spectrin accompany morphological changes induced in A-431 cells by epidermal growth factor. *J. Cell Biol.* **108**, 921-930.
135. Yonemura, S., Matsui, T. & Tsukita, S. (2002). Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo. *J. Cell Sci.* **115**, 2569-2580.
136. Matsui, T., Yonemura, S. & Tsukita, S. (1999). Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidyl-inositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr. Biol.* **9**, 1259-1262.
137. Hatano, S. & Oosawa, F. (1966). Isolation and characterization of plasmodium actin. *Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects* **127**, 488-498.
138. Shuster, C. B. & Herman, I. M. (1995). Indirect association of ezrin with F-actin: isoform specificity and calcium sensitivity. *J. Cell Biol.* **128**, 837-848.
139. Yao, X., Cheng, L. & Forte, J. G. (1996). Biochemical characterization of ezrin-actin interaction. *J. Biol. Chem.* **271**, 7224-7229.
140. Roy, C., Martin, M. & Mangeat, P. (1997). A dual involvement of the amino-terminal domain of ezrin in F- and G-actin binding. *J. Biol. Chem.* **272**, 20088-20095.
141. Garrels, J. I. & Gibson, W. (1976). Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell* **9**, 793-805.

142. Grimard, R., Tancrede, P. & Gicquaud, C. (1993). Interaction of actin with positively charged phospholipids: A monolayer study. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **190**, 1017-1022.
143. Le Bihan, T., Pelletier, D., Tancrede, P., Heppell, B., Chauvet, J. P. & Gicquaud, C. R. (2005). Effect of the polar headgroup of phospholipids on their interaction with actin. . *Journal of Colloid and Interface Science* **288**, 88-96.
144. Yanagida, T., Nakase, M., Nishiyama, K. & Oosawa, F. (1984). Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin. *Nature* **307**, 58-60.
145. Lanni, F. & Ware, B. R. (1984). Detection and characterization of actin monomers, oligomers, and filaments in solution by measurement of fluorescence photobleaching recovery. *Biophys. J.* **46**, 97-110.
146. Simon, J. R., Gough, A., Urbanik, E., Wang, F., Lanni, F., Ware, B. R. & Taylor, D. L. (1988). Analysis of rhodamine and fluorescein-labeled F-actin diffusion in vitro by fluorescence photobleaching recovery. *Biophys. J.* **54**, 801-815.
147. Pestonjamas, K., Amieva, M. R., Strassel, C. P., Nauseef, W. M., Furthmayr, H. & Luna, E. J. (1995). Moesin, ezrin, and p205 are actin-binding proteins associated with neutrophil plasma membranes. *Molecular Biology of the Cell* **6**, 247-259.
148. Gautreau, A., Louvard, D. & Arpin, M. (2000). Morphogenic effects of ezrin require a phosphorylation-induced transition from oligomers to monomers at the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **150**, 193-203.
149. Stroumpoulis, D., Parra, A. & Tirrell, M. (2006). A kinetic study of vesicle fusion on silicon dioxide surfaces by ellipsometry. *AIChE Journal* **52**, 2931-2937.
150. Reviakine, I. & Brisson, A. (2000). Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **16**, 1806-1815.
151. Kwon, H. J., Kakugo, A., Shikinaka, K., Osada, Y. & Gong, J. P. (2005). Morphology of Actin Assemblies in Response to Polycation and Salts. *Biomacromolecules* **6**, 3005-3009.
152. Johnson, B. R., Bushby, R. J., Colyer, J. & Evans, S. D. (2006). Self-assembly of actin scaffolds at ponticulin-containing supported phospholipid bilayers. *Biophys. J.* **90**, L21-3.
153. Huang, L., Wong, T. Y., Lin, R. C. & Furthmayr, H. (1999). Replacement of threonine 558, a critical site of phosphorylation of moesin in vivo, with aspartate activates F-actin binding of moesin. Regulation by conformational change. *J. Biol. Chem.* **274**, 12803-12810.

8 ANHANG

8.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid-Bisacrylamid (30 %)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Agar	Merck, Darmstadt
Aktin	Cytoskeleton (über: tebu-bio, Offenbach)
Albumin Fraktion V	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor® 488 Phalloidin	Invitrogen, Eugene, USA
Ammoniumhydroxid	Acros Organics, New Jersey, USA
Ampicillin	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Antikörper:	
Penta-His-Antikörper	Qiagen, Hilden
Hexa-His-Antikörper	Geschenk Prof. Gerke, Münster
Anti-Maus, HRP-linked	Geschenk Prof. Gerke, Münster
APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Argon	Air Liquide, Düsseldorf
ATP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Calciumchlorid, CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chrom	Bal Tec, Pfäffikon, CH
Coomassie Brilliant Blue G250	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Complete-mini, EDTA-free	Roche, Grenzach-Wyhlen
DOPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
DOTAP	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA (Na-Salz)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EGTA (Na-Salz)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Entwicklerlösung	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol, reinst	Merck, Darmstadt
Fixierlösung	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
Glutathion	AppliChem, Darmstadt
Glutathion-Sepharos 4B	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Gold	Cressington (über: Elektronen-Optik-Service GmbH, Dortmund)
Hefeextrakt	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe

Imidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Iod	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
IPTG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat (III), K ₃ [Fe(CN) ₆]	Merck, Darmstadt
Kaliumiodid	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lumigen™ TMA6 Lösung A und B	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid, MgCl ₂ · 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol, reinst	Merck, Darmstadt
Mucasol®	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck,Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Ni-NTA-DOGS	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
1-Oktanthiol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Phosphorsäure (85 %)	Merck, Darmstadt
PIP ₂	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
POPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Sauerstoff	Air Liquide, Düsseldorf
SigmaMarker™ (wide range)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Texas Red® DHPE	Invitrogen, Eugene, USA
Thrombin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris	USB, Cleveland, USA
Trypton	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Tween®20	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (30 %)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe

8.2 Materialien

Cellophan
Dialyseschläuche VISKING

Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Carl-Roth GmbH, Karlsruhe

Einwegküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
FEP Schläuche	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Filterpapier	BioRad, Hercules, USA
Kalrez® Dichtringe	DuPont (über: Fahrenholz, Hattingen)
5-MHz-AT-cut Quarze	KVG, Neckarbischofsheim
Mikroliterspritze	Hamilton, Bonaduz, CH
Nitrozellulose	BioRad, Hercules, USA
Photopapier	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
Platindraht	Good Fellow, Cambridge, UK
Polycarbonatmembran	Avestin, Ottawa, Canada
Quarzküvette	Hellma GmbH, Mühlheim
Silberleitkleber	Conrad Elektronik, Wernberg
Siliziumträger	CrysTec GmbH, Berlin
Tygon LFL Schläuche	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Trocknungsrahmen für Gele	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe

8.3 Geräte

Reinstwasseranlage

Millipore Elix
MilliQ A10

Millipore, Eschborn
Millipore, Eschborn

Impedanzspektrometer

SI 1260

Solartron Instruments, Farnborough,
UK

QCM

Frequenzzähler 53181A
Netzteil E3630A
Oszillatorschaltkreis TTL SN74LS124N
Peristaltikpumpe RegloDigital

HP, San Diego, USA
HP, San Diego, USA
Texas Instruments, Dallas, USA
Ismatec, Wertheim-Mondfeld

Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskop
CCD Kamera AxioCam HRm
Filterset 44 (BP475/40 FT500 BP530/50)
Filterset 45 (BP560/40 FT585 BP630/75)

Carl Zeiss GmbH, Göttingen
Carl Zeiss GmbH, Göttingen
Carl Zeiss GmbH, Göttingen
Carl Zeiss GmbH, Göttingen

Ellipsometer

ELX-O2C

DRE, Ratzeburg

Sonstiges

Aufdampfanlage Balzers BAE 250	Bal-Tec, Pfäffikon, CH
Feinwaage Adventurer™	Ohaus, Gießen
Gelektrophoreseapparatur PerfectBlue Twin S	Peqlab, Erlangen
Spannungsquelle Consort E865	Peqlab, Erlangen
Minextruder (Liposofast®)	Avestin, Ottawa, Canada
pH-Meter Calimatic 766	Knick, Berlin
Plasmareiniger	Harrick, New York, USA
Schüttelinkubator SM 30	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tip-Sonifier Sonoplus HD2070	Bandelin, Berlin
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin, Berlin
UV-VIS-Spektrometer Cary50	Varian, Palo Alto, USA
Vakuumtrockenschrank	Binder, Tuttlingen
Vortexer	Heidolph, Schwabach
Wasserbad Ecotherm	analytics GmbH, Neu-Ulm
Western blot Apparatur Trans-Blot® SB	BioRad, Hercules, USA
Spannungsquelle PowerPac 200	BioRad, Hercules, USA
Wippschüttler ST5	CAT, Staufen
Zentrifugen:	
Optima™ L-90K Beckman Coulter, Krefeld	
Allegra™ X-22R Beckman Coulter, Krefeld	
Heraeus Fresco 17 Thermo, Waltham, USA	

8.4 Abkürzungsverzeichnis

AFM	Rasterkraftmikroskop (<i>atomic force microscope</i>)
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
BVD	Butterworth van Dyke
C-EMRAD	<i>C-terminal ERM association domain</i>
DAG	Diacylglycerol
DHPE	1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DOPC	Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propan
DTT	1,4-Dithiotreitol
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
FERM	<i>Four-point one protein ERM</i>
GST	Glutathion-S-transferase
GTP	Guanosintriphosphat
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LUV	große unilamellare Vesikel (<i>large unilamellar vesicles</i>)

MARCKS	<i>myristoylated alanine-rich C kinase substrate</i>
min	Minute
MLV	multilamellare Vesikel
N-EMRAD	<i>N-terminal ERM association domain</i>
Ni-NTA-DOGS	Ni^{2+} -1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-([N(5-Amino-1-Carboxypentyl)iminodiessigsäure]succinyl)
OD	Optische Dichte
OT	1-Oktanthiol
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PDB	<i>Protein data bank</i>
PI	Phosphoinositol
pI	isoelektrischer Punkt
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
rpm	<i>rounds per minute</i>
QCM	Quarzmikrowaage (Quartz Crystal Microbalance)
QCM-D	Dissipative Quarzmikrowaage-Technik
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFM	Rasterkraftmikroskop (<i>scanning force microscopy</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TSM	Dickenscherschwinger (<i>thickness shear mode</i>)

8.5 Symbolverzeichnis

<i>a</i>	Fläche	<i>M</i>	molare Masse
<i>c</i>	Konzentration	<i>R</i>	Widerstand, Fresnelscher
<i>d</i>	Dicke		Koeffizient, Gaskonstante
<i>f</i>	Frequenz	<i>I</i>	reflektierte Intensität
<i>h</i>	Höhe	Re	Realteil einer komplexen
<i>k</i>	Ratenkonstante		Zahl
<i>m</i>	Masse	<i>S_f</i>	Sauerbreykonstante,
<i>n</i>	Laufzahl, Stoffmenge, Brechungsindex	<i>T</i>	Schichtwägeempfindlichkeit
<i>q</i>	Ladung	<i>U</i>	absolute Temperatur
<i>r</i>	Radius, Fresnelscher	<i>Z</i>	Spannung, potentielle Energie
	Koeffizient	β	Impedanz
<i>s</i>	Umfang	ε	optische Weglänge
<i>t</i>	Zeit	ε_0	Extinktionskoeffizient
<i>z</i>	Koordinate	ε_r	elektrische Feldkonstante
<i>A</i>	Fläche	ϕ	Dielektrizitätskonstante
			Einfallswinkel, Brechungswinkel
<i>C</i>	Kapazität	γ	Aktivitätskoeffizient
<i>D</i>	Dissipationsfaktor	η	Viskosität
	Diffusionskonstante	φ	Phasenverschiebung
<i>E</i>	Extinktion, elektrischer	λ	Wellenlänge

F	Feldvektor freie Energie	μ	Schermodul, Chemisches Potential
I	Strom	ρ	(Oberflächen)dichte
Im	Imaginärteil einer komplexen Zahl	ω	Kreisfrequenz
J	<i>piggyback</i> Konstante	Δ	Differenz, Phasendifferenz
K	Gleichgewichtskonstante, Frequenzkonstante	Θ	Belegungsgrad
L	Induktivität	Ψ	Amplitudenänderung

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle

- Prof. Dr. Claudia Steinem für die interessante Aufgabenstellung, die stetige Diskussionsbereitschaft sowie die uneingeschränkte Unterstützung der Doktorarbeit.
- Prof. Dr. Volker Gerke von der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster für wertvolle Anregungspunkte bezüglich der Arbeit sowie für die Bereitstellung der Labore im ZMBE für die Proteinisolierung.
- Prof. Dr. Andreas Janshoff von der Johannes Gutenberg-Universität Mainz für aufschlussreiche Diskussionen sowie für die Hilfe bei den Simulationen der Kinetiken.
- Judith für die exzellente Zusammenarbeit und für die unkomplizierte Hilfe bei der Isolierung der Proteine am ZMBE.
- Matthias für die hervorragende Kooperation, für die in dieser Arbeit dargestellten SFM-Aufnahmen sowie die wertvollen Diskussionen am Telefon und am Rande zahlreicher Konferenzen.
- Allen aktuellen sowie ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises in Göttingen und Regensburg.
- Meiner Laborkollegin Claudia für eine unvergessliche Zeit im „sunshine lab“ sowie für die stetige Bereitschaft zur allabendlichen „Messung“.
- Sandra und Anja für das Korrekturlesen der Arbeit.
- Christian, Natascha, Aurelio und Hans-Jörg für die ergiebigen „Fachdiskussionen“ der Bundesligaspieldate (und sonstiger Sportereignisse).
- Christian, Manuela, Katja, Natascha, Claudia und Winnie für ein tolles Arbeitsklima und eine wunderschöne Zeit, auch außerhalb des Labors.
- Markus für die kurzweiligen „Warhammer 40,000“-Spieleabende, die leider viel zu selten waren.
- Allen Studienkollegen für eine unvergessliche Studienzeit.
- Meinen Eltern und Großeltern für die finanzielle und die mentale Unterstützung.
- Sandra für die liebevolle Unterstützung und dafür, dass sie, vor allen in den stressigen Phasen, meine Launen ertragen musste.

Lebenslauf

Name	Wolfgang Alexander Herrig
geboren	21. Februar 1977 in Trier
Schulbildung	08/1983 – 06/1986 Grundschule St. Peter, Trier-Ehrang 09/1986 – 07/1987 Grundschule Bechtsrieth 09/1987 – 07/1996 Kepler-Gymnasium Weiden i.d.Opf. <u>28. Juni 1996 Allgemeine Hochschulreife</u>
Studium	11/1997 – 06/2003 Studium Lehramt für Gymnasien Chemie und Biologie an der Universität Regensburg 01/2002 – 07/2002 Examensarbeit am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr. Claudia Steinem <u>23. Juli 2003 Erstes Staatsexamen</u>
Tätigkeiten	11/1996 – 10/1997 Ableistung des Zivildiensts Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg und am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August Universität Göttingen
Förderung	01/2002 – 06/2002 VCI-Stipendium für Lehramts-Kandidaten
Dissertation	Beginn der Dissertation am 01. September 2003 am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr. Claudia Steinem. Ab 01. April 2006 am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August Universität Göttingen unter Anleitung von Prof. Dr. Claudia Steinem

Publikationen und Poster

Publikationen

Lüthgens, E., Herrig, A., Kastl, K., Steinem, C., Reiss, B., Wegener, J., Pignataro, B. & Janshoff, A. **2003** Adhesion of liposomes: a quartz crystal microbalance study. *Meas. Sci. Technol.*, 14, 1865-75

Kastl, K., Herrig, A., Lüthgens, E., Janshoff, A. & Steinem, C. **2004** Scrutiny of annexin A1 mediated membrane-membrane interaction by means of a thickness shear mode resonator and computer simulations. *Langmuir*, 20(17), 7246-53

Herrig, A., Janke, M., Austermann, J., Gerke, V., Janshoff, A. & Steinem, C. **2006** Cooperative adsorption of ezrin on PIP₂-containing membranes. *Biochemistry*, 45(43), 13025-34

Posterpräsentationen

„Interaction of ezrin with S100P“
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, September 2004, Freiburg

„Interaction of ezrin with Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate“
FECS School on Protein Chemistry, Januar 2005, Brixen (I)

„Interaction of ezrin with artificial lipid membranes: A quartz crystal microbalance study“
Deutsches Biosenor Symposium, März 2005, Regensburg

„Interaction of ezrin with artificial lipid membranes“
Europäischer Biophysik Kongress (EBSA), August 2005, Montpellier (F)

„Interaction of ezrin with PIP₂“
Workshop on Dynamics of artificial and biological membranes, März 2006,
Gomadingen

„Cooperative adsorption of ezrin on PIP₂ containing membranes“
Jahrestagung der Deutschen Biophysikalischen Gesellschaft, September 2006, Mainz