

**Kontrolle der lateralen Organisation
von Membranproteinen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

David Jan Walrafen

aus

Bonn

Bonn 2012

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter

Herr Prof. Thorsten Lang

2. Gutachter

Herr Prof. Christoph Thiele

Tag der Promotion: 24.05.2012

Erscheinungsjahr: 2012

Erklärung

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Zilly, F. E.*; Halemani, N. D.*; **Walrafen, D.***; Spitta, L.; Schreiber, A.; Jahn, R.; Lang, T. (2011): Ca^{2+} induces clustering of membrane proteins in the plasma membrane via electrostatic interactions. *EMBO J* 30 (7), S. 1209-1220.

*These authors contributed equally to this work

Bill, A.; Schmitz, A.; Albertoni, B.; Song, J. N.; Heukamp, L. C.; **Walrafen, D.** et al. (2010): Cytohesins are cytoplasmic ErbB receptor activators. *Cell* 143 (2), S. 201-211.

INHALTSVERZEICHNIS

1 KURZFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Die Zelltheorie	3
2.2 Die Zellmembran	4
2.2.1 Zusammensetzung von Zellmembranen.....	4
Lipide der Plasmamembran.....	4
Membranproteine	5
Membrangebundene Kohlenhydrate	6
2.2.2 Theorien zur Membranorganisation	7
Historische Modelle	7
Membranmodelle der letzten Jahrzehnte	8
2.3 Analysemethoden zur Untersuchung der Organisation und der Funktionalität von Membranproteinen.....	18
2.3.1 Biochemische Aufreinigung und Analyse von Membranmikrodomänen.....	19
2.3.2 Mikroskopie von Membranproteinen	22
Elektronenmikroskopie	22
Fluoreszenzmikroskopie.....	23
2.3.3 Modellsysteme für die Analyse der Membranorganisation	26
Artifizielle Membranen	26
<i>Membrane Sheets</i>	27
3 ZIELSETZUNG.....	29
4 MATERIALIEN UND METHODEN.....	30
4.1 Materialien	30
4.1.1 Pufferlösungen	30
Sonifizierungs-Puffer	30
KGLu Puffer	30
Sonifizierungs KGLu Puffer	30

BSA - KGlu Puffer.....	31
Ringerlösung.....	31
Ringerlösung (hohe Calcium-Konzentration)	31
PBS.....	31
Paraformaldehyd - Stocklösung	31
Zytomix	31
Stocklösung CaDPTA (125x).....	31
Stocklösung DPTA (125x)	32
CaDPTA/DPTA - BSA-KGlu Puffer	32
TMA-DPH-Lösung	32
Mowiol-Eindeckelmedium.....	32
4.1.2 Zellkulturmedien	32
PC12-Standardmedium	32
HepG2-Standardmedium.....	33
H460-Standardmedium	33
SkBr3-Standardmedium	33
Hungermedien	33
4.1.3 Antikörper	33
Primäre Antikörper.....	33
Sekundäre Antikörper.....	34
4.1.4 Reagenzien / Faktoren.....	35
Stimulationsagentien für Tyrosinkinase.....	35
Reagenzien für Calcium-Versuche.....	35
Protease Inhibitoren	35
Enzymmix für Glykokalix-Abbau.....	36
4.1.5 Zelllinien	36
PC12-Zellen.....	36
SkBr3-Zellen	37
HepG2-Zellen	37
H460-Zellen	37
4.1.6 DNS-Konstrukte (erstellt durch Vorarbeiten anderer)	37

5 METHODEN..... 39

5.1 Klonierung39

5.2 Beschichtung von Deckgläsern mit Poly-L-Lysin (PLL).....41

5.3 Zellkultur	41
5.3.1 Auftauen und Passagieren	41
5.3.2 Einfrieren der Zellen für die Langzeitlagerung	43
5.3.3 Transfizieren von Zellen	43
5.3.4 Stimulation der Zellen.....	44
5.3.5 Behandlung von PC12-Zellen mit Ionomycin.....	44
5.3.6 Behandlung von PC12- <i>Membrane Sheets</i> mit 54 μ M freiem Calcium	45
5.3.7 Glykokalixabbau an HepG2-Zellen	46
5.3.8 Erstellen von <i>Membrane Sheets</i>	47
5.3.9 Immunanfärbung	47
5.3.10 <i>Wheat germ agglutinin</i> (WGA) - Färbung.....	48
5.4 Mikroskopie	49
5.4.1 Epifluoreszenzmikroskopie	49
5.4.2 Mikroskopie von <i>Membrane Sheets</i>	49
5.4.3 <i>Total internal reflection</i> (TIRF)-Mikroskopie	51
5.4.4 <i>Fluorescence recovery after photobleaching</i> (FRAP)-Analyse	52
6 ERGEBNISSE	55
6.1 Einfluss intrazellulärer und extrazellulärer Interaktionspartner auf die Organisation des humanen Insulinrezeptors	55
6.1.1 Intrazelluläre Bindungspartner des hIRs	55
Vergleich der Mobilität des hIRs in <i>Membrane Sheets</i> und in Membranen lebender Zellen.....	55
Rolle der intrazellulären Domäne des hIRs.....	57
6.1.2 Extrazelluläre Bindungspartner	60
Dynamik des hIRs in der Membran nach Insulin-Stimulation.....	60
Interaktionen mit der Glykokalix	70
Identifikation der mobilitätsbestimmenden Domäne des hIRs	72
Schwierigkeiten bei Mobilitätsanalysen des hIRs.....	77
6.1.3 Machbarkeitsstudie zur Einzelmolekülanalyse von GFP-markierten hIR Molekülen mittels TIRF-Mikroskopie	78
6.2 Einfluss von Ca²⁺ auf die Organisation von SNARE-Proteinen	82
6.2.1 Ca ²⁺ induzierte Veränderung der lateralen Verteilung von SNAP25 und Syntaxin1.....	83

6.2.2 Die Calcium-bedingte Abnahme der Immunanfärbung von SNARE Proteinen ist umkehrbar.....	87
6.2.3 Intrazelluläres Ca^{2+} verändert die Mobilität von Syntaxin-GFP.....	89
6.2.4 Calcium-Behandlung verringert die Fluoreszenz von GFP-markierten SNARE-Proteinen	92
6.2.5 Carbachol und Thapsigargin stimulierte Anstiege der intrazellulären Calcium-Konzentration zeigten bei PC12-Zellen keine Änderung der Membranprotein-Organisation.....	94
7 DISKUSSION	96
7.1 Einfluss intra- und extrazellulärer Bindungspartner auf die Organisation des hIRs in der Plasmamembran	96
7.1.1 Wechselwirkungen mit intrazellulären Faktoren kontrollieren nicht die Mobilität des hIRs in der Plasmamembran	97
7.1.2 Anteile der extrazellulären Domäne des hIRs scheinen eine Bedeutung für die Dynamik des Rezeptors in der Plasmamembran zu haben.....	98
7.1.3 Einzelmolekülanalysen von GFP-markierten hIR-Fusions-konstrukten in der Plasmamembran	100
7.1.4 Schlussfolgerung und Ausblick	102
7.2 Calcium-Ionen verändern über elektrostatische Wechselwirkungen die Verteilung und Organisation von Proteinen in der Plasmamembran	103
7.2.1 Mögliche elektrostatische Effekte zwischen Calcium-Ionen und Membranproteinen	104
7.2.2 Experimentell beobachtete Auswirkungen erhöhter Calcium-Konzentrationen auf die Organisation von Membranproteinen.....	105
7.2.3 Mechanismus der Wirkung von Ca^{2+} auf die Cluster-Bildung.....	107
7.2.4 Biologische Signifikanz der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Calcium-Ionen und Membran-Proteinen	111
7.2.5 Modell zur Erklärung des Einflusses der Calcium-Ionen-Konzentration auf die Formierung von Proteinmikrodomänen in der Plasmamembran	113
7.2.6 Schlussfolgerung.....	116
7.2.7 Ausblick	117
8 LITERATURVERZEICHNIS	118

9 DANKSAGUNG..... 131

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Zellen in einem Korkpräparat	3
Abbildung 2	Funktionen von Membranproteinen	6
Abbildung 3	Membranmodelle von Davson und Robertson	7
Abbildung 4	Das <i>Fluid-Mosaic</i> Modell	9
Abbildung 5	Das Anchored Transmembrane Protein	10
Abbildung 6	Aktinfilamente bilden abgegrenzte Kompartimente entlang der Zellmembran aus	12
Abbildung 7	<i>Lipid Raft</i> -Aufbau.....	15
Abbildung 8	Die Protein Cluster-Theorie	16
Abbildung 9	<i>Total Internal Reflection</i> (TIRF)-Mikroskopie	24
Abbildung 10	Erstellen von <i>Membrane Sheets</i>	28
Abbildung 11	Aufbau des humanen Insulinrezeptors	39
Abbildung 12	Verwendete Konstrukte des hIR	40
Abbildung 13	Vergleichbare Dynamik von Membranproteinen in intakten Zellen und zellfreien Membranpräparationen ..	57
Abbildung 14	Die Deletion der intrazellulären Domänen des hIRs beeinflusst nicht die Diffusionsgeschwindigkeit des Rezeptors in der Plasmamembran	59
Abbildung 15	Bindung von Insulin hat keinen Einfluss auf die Diffusionsfähigkeit des hIRs.....	61
Abbildung 16	Einfluss von Insulin-Stimulation auf die Endozytose des humanen Insulinrezeptors.....	63
Abbildung 17	Heregulinstimulation verringert sowohl die Konzentration von Her3- als auch von Her2-Rezeptorproteinen an der Plasmamembran.....	65
Abbildung 18	Nach Stimulation mit epidermalemem Wachstumsfaktor (EGF) werden weniger EGF-Rezeptoren an der basalen Plasmamembran detektiert.....	67
Abbildung 19	Verwendete hIR-Antikörper zeigen unzuverlässige Spezifität.....	69
Abbildung 20	Die Diffusion des hIRs in der Membran wird nicht durch die Glykokalix beeinflusst.....	71
Abbildung 21	Einfluss einer Region im extrazellulären Anteil auf die Diffusion des hIRs in der Membran.....	73
Abbildung 22	Umfangreichere Deletion führt wiederum zu verlangsamer Diffusion	75
Abbildung 23	Übersicht über $T_{1/2}$ -Werte der analysierten hIR-Konstrukte.....	76

Abbildung 24	Ein Teil der Deletionsvarianten des hIRs werden nicht in die Plasmamembran inkorporiert.....77
Abbildung 25	Einzelmolekülanalyse des hIRs und hIR-Deletionsvarianten81
Abbildung 26	Rückgang der Immunfluoreszenz-Intensität nach Ca^{2+} -Behandlung geht einher mit einer verstärkt geclusterten Organisation von Membranproteinen.....85
Abbildung 27	Veränderung der Immunanfärbung nach Ca^{2+} -Inkubation ist nicht durch Proteaseaktivität bedingt87
Abbildung 28	Ca^{2+} -bedingter Immunfluoreszenzrückgang ist reversibel88
Abbildung 29	Messungen der Mobilität von Proteinen in der Membran zeigen, dass Ca^{2+} -Behandlung den Anteil der immobilen Fraktion und die Diffusion der mobilen Fraktion erhöht 91
Abbildung 30	TIRF-Mikroskopie zur Messung der Ca^{2+} -induzierten Abnahme von Syntaxin-GFP- und GFP-SNAP25-Fluoreszenz in lebenden Zellen93
Abbildung 31	Ca^{2+} -Einstrom durch Ionenkanäle und Ausschüttung von Ca^{2+} aus intrazellulären Reservoirs sind nicht ausreichend für eine Änderung der Membranorganisation95
Abbildung 32	Auswirkung der Anwesenheit von Calcium- Ionen auf die Größe von Proteinclustern in der Plasmamembran - Modellvorschlag.114

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Konzentrationen unterschiedlicher Ionen im zytoplasmatischen und extrazellulären Bereich104
-----------	---

Abkürzungsverzeichnis

BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CCD	<i>charged coupled device</i>
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i> - konfokales Laser-Raster Mikroskop
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPTA	1,3-Diamino-2-propanol-N,N,N',N'-tetraessigsäure
DRM	<i>detergence resistant membrane</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglykol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMEM	<i>Eagle's minimal essential medium</i>
FCS	<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>
FCS	fötales Kälber Serum
FRAP	<i>fluorescence recovery after photo-bleaching</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
hIR	humaner Insulinrezeptor
Hz	Hertz
mEGFP	monomeres <i>enhanced</i> (verbessertes) Grün Fluoreszierendes Protein
mGFP	monomeres Grün Fluoreszierendes Protein
min	Minute
MS	<i>Membrane Sheet</i>
ms	Millisekunde
p. a.	<i>pro analysis</i>
PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
PLL	Poly-L-Lysin
Rec _{Max}	<i>maximal recovery</i> - Maximalwert des zurückkehrenden Fluoreszenzsignals
ROI	<i>region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SNAP25	Synaptosomal-associated protein of 25 kDa
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
Std	Stunde
T _{1/2}	Halbwertszeit
TIRF	<i>total internal reflection fluorescence</i>
TMA-DPH	1-(4-Trimethyl-Ammoniumphenyl)-6-Phenyl-1,3,5-Hexatrien-p- Toluolsulfonat
TMR	Transmembranregion
ÜN	über Nacht
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit

1 Kurzfassung

In den letzten Jahrzehnten wurde bei Untersuchungen an Zellmembranen deutlich, dass viele Membranproteine nicht, wie ursprünglich angenommen, homogen verteilt sind, sondern in Mikrodomänen organisiert vorkommen. Die Mechanismen, die der Formierung dieser Strukturen zugrunde liegen, sind bisher jedoch nur teilweise verstanden. Bestehende Modelle erklären die strukturelle Organisation von Zellmembranen vorwiegend durch Lipid-Lipid- oder Lipid-Protein-Interaktionen. Bisher wurde jedoch kaum analysiert, inwiefern auch andere im Zellsystem vorkommende Bindungspartner die Verteilung von Proteinen in der Plasmamembran beeinflussen können. In der vorliegenden Dissertation wurde deshalb der Einfluss verschiedener extra- und intrazellulärer Interaktionspartner auf die Anordnung von Membranproteinen genauer untersucht. Unter Zuhilfenahme unterschiedlicher Fluoreszenzmikroskopie-Techniken wurden hierfür Versuche sowohl an intakten Zellen, als auch an speziellen Plasmamembran-Präparationen durchgeführt. Im ersten Teil der Arbeit konnte am Beispiel des humanen Insulin-Rezeptors (hIR) nachgewiesen werden, dass weder Interaktionen mit intrazellulären Faktoren, noch die Stimulation des Rezeptors, noch Wechselwirkungen mit der Glykokalix einen Einfluss auf das Diffusionsverhalten des Proteins in der Membran haben. Es wurden jedoch Indizien gefunden, dass Bereiche der extrazellulären Domäne des hIRs für die Mobilität und damit für die laterale Organisation des Rezeptors in der Plasmamembran entscheidend sind. In einem zweiten Projekt wurde die Wechselwirkung zwischen Ca^{2+} und zytoplasmatischen Proteindomänen anhand zweier SNARE-Proteine untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass Calcium-Ionen die Membranorganisation der untersuchten Proteine modulieren. Mit Hilfe verschiedener Analysemethoden konnte ein direkter Zusammenhang zwischen erhöhter Calcium-Ionen-Konzentration und einer verstärkten Aggregation von SNARE-Proteinen in Mikrodomänen nachgewiesen werden.

Es gab hierbei deutliche Hinweise, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Calcium-Ionen und intrazellulären Proteindomänen zu einer Änderung der Anordnung von SNARE-Proteinen in der Membran führen. Der Einfluss einer indirekten Wirkung der Calcium-Ionen auf die Anordnung der untersuchten Proteine über Sekundäreffekte der erhöhten Ionenkonzentration erwies sich indessen als unwahrscheinlich. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte ein Modell entworfen werden, mit dem ein höherer Grad an Cluster-Bildung der untersuchten Membranproteine durch direkte elektrostatische Interaktionen mit Calcium-Ionen erklärt wird. Ein vergleichbarer Mechanismus wurde bisher noch nicht beschrieben und stellt eine Ergänzung zu den bisher gängigen Theorien zur Membranorganisation dar.

2 Einleitung

2.1 Die Zelltheorie

Robert Hooke war es, der 1664 als erster den Begriff Zelle im biologischen Sinne verwendete. Er beschrieb damit die kastenförmigen Strukturen, die er bei der Untersuchung eines Korkpräparats mittels eines einfachen Lichtmikroskops sah (Abbildung 1). Sie erinnerten ihn an kleine Schlafräume (lat. *cellula* = Zelle, kleine Kammer) (Hooke 1664). Die Weiterentwicklung der Mikroskopie ermöglichte das Sichtbarmachen von Zellen und Zellbestandteilen in unterschiedlichsten biologischen Präparationen. Nach Studien an Pflanzen- und Tierzellen erkannten Matthias Schleiden und Theodor Schwann 1838 Ähnlichkeiten zwischen den beiden Zelltypen und stellten eine allgemeine Zelltheorie auf. Diese besagt, dass alles Lebende aus Zellen aufgebaut ist und dass es

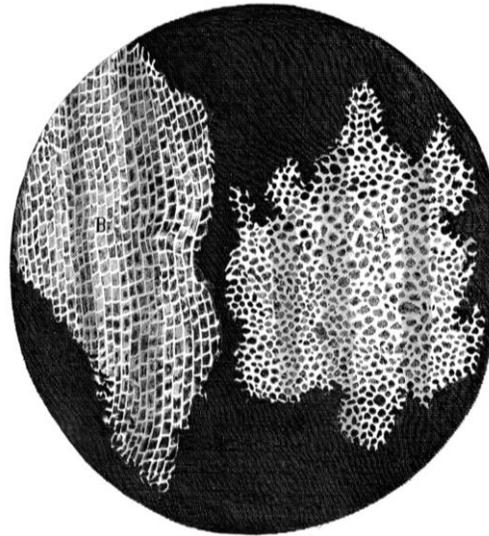


Abbildung 1 Zellen in einem Korkpräparat

Zeichnung der mikroskopischen Struktur eines Korkschnitts und die erste bekannte Beschreibung von Zellen. (Die Abbildung ist entnommen aus Hooke 1664 und wurde abgewandelt)

übereinstimmende Strukturen im Aufbau aller Zellen gibt (Schleiden 1838; Schwann et al. 1847). Rudolf Virchow ergänzte diese Theorie einige Jahre später durch die Erkenntnis, dass jede Zelle aus einer Vorgängierzelle entstanden sein muss (Virchow 1871). Bis heute konnten immer genauere Details über die Bestandteile und die Funktionsweise von Zellen gesammelt werden. Die Grundaussagen der ursprünglichen Zelltheorie über die Zelle als kleinste strukturelle Einheit eines Organismus und Parallelen im Aufbau aller Zellen sind jedoch bis heute gültig.

2.2 Die Zellmembran

Eine Gemeinsamkeit, die man bei allen Zellen finden kann, ist eine Membran, die den Zellinhalt umschließt (Alberts 2008). In mikroskopischen Aufnahmen ist sie als Grenzschicht sichtbar. Nach einer Verletzung der Zelle, die zum Ausfluss des Zytoplasmas führt, verbleibt diese Schicht als gesonderte Struktur (Rajan 2002). Die Zell- oder Plasmamembran ist jedoch mehr als eine reine Barriere zwischen intra- und extrazellulären Bereichen. Sie fungiert selektiv und nimmt direkten Einfluss auf den Eintritt von Substanzen in die Zelle und ebenso auf den Austritt. Prozesse wie die Aufnahme stoffwechselrelevanter Moleküle und die Absonderung von metabolischen Endprodukten, aber auch die Signalweiterleitung in die Zelle oder aus der Zelle heraus, werden über die Plasmamembran reguliert.

2.2.1 Zusammensetzung von Zellmembranen

Die meisten Membranen bestehen zu etwa gleichen Gewichtsanteilen aus Lipiden und Proteinen (Phillips et al. 2009). In absoluten Zahlen kommen - durch die deutlich größere Masse von Proteinen - auf ein Membranprotein etwa 50 Lipidmoleküle (Jacobson et al. 2007). Die Lipide bilden eine Doppelschicht, in welche die Proteine eingelagert oder gebunden sind. Im extrazellulären Teil der Membran weisen einige der Lipide und Proteine zusätzlich gebundene Kohlenhydratketten auf (Ohtsubo und Marth 2006). Die Verhältnismäßigkeiten der jeweiligen Stoffgruppen zueinander können bei spezialisierten Zelltypen stark variieren und an die jeweiligen Zellfunktionen angepasst sein (Dupuy und Engelman 2008).

Lipide der Plasmamembran

Es gibt in Membranen eine hohe Variabilität an Lipiden. Allen gemein ist ihr amphiphiler Charakter - sie weisen sowohl hydrophobe also auch hydrophile Bereiche in ihrer chemischen Struktur auf. Durch die sie umgebenden wässrigen Lösungen bilden sie als energetisch günstige Struktur eine

Lipiddoppelschicht aus, wobei die polaren Bereiche in das wässrige Milieu und die unpolaren Endgruppen in das Innere der Schicht ausgerichtet sind (Bowie 2005). Neben ihrer Funktion als strukturbildende Elemente der Doppelmembran können sie über chemische Interaktion an Signalweiterleitungen beteiligt sein oder als metabolische Vorstufen von Botenstoffen dienen (Fernandis und Wenk 2007).

Neben den am häufigsten vorkommenden Phospholipiden findet man auch Sphingolipide und in tierischen Zellmembranen Sterine. Phospholipide weisen im hydrophilen Bereich eine Phosphatgruppe auf, an die unterschiedliche weitere polare Gruppen gebunden sein können. Sie werden unterschieden in Phosphoglyceride und Sphingomyeline. Letztere werden sowohl zu den Phospho- als auch zur Gruppe der Sphingolipide gezählt und kommen vermehrt in Membranen von Nervenzellen vor. Zu den Sphingolipiden werden außerdem die Glykolipide gezählt. Diese haben zusätzlich Oligosaccharidketten gebunden und sind nur in der nach außen gerichteten Seite der Membran zu finden. Das wichtigste vorkommende Sterin ist Cholesterin, welches fast ausschließlich in tierischen Membranen und kaum in Pflanzen- oder Bakterienmembranen zu finden ist (Kaiser et al. 2011). Membranen mit einem erhöhten Cholesterinanteil zeigen eine verringerte Fluidität (Zhang et al. 2011).

Membranproteine

Man unterscheidet Membranproteine in periphere Proteine, die nur an die Lipidschicht angelagert sind und integrale Proteine, die eine Verankerung in die Lipiddoppelschicht besitzen. Integrale Proteine, die durch die Membran hindurchreichen, also einen intra- und einen extrazellulären Teil aufweisen, bezeichnet man als Transmembranproteine. Die in der Membran vorkommenden Proteine erfüllen verschiedenste Aufgaben. Porenförmige Proteine, die durch die Membran reichen, dienen als Kanäle, durch die auch größere und geladene Teilchen die Membran durchdringen können. Durch spezielle Durchmesser- und Ladungsverhältnisse der Kanäle wirken diese z.

T. hoch selektiv. Stoffe können aber auch aktiv gegen einen Konzentrationsgradienten mit Hilfe von Transporterproteinen unter Energieaufwand durch die Membran befördert werden. Im Rahmen der Zell-Zell-Kommunikation

können Rezeptorproteine Liganden binden, Signale durch die Membran weiterleiten und Signalkaskaden starten. Ankerproteine stabilisieren die Struktur

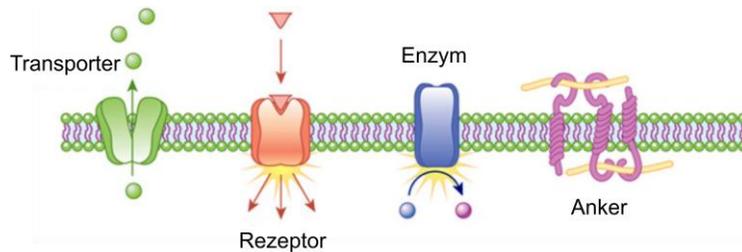


Abbildung 2 Funktionen von Membranproteinen

Proteine der Plasmamembran ermöglichen Stofftransport und Signalweiterleitung durch die Membran, können aber auch als katalytische Einheit oder Verankerungspunkt dienen. (Veränderte Abbildung aus O'Connor und Adams 2010)

der Membran durch Verknüpfungen mit dem Zytoskelett der Zelle, können aber auch Verbindungen zu benachbarten Zellen ausbilden (Tan et al. 2008). Andere membranständige Proteine wirken als Enzyme und katalysieren Stoffwechselprozesse (McDermott 2009) (Abbildung 2).

Membrangebundene Kohlenhydrate

In der äußeren Schicht der Membran tierischer Zellen weisen über 90 % der Proteine und etwa 5 % der Lipide gebundene Oligosaccharidketten auf und werden als Glykoproteine bzw. Glykolipide bezeichnet (Alberts 2008; Reitsma et al. 2007; Buselmaier 2009). Die verzweigten Kohlenhydratketten bilden als sogenannte Glykokalix die äußerste Schicht der Zelle und bieten einen gewissen Schutz gegen mechanische und chemische Einflüsse. Die Glykokalix dient außerdem als Identitätsmarker und ermöglicht sowohl die immunologische Identifikation als Teil eines Organismus, als auch das Erkennen krankhaft veränderter Zellen (Varki und Varki 2007). Auch der Zusammenschluss von Zellen zu Gewebeverbänden beruht unter anderem auf Interaktionen der ähnlich aufgebauten Glykokalixbestandteile (Horn et al. 2009).

2.2.2 Theorien zur Membranorganisation

Die Forschung an Zelloberflächen hat eine Vielzahl von Modellen entwickelt, die der heutigen Vorstellung von Membranorganisation zu Grunde liegen. Ihre Weiterentwicklung ermöglichte ein immer präziseres Verständnis der Phänomene, die im Rahmen von Versuchen an der Plasmamembran entdeckt wurden. Insbesondere die Verbesserung der Analysemethoden, vor allem in der der Mikroskopie, führte in den letzten Jahrzehnten zu genaueren Modellen. Die aus diesen Erkenntnissen entwickelten Theorien werfen aber noch immer Fragen auf und können nicht alle Beobachtungen an Membranen erklären.

Historische Modelle

Bereits 1895 kam Charles Overton bei vergleichenden Studien über die osmotischen Eigenschaften von Tier - und Pflanzenzellen zu dem Schluss, dass die Zellhülle aus Lipiden bestehen könnte. Er stellte fest, dass unpolare Stoffe schneller in Zellen eindringen als polare und nahm an, dass lipöse Substanzen die Schicht bilden, die das Zellinnere umschließt (Overton 1895).

Eine erste Theorie über die Anordnung der Lipidmoleküle formulierten Gorter und Grendel 1925. Sie extrahierten Lipide aus einer definierten Anzahl roter Blutzellen, brachten diese als monomolekulare Schicht auf eine Wasseroberfläche auf und maß deren Dimensionen. Die auf mikroskopischen Beobachtungen beruhenden

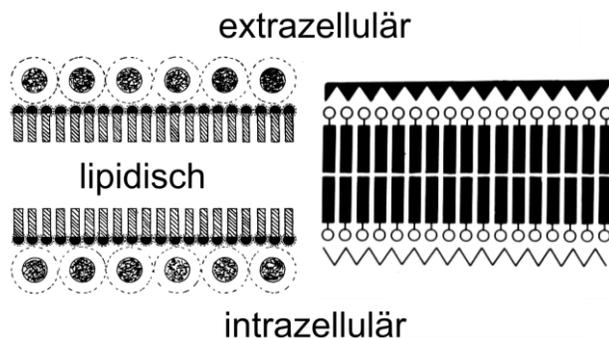


Abbildung 3 Membranmodelle von Davson und Robertson

Das links dargestellte Modell von Davson beschreibt die Membran als Lipiddoppelschicht mit außen angelagerten Proteinen. Robertson (rechts) erweiterte dieses Modell durch die Annahme, dass sich intra- und extrazelluläre Proteinschicht chemisch unterscheiden. Die Abbildungen wurden Danielli und Davson 1935 und Robertson 1959 entnommen und abgewandelt.

Berechnungen hätten eine nur halb so große Oberfläche für die einzelne Zelle erwarten lassen. Der scheinbare Widerspruch ließ sich damit erklären, dass die untersuchten Zellen nicht von einer einfachen, sondern von einer doppelten Schicht aus Lipiden umhüllt waren (Gorter und Grendel 1925). Spätere Untersuchungen zeigten, dass die Forscher in ihren Studien die Lipide nur unvollständig extrahiert hatten, andererseits aber auch die Größe der Erythrozyten unterschätzt worden war, wodurch letztendlich die richtigen Schlussfolgerungen möglich wurden (Sadava 1993). Ende der 1930er Jahre wurde nach Röntgenstudien an Membranen die rechtwinklige Anordnung der Lipidmoleküle zur Membran erkannt und die bis heute bestehende Ansicht postuliert, dass die Lipidmoleküle mit hydrophilen Kopfgruppen nach außen und hydrophoben Fettsäureketten nach innen in der Membran orientiert sind (Schmitt et al. 1938; Robertson 1981). Das Modell von Davson und Danielli zog 1935 erstmals auch den Proteinanteil der Membran mit in Betracht und beschrieb die Lipiddoppelschicht als von Proteinen umlagert. Es wurde vermutet, dass die Interaktion zwischen Lipiden und Proteinen auf reiner Adsorption beruht (Danielli und Davson 1935; Davson und Hugh 1943). Mit der aufkommenden Elektronenmikroskopie in den 1950ern wurde das Modell von Robertson erweitert. Er zeigte, dass es Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der inneren und äußeren Membranseite gibt (Abbildung 3) (Robertson 1959, 1981).

Membranmodelle der letzten Jahrzehnte

Das *Fluid-Mosaic* Modell

Anfang der 1970er Jahre wurden durch die Weiterentwicklung der Elektronenmikroskopie und durch eine Reihe von zentralen Experimenten Erkenntnisse über Plasmamembranen gewonnen, die nur schwer mit den Modellen zu erklären waren, die von Davson, Danielli und Robertson postuliert worden waren. Genauere Messungen ergaben eine asymmetrische Verteilung der Proteine in der Membran und uneinheitliche Membrandicken. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gefrierbruch-Präparationen

zeigten eine große Zahl intramembraner Partikel, die als Proteine identifiziert werden konnten (Robertson 1981). Frye und Edidin konnten 1970 außerdem zeigen, dass es nach der Fusion zweier Zellen zu einer Durchmischung der Membranproteine kommt und hierdurch die fluiden Eigenschaften der Plasmamembran nachweisen (Frye und Edidin 1970). Basierend auf den neuen Erkenntnissen und den Widersprüchen zu bestehenden Vorstellungen über den Aufbau der Membran, veröffentlichten Singer und Nicolson 1972 das *Fluid-Mosaic* Modell. Auch sie gingen in ihren Annahmen von einer Lipiddoppelschicht als Grundstruktur aus, die jedoch nicht von Proteinen umlagert ist, sondern sie postulierten Membranproteine, die bis in die Lipidschicht hinein- und als Transmembranproteine auch hindurch reichen. Sie postulierten zusätzlich, dass sich die Proteine frei in lateraler Bewegung entlang der Membran bewegen können und dass auch Rotation in der Ebene der Membran möglich ist (Abbildung 4). Das *Fluid-Mosaic* Modell konnte somit die Ergebnisse der Studien von Frye und Edidin und die beobachteten in der Membran gelösten Proteine erklären. Darüber hinaus passten auch die gemessene variierende Membrandicke und die heterogene Proteinverteilung entlang der Membran zu den Thesen der aufgestellten Theorie. Auch weitere Phänomene, die zu dieser Zeit bereits bekannt waren, aber nicht zu den gängigen Modellen passten, konnten nun erklärt werden. Das Modell lieferte zum Beispiel eine Grundlage für die Variabilität des Lipid-Protein-Verhältnisses in Membranen unterschiedlicher Zellen und eine bessere Erklärung für die Existenz von Membranproteinen, die sowohl hydrophobe als auch hydrophile Eigenschaften aufweisen. Zusätzlich untermauert wurden die

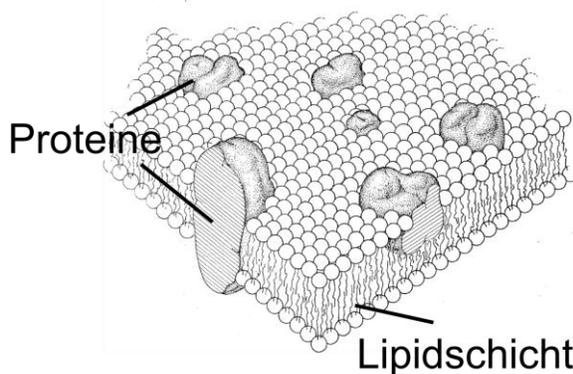


Abbildung 4 Das *Fluid-Mosaic* Modell

Der Aufbau der Plasmamembran wird in diesem Modell als Lipiddoppelschicht mit integrierten lateral frei beweglichen Proteinen beschrieben. Die aus Singer und Nicolson 1972 entnommene Abbildung wurde bearbeitet.

Thesen durch theoretische physikalische Studien (Saffman und Delbruck 1975) und deren spätere Überprüfung in liposomalen Modellen (Peters und Cherry 1982). In den darauffolgenden Jahrzehnten wurde das Modell verfeinert und diente zugleich als Grundlage für sich immer weiter differenzierende Theorien über die Membranorganisation.

Das Picket Fence-Modell

Anfang der 1980er Jahre zeigten einige Experimente, dass die Beschreibung der Membranorganisation von Singer und Nicolson unvollständig war. Es gab Hinweise, dass Faktoren existieren, welche die Beweglichkeit von Membranproteinen einschränken. Dies stand im Widerspruch zur Hypothese des *Fluid-Mosaic* Modells, dass Proteine in der Membran frei diffundieren können. Sheetz konnte bei Studien über die Diffusion von Membranproteinen an Erythrozytenmembranen zeigen, dass das Zytoskelett einen Einfluss auf die Beweglichkeit der Proteine hat (Sheetz et al. 1980). Zellen, die Defekte im Aufbau des Zytoskeletts aufwiesen, zeigten eine verstärkte Beweglichkeit

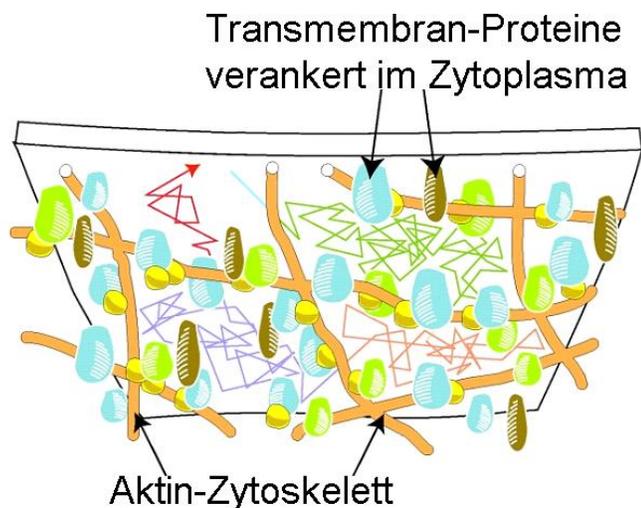


Abbildung 5 Das Anchored Transmembrane Protein Picket-Modell

Das Aktin-Zytoskelett und angelagerte Transmembranproteine bilden - nach diesem Modell - entlang der Zellmembran Hindernisse und schränken freie Diffusion für Proteine und Lipide auf kleine Areale ein. Die Abbildung wurde Fujiwara et al. 2002 entnommen und verändert.

der untersuchten Proteine. Auch Vergleiche mit der Diffusion von Proteinen in artifiziellen Membransystemen ergaben eine stärkere Beweglichkeit als bei Messungen in Plasmamembranen (Sheetz 1983). Sheetz entwickelte daraufhin das *Picket Fence*-Modell. Dies besagt, dass das Zytoskelett der Zelle abgegrenzte Komparti-

mente entlang der Plasmamembran bildet. Diese wirken auf die intrazelluläre Region von Transmembranproteinen wie Einzäunungen (engl. *picket fence* = Lattenzaun), die die Mobilität der Proteine herabsetzen. Studien der folgenden Jahre unterstützten diese Theorie und arbeiteten sie genauer aus. Zunächst konnte Tsuji zeigen, dass nach Abbau des Zytoskeletts die Diffusion von Proteinen zunimmt (Tsuji und Ohnishi 1986). Ebenfalls ließ sich nachweisen, dass sich das Zytoskelett stärker auf laterale Diffusion als auf Rotation von Membranproteinen auswirkt (Tsuji et al. 1988). Später wurde - nach Analyse der Diffusionswege einzelner Membranproteine - auf die ungefähre Größe der abgegrenzten Kompartimente geschlossen. Die eingeschränkte Diffusion schien in Arealen mit einem Durchmesser von 0,2 - 0,3 μm^2 stattzufinden (Sako und Kusumi 1995). Fujiwara konnte 2002 nach Einzelmoleküluntersuchungen auch eine Restriktion der Diffusion von Membranlipiden zeigen. Die hier gemessenen Kompartimente, in denen sich die Lipide transient aufhielten, entsprachen in ihren Ausmaßen den von Sako beobachteten Arealen eingeschränkter Diffusion von Membranproteinen. Eine zusätzliche Erweiterung des Modells von Sheetz lieferte das *Anchored Transmembrane Protein Picket*-Modell (Abbildung 5). Dies geht davon aus, dass verschiedene Transmembranproteine durch Verankerungen am Aktin-Zytoskelett wie eine Einzäunung für andere Membranelemente wirken. Durch die auftretenden sterischen Hinderungen sollen danach sowohl die Diffusion von Proteinen als auch die von Lipiden eingeschränkt werden (Fujiwara et al. 2002). Passend zu dieser Theorie wurde einige Jahre später durch morphologische Studien festgestellt, dass die Zwischenräume, die durch das Netzwerk des zellulären Zytoskeletts ausgebildet werden, Dimensionen aufweisen, die den Kompartimenten vergleichbar sind, welche Sako und Fujiwara als abgegrenzte Areale innerhalb von Membranen beschrieben hatten (Morone et al. 2006) (Abbildung 6).

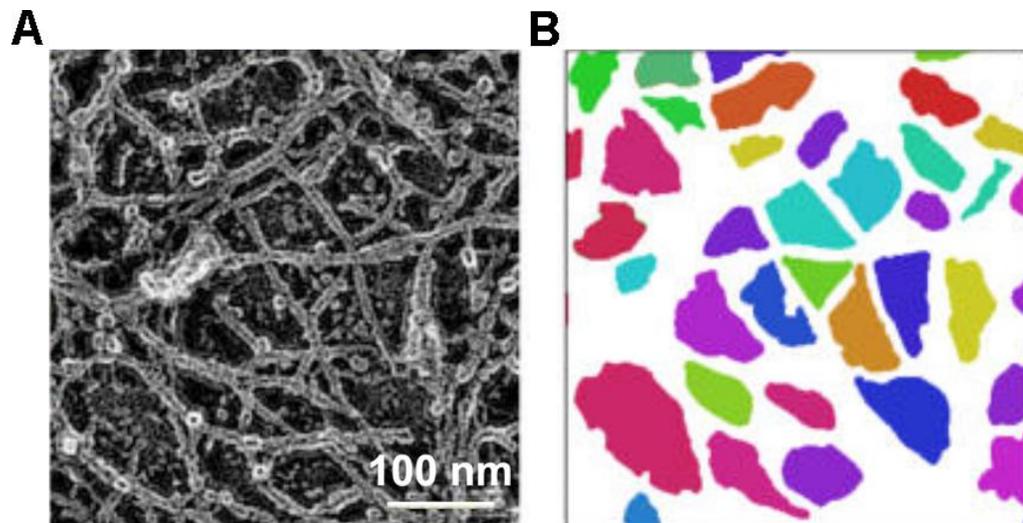


Abbildung 6 Aktinfilamente bilden abgegrenzte Kompartimente entlang der Zellmembran aus

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Aktin-Netzwerks auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran von Ratten-Keratinocyten. (B) Farbige dargestellte Kompartimente, die vom Aktin-Netzwerk umschlossen werden. Die ermittelten Kompartimente sind vergleichbar mit Diffusionsarealen von Membranlipiden und -proteinen, die in früheren Studien bestimmt wurden. Die Abbildungen stammen aus Morone et al. 2006 und wurden abgewandelt.

Die *Lipid Raft*-Hypothese

Parallel zum *Picket Fence*-Modell wurden Theorien entwickelt, die nicht das Zytoskelett und Membranproteine, sondern Lipidmikrodomänen als die entscheidenden Faktoren der Membranorganisation postulieren. In der aus diesen Überlegungen hervorgegangenen *Lipid Raft*-Hypothese wird davon ausgegangen, dass sich Sphingolipide zusammen mit Cholesterin in der äußeren Schicht der Plasmamembran zu Lipidphasen oder Lipid-„Flößen“ - den *Lipid Rafts* (engl. *raft* = Floß) - zusammenfinden. Durch die physikalischen Eigenschaften dieser Bereiche wird die Anreicherung bestimmter Membranproteine begünstigt. Es wurde vermutet, dass *Lipid Rafts* die Membran in Kompartimente unterteilen, in denen Membranproteine anhand der Ladungsverhältnisse der Anker- bzw. Transmembranregionen sortiert werden (Lingwood und Simons 2010). Es existieren auch einige Studien, die auf eine funktionelle Relevanz von *Lipid Rafts* bei der

Signalweiterleitung verschiedener Immunzellen hinweisen (Baird et al. 1999; Kab et al. 1998; Gupta und DeFranco 2007).

Ähnlich wie das *Picket Fence*-Modell hat sich die *Lipid Raft*-Hypothese über mehrere Jahrzehnte hinweg entwickelt. Bei spektroskopischen Studien an Vesikeln aus Membranen des endoplasmatischen Retikulums wurde Anfang der 1970er Jahre erkannt, dass die Membranlipide eine heterogene Verteilung aufwiesen (Stier und Sackmann 1973). Beruhend auf diesen Erkenntnissen wurde das Konzept von Lipiddomänen in Membranen formuliert (Karnovsky et al. 1982). Später wurde gezeigt, dass es sowohl in artifiziellen Systemen (Estep et al. 1979), als auch an Zellmembranen (Goodsaid-Zalduondo et al. 1982) zu einer Assoziation von Sphingolipiden und Cholesterin kommt. Die eigentliche *Lipid Raft*-Hypothese wurde 1988 von van Meer und Simons formuliert und beschrieb ursprünglich den Transport von Lipiden und Proteinen vom Golgi zur Membran (Simons und van Meer 1988). Simons und Ikonen übertrugen das Konzept später auf die Anordnung in der apikalen Membranschicht (Simons und Ikonen 1997). Sie analysierten die Membranbestandteile mittels detergensbasierter Lyse und stellten fest, dass bestimmte Bereiche der Membran nicht durch die Detergenzien angegriffen wurden. Diese von ihnen *detergent resistant membranes* (DRMs) genannten Bestandteile zeigten bei Zentrifugation des Lysats eine geringe Dichte, was auf ihren hohen Lipidanteil zurückgeführt wurde. In einem weiteren Schritt wurde analysiert, welche Proteine mit diesen Lipidfraktionen assoziierten. Die in DRMs identifizierten Proteine wurden in späteren Studien als *Lipid Raft*-Marker eingesetzt um die Zusammensetzung der Lipiddomänen genauer zu beschreiben (Mairhofer 2002; Foster 2003). Bei Versuchen an artifiziellen Membranen konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von Cholesterin geordnete Strukturen entstanden. Diese wurden als weiterer Beweis für die Existenz der *Lipid Rafts* angesehen (Feigenson und Buboltz 2001). Insbesondere die von Simons und Ikonen identifizierten DRMs führten jedoch zu einer Debatte über die *Lipid Raft*-Hypothese. Es gab Hinweise, dass durch die Verwendung

von Detergenzien nicht die ursprüngliche Situation in der intakten Zellmembran widergespiegelt wird und dass die Ergebnisse Artefakte der Behandlung darstellen könnten (Edidin 2001; Zurzolo et al. 2003). Auch die Verwendung von artifiziellen Membransystemen für den Nachweis der Theorie machte diese angreifbar, da es fraglich ist, inwieweit mit dieser Methode die Komplexität der Interaktionen an natürlichen Membranen imitiert werden kann (Munro 2003; Simons und Vaz 2004). Die wissenschaftliche Diskussion wurde erschwert durch uneinheitliche Ansichten über die genauen Charakteristika, die *Lipid Rafts* definieren. Deshalb wurde 2006 auf dem „*Keystone Symposium of Lipid Rafts and Cell Function*“ festgelegt, welche Eigenschaften Membrandomänen als *Lipid Rafts* kennzeichnen (Pike 2006). Sie wurden definiert als kleine (10 - 200 nm), heterogene, sterin- und sphingolipidreiche Domänen, die eine hohe Dynamik aufweisen und Kompartimente für zelluläre Prozesse bilden (Abbildung 7). Außerdem können sich *Raft*-Strukturen manchmal über Protein-Protein-Interaktionen zu größeren Einheiten zusammenschließen. Die umstrittenen DRMs wurden bewusst nicht als Teil der Charakterisierung aufgenommen. Um die Arbeit mit DRMs zu vermeiden und um die sehr kleinen Strukturen analysieren zu können, basieren moderne Studien zu *Lipid Rafts* heute häufig auf hochauflösender Mikroskopie. Diese ermöglicht es, unmittelbar an Plasmamembranen zu arbeiten und Objekte auch unterhalb der Auflösungsgrenze klassischer Lichtmikroskopie genau zu lokalisieren (Eggeling et al. 2008; van Zanten et al. 2010; Zhong et al. 2009). Aufgrund der Schwierigkeiten, einen überzeugenden Nachweis zu führen, wird die Existenz von *Lipid Rafts* weiterhin kontrovers diskutiert.

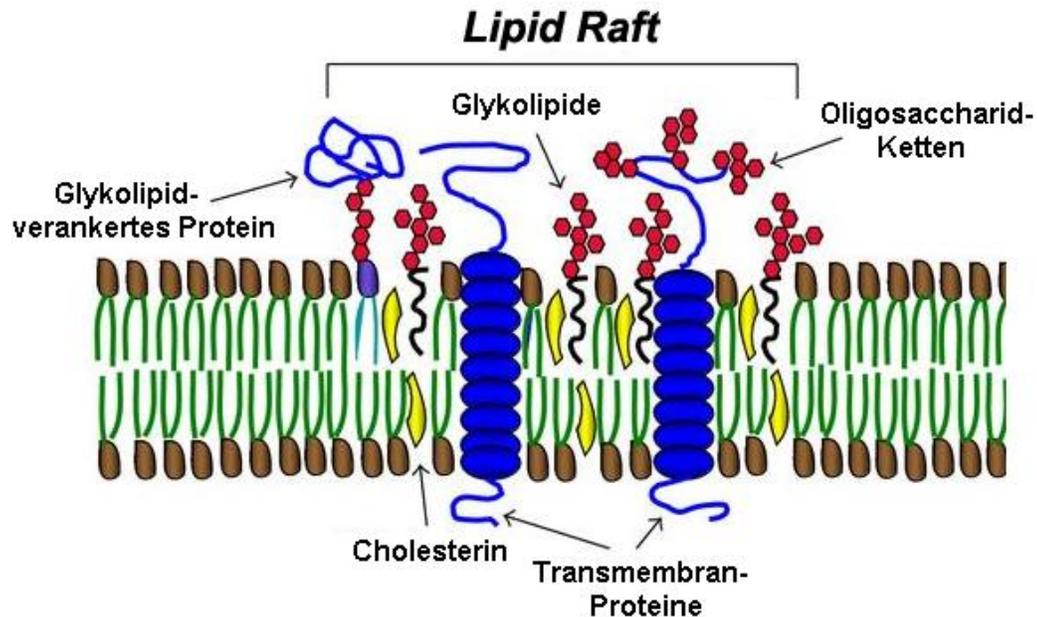


Abbildung 7 Lipid Raft-Aufbau

Nach aktuellen Vorstellungen sind Lipid Rafts Mikrodomänen in der Plasmamembran, die funktionelle Einheiten bilden und verstärkt Cholesterin und Glykolipide, aber auch verschiedene glykosylierte Proteine aufweisen. Die Darstellung wurde Malchiodi-Albedi et al. 2011 entnommen und verändert.

Protein Island-Modell

Einen alternativen Erklärungsansatz für die beschriebenen Areale eingeschränkter Diffusion von Proteinen (Sako und Kusumi 1995) und Lipiden (Fujiwara et al. 2002) in der Membran, liefert das *Protein Island-Modell*. Dieses wurde 2006 in einer Arbeit von Lillemeier postuliert (Lillemeier et al. 2006). In dieser Studie wurde die Aggregation von Proteinen in separaten Lipidphasen in Plasmamembranen nachgewiesen. Anhand der Daten wurde gefolgert, dass sowohl das Zytoskelett, als auch Lipid-Lipid-Interaktion als strukturgebende Elemente für Membrankompartimente entscheidend sind. Die Annahmen der Studie werden teilweise auch durch eine - rein auf statistischen Simulationen beruhende - Veröffentlichung unterstützt, die folgert, dass die Diffusion von Partikeln in einer Zellmembran wahrscheinlich sowohl durch fest in der Membran verankerte Hindernisse, als auch durch *Lipid Rafts* beeinflusst wird (Nicolau et al. 2007). Bisher gibt

es aber noch keine weiterführenden Untersuchungen, welche die Thesen des *Protein Island*-Modells zusätzlich stützen würden.

Protein Cluster-Theorie

Viele der an Plasmamembranen beobachteten Phänomene können mittels der oben beschriebenen Modelle erklärt werden. Es gibt jedoch Studien, die darauf hinweisen, dass die bisherigen Theorien noch unvollständig sind.

Wenn man davon ausgeht, dass hydrophobe Lipid-Protein-Interaktionen zum

Einordnen von Membranproteinen in Lipid-domänen der Plasmamembran führen, wie es die *Lipid Raft*-Hypothese vorschlägt, sollten Proteine mit ähnlichen Transmembran- bzw. Lipidankerbereichen in gleichen Mikrodomänen der Plasmamembran zu finden sein. Legt man die Annahmen des *Picket Fence*-Modells zu Grunde, müsste eine Sortierung der Proteine an

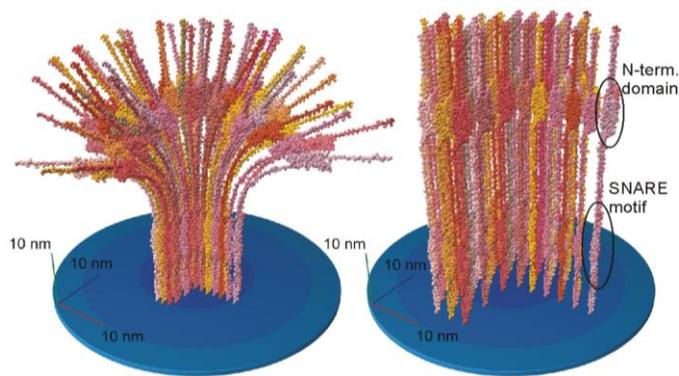


Abbildung 8 Die Protein Cluster-Theorie

Die Abbildung zeigt zwei mögliche Varianten der räumlichen Anordnung eines geclusterten SNARE-Proteins in der Membran. Die Entstehung der Proteincluster beruht dem Modell zufolge auf homophilen Protein-Protein-Interaktionen. Die Größe der Cluster wird durch die Tertiärstruktur oder auch durch Ladungsverhältnisse der Einzelproteine eingeschränkt. (entnommen aus Sieber et al. 2007)

Größe und der ausgebildeten Tertiärstruktur orientiert sein, da in diesem Modell von sterischer Hinderung ausgegangen wird, welche die Diffusion der Proteine in der Membran einschränken.

Selbst wenn eine Kombination beider Konzepte zutreffen würde, könnte damit nur eine relativ grobe Unterteilung von Membranproteinen erklärt werden. Proteine mit ähnlichem Aufbau und vergleichbaren Ladungsverhältnissen der membrangebundenen Domänen müssten in

denselben Membrankompartimenten zu finden sein. Dies steht jedoch im Widerspruch zu Beobachtungen, die eine hochspezifische Untergliederung von fast identisch aufgebauten Proteinen in separate Bereiche der Membran zeigen (Uhles et al. 2003; Low et al. 2006; Kai et al. 2006). Studien an Proteinen aus der Gruppe der SNAREs (Soluble-N-ethylmaleimide-sensitive-Factor-Attachment-Protein-Receptor) konnten zeigen, dass diese als geclusterte Ansammlungen in Membranen auftreten. Die Akkumulation der Proteine beruhte hierbei jedoch scheinbar nicht auf Interaktionen mit *Lipid Raft*-Strukturen (Lang et al. 2001). Auch konnten sehr ähnlich aufgebaute Varianten der SNARE-Proteine in voneinander abgegrenzten Regionen der Membran gefunden werden (Sieber et al. 2006). Die Überlegungen der oben beschriebenen Modelle über die Entstehung von Membrankompartimenten konnten die Entstehung der SNARE-Mikrodomänen somit nicht hinreichend erklären. Im Rahmen der Untersuchungen konnte als ausschlaggebender Faktor für die Clusterformierung eine einzelne Proteindomäne der untersuchten SNAREs identifiziert werden (Sieber et al. 2006). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem von einer Selbstorganisation der Proteine in dicht gepackte Proteinansammlungen ausgegangen wird (Sieber et al. 2007). Die Ausmaße der Cluster werden durch einen Gleichgewichtszustand zwischen anziehenden und abstoßenden Protein-Protein-Interaktionen bestimmt. Das Anwachsen der Proteincluster über homophile Interaktion bestimmter Proteindomänen wird begrenzt durch zunehmende sterische oder ladungsbedingte Hinderungen, die ein Anlagern von weiteren Proteinen erschweren (Abbildung 8) (Sieber et al. 2007). Inzwischen konnten geclusterte SNARE Proteine wiederholt auch in anderen Studien nachgewiesen und untersucht werden (Knowles et al. 2010; Dun et al. 2010; López-Font et al. 2010; Rickman et al. 2010). Neben den als sehr wichtig für die Clusterbildung beschriebenen Protein-Protein Interaktionen konnte aber auch gezeigt werden, dass Membranlipide einen Einfluss auf die Formierung der Proteinaggregate haben. Studien zeigten einerseits eine

Cholesterinabhängigkeit untersuchter Proteincluster (Lang et al. 2001), die Anwesenheit anderer Membranlipide kann sich dagegen störend auf die Ausbildung von Clustern auswirken (Murray und Tamm 2009).

Die Protein-Cluster-Theorie steht nicht im grundsätzlichen Widerspruch zu den zuvor beschriebenen Modellen, sie könnte aber einen zusätzlichen, noch differenzierteren Mechanismus der Organisation von Membranproteinen darstellen.

2.3 Analysemethoden zur Untersuchung der Organisation und der Funktionalität von Membranproteinen

Trotz jahrzehntelanger Forschung an Membranen gibt es weiterhin andauernde Diskussionen über deren grundlegenden Aufbau und Eigenschaften. Eine Erklärung für diese Kontroverse könnte neben der unterschiedlichen Interpretation von Studienergebnissen auch die Wahl jeweiliger Analysemethoden sein. Da jede Art der Untersuchung einen mehr oder weniger starken Einfluss auf die untersuchten Objekte hat, muss der Anteil der methodisch bedingten Artefakte hinsichtlich seiner Auswirkungen auf die erzielten Ergebnisse mit in die Überlegungen einbezogen werden. Da dies nicht immer möglich oder offensichtlich ist, kann es zu Diskrepanzen kommen, wenn das gleiche Studienobjekt mit unterschiedlichen methodischen Ansätzen untersucht wird. Viele der Grundlagen der zuvor beschriebenen Modelle zum Aufbau von Membranen beruhen auf der Analyse von biochemisch aufgereinigten Membranbestandteilen und den mikroskopischen Beobachtungen von Strukturen direkt an der Zellmembran. In vielen Studien zu Membranen wird außerdem mit Modellsystemen gearbeitet, die artifiziell die Bedingungen in der Zelle nachbilden. Solche Modelle helfen, Thesen unter vereinfachten Bedingungen zu testen oder zu überprüfen (Chan und Boxer 2007). Ein Übertragen dieser Erkenntnisse auf die deutlich komplexere Situation, wie sie in der natürlichen Zellmembran vorgefunden wird, ist jedoch nur bedingt möglich (Simons und Vaz 2004).

Um zuverlässige Aussagen über ein untersuchtes System treffen zu können, muss man sich der Vor- und Nachteile, sowie der Grenzen eingesetzter Methoden bewusst sein und eine wissenschaftlich begründbare Wahl treffen. Im Folgenden werden häufig verwendete Verfahren für die Untersuchung von Membranen und Membranbestandteilen vorgestellt und diskutiert.

2.3.1 Biochemische Aufreinigung und Analyse von Membranamikrodomänen

Wie in den Abschnitten zuvor beschrieben, haben verschiedene Studien gezeigt, dass viele Bestandteile der Plasmamembran nicht uniform angeordnet sind, sondern ein heterogenes Verteilungsmuster aufweisen und dass die Membran in unterschiedliche Kompartimente und Mikrodomänen aufgeteilt ist. Diese Erkenntnisse beruhen auch auf biochemischen Untersuchungen von Plasmamembranen, bei denen Unterschiede in der Zusammensetzung verschiedener Membranareale nachgewiesen wurden. Um die Organisation von Membranbestandteilen und deren Funktion analysieren zu können, wird in vielen klassischen biochemischen Verfahren in einem ersten Schritt die Membran aufgebrochen. Hierfür werden häufig Detergenzien eingesetzt, die sich durch ihre chemischen Eigenschaften in die Lipidschicht der Membran einlagern und deren Struktur schwächen können. Andere Möglichkeiten sind zum Beispiel das Zerkleinern der Membranen in Homogenisatoren und der Einsatz von Ultraschall (Smart et al. 1995) oder die Lyse über Stickstoff-Kavitation (Harder und Kuhn 2000). Die durch die Behandlung entstehenden Membranfragmente können in Folgeschritten aufgereinigt und genauer charakterisiert werden. Mit Hilfe dieser Fragmente können einige grundlegende Eigenschaften von Membranen - wie beispielsweise der Gesamtanteil, sowie die Gewichtung einzelner Protein- oder Lipidvarianten - relativ problemlos bestimmt werden. Verlässliche Rückschlüsse auf den ursprünglichen strukturellen Aufbau der intakten Zellmembran sind dagegen deutlich schwieriger zu ermitteln. Methodisch können hierfür zwei Herangehensweisen unterschieden werden.

Einerseits können Membranfragmente anhand der Eigenschaften ihrer Lipide unterschieden und aufgetrennt werden, die zweite Möglichkeit ist die Isolierung von Segmenten basierend auf gezielter Detektion enthaltender Membranproteine. Die Grundlagen der bereits erwähnten *Lipid Raft*-Hypothese (siehe Abschnitt 2.2.2) beruhen zum Beispiel auf Studien, bei denen durch Detergenzlyse gewonnene Membranfragmente mittels einer Dichtezentrifugation aufgetrennt wurden. Hierbei konnten Segmente der Membran mit hoher Lipidkonzentration über ihre geringe Dichte identifiziert, isoliert und genauer untersucht werden. Neben den enthaltenen Lipidvarianten konnten auch verschiedene Membranproteine bestimmt werden, die Teil der isolierten Fraktionen waren. Es wurde geschlossen, dass die identifizierten Lipide und Proteine auch in der intakten Zellmembran als strukturelle Einheiten anzutreffen sind (Quinn 2010). In späteren Untersuchungen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Zusammensetzung einiger identifizierter Lipid-Domänen nicht in Membranen lebender Zellen anzutreffen sind und Artefakte der verwendeten Methodik darstellten (Radeva und Sharom 2004; Morris et al. 2011).

Die Identifikation verschiedener Bestandteile einer Membran-Mikrodomäne kann auch über Immunoaffinitäts-Analysen von Membranproteinen erreicht werden. Zu diesem Zweck kann als etablierte biochemische Methode eine Co-Immunopräzipitation angewendet werden. Hierfür werden spezifische Antikörper gegen bestimmte Membranproteine mit solubilisierten Membranen inkubiert. Danach erfolgt eine Aufreinigung anhand der gebundenen Antikörper, wodurch die Zielproteine von anderen Membranbestandteilen separiert werden. Bei richtiger Handhabung können hierbei Komplexe isoliert werden, die - neben den direkt an den Antikörper gebundenen Proteinen - auch Membranelemente aufweisen, welche mit den isolierten Zielproteinen interagieren. Sollte die Membran im Vorfeld des Versuchs nicht zu stark fragmentiert worden sein, können auch Bestandteile nachweisbar sein, die sich in der ursprünglichen Zellmembran in unmittelbarer Nähe der aufgereinigten Proteine befunden hatten. Durch die Analyse dieser

potentiellen Interaktionspartner können Rückschlüsse auf die Anordnung von Bestandteilen in der Membran intakter Zellen gezogen werden (Zech et al. 2009; Morris et al. 2011). Eine Limitation dieser Technik besteht in der Schwierigkeit, den richtigen Grad der Solubilisierung der Membranen zu erreichen. Ein unvollständiges Fragmentieren der Membran würde hierbei zum fälschlichen Nachweis von Bindungspartnern führen, die sich in der ursprünglichen Membranstruktur lediglich im weiteren Umfeld oder in benachbarten Mikrodomänen befunden hatten. Wenn die Solubilisierung jedoch zu stark ist, kann es im Verlauf der Analyse zu artifiziellen Bindungen der - gänzlich aus dem Membranzusammenhang gelösten - Proteine kommen. Auf diese Weise identifizierte Interaktionen der untersuchten Membranproteine können deshalb auf Artefakten der Behandlung beruhen (Markham et al. 2007).

In zahlreichen Studien wird auch versucht, Membranbestandteile oder ganze Domänen biochemisch aufzureinigen, um die Funktionalität der Proteine zu analysieren. Die Ergebnisse solcher Untersuchungen dienen als Grundlage, um komplexe Wirkungsmechanismen an intakten Zellmembranen besser nachvollziehen zu können (Nimigean 2006). Wie zuvor für die strukturelle Analyse von isolierten Membranfragmenten erläutert, können auch bei funktionellen Untersuchungen dieser Strukturen Probleme auftreten, die Rückschlüsse auf die natürliche Situation in den Membranen lebender Zellen erschweren. Bedingt durch die Verwendung von Detergenzien für die Isolation von Membranelementen kann es beispielsweise zu Veränderungen in der Tertiärstruktur untersuchter Proteine kommen. Auch geringe Änderungen im pH-Wert oder in den osmotischen Verhältnissen können zu einer Denaturierung von Proteinen führen. Wenn hierbei funktionelle Gruppen betroffen sind, können die Ergebnisse nachfolgender Studien bezüglich der Identifikation von Bindungspartnern verfälscht werden. Auch das grundsätzliche Herauslösen der Proteine aus der Zellmembran kann kritisch für untersuchte Eigenschaften sein. Die Beweglichkeit und räumliche Ausrichtung der Proteine in der Plasmamembran ist auf laterale Diffusion und

Rotation um die eigene Achse beschränkt (Yeagle 2005). Das Fehlen dieser Einschränkung nach vollständiger Solubilisierung ermöglicht die Ausrichtung von möglichen Bindungspartnern zueinander, wie sie in der Membran nicht auftreten würde. Hierdurch können Interaktionen identifiziert werden, die in der natürlichen Situation nicht vorkommen. Auch könnten Wechselwirkungen unerkannt bleiben, die nur unter den natürlichen Bedingungen möglich sind. Die Ergebnisse solcher Studien können unter Umständen gute Hinweise auf mögliche Funktionen von Membranbestandteilen geben, müssen aber durch weitere Untersuchungen an der intakten Zelle oder der nativen Plasmamembran verifiziert werden.

2.3.2 Mikroskopie von Membranproteinen

Durch mikroskopische Analysen - unmittelbar an der Membran - können einzelne Elemente der Plasmamembran in ihrem natürlichen Umfeld beobachtet werden. Die Studien lassen - im Gegensatz zu rein biochemischen Untersuchungen - direktere Rückschlüsse auf die Situation zu, wie sie in der lebenden Zelle herrscht. Da die meisten Membrankomponenten aber nur schwache Kontrastunterschiede aufweisen, müssen für fast alle mikroskopischen Methoden kontrastverstärkende Markermoleküle eingesetzt werden. Membranproteine können beispielsweise indirekt über Antikörperfärbungen nachgewiesen werden oder mittels Überexpression einer Variante des Proteins, die ein detektierbares Markerprotein aufweist.

Elektronenmikroskopie

Die starke Vergrößerung und sehr gute Auflösung elektronenmikroskopischer Aufnahmen wird bisher durch kein anderes bildgebendes Verfahren übertroffen. Wie bereits oben beschrieben, wurden entscheidende Grundelemente von Plasmamembranen erstmals durch elektronenmikroskopische Studien sichtbar gemacht. Hierzu zählen auch die Entdeckung der heterogenen Anordnung von Membranproteinen und der

Beweis für die Existenz von Transmembranproteinen. Da die klassische Technik jedoch Hochvakuum-Bedingungen voraussetzt, müssen Objekte vor der Betrachtung dehydriert werden. Um einen detektierbaren Kontrast für die bildgebenden Elektronen zu erzeugen, werden außerdem spezielle Beschichtungen auf die Proben aufgebracht. Somit ist nur die Analyse von nicht-lebenden Präparaten möglich (Hayat 2000). Die intensive Vorbehandlung der Proben macht es darüber hinaus schwer, die Entstehung von Artefakten auszuschließen (Henderson et al. 2007). Einige spezielle Abwandlungen der Elektronenmikroskopie ermöglichen auch das Arbeiten unter normalen Druckverhältnissen. Die Analyse von Details der Membran lebender Zellen ist mit diesen Techniken jedoch nur in sehr speziellen Fällen möglich (Kirk et al. 2009).

Fluoreszenzmikroskopie

Neben der herkömmlichen Epifluoreszenzmikroskopie bieten insbesondere *total internal reflection* (TIRF) und konfokale Mikroskopie gute Voraussetzungen für die Analyse von Membranproteinen.

Mit Hilfe von Epifluoreszenzmikroskopen ist es möglich, fluoreszenzmarkierte Proteine an der Membran sichtbar zu machen, jedoch können strahlende Fluorophore außerhalb der Fokusebene bei Bildaufnahme zu starkem Hintergrundrauschen führen. TIRF-Mikroskopie dagegen nutzt eine Besonderheit der Lichtwellenphysik aus und umgeht dieses Problem (Abbildung 9). Hierfür wird der anregende Laser schräg auf die zu untersuchende Probe gelenkt. Bei passendem Einfallswinkel kommt es zu einer kompletten Reflexion am Übergang zwischen Glas und wässrigem Medium. An dieser Stelle tritt jedoch auch ein Teil des Lichts als stehende (oder evaneszente) Welle mit einer Eindringtiefe von 100 - 200 nm in das wässrige Medium ein (Steyer und Almers 2001; Ravier et al. 2008). Bei richtiger Anordnung können somit in diesem Bereich sehr lokal Fluorophore angeregt werden. Bei der Mikroskopie von Zellen liegt die basale

Plasmamembran im Bereich des TIRF-Feldes und es können Bilder mit sehr gutem Signal/Hintergrund-Verhältnis von fluoreszenzmarkierten Membranproteinen aufgenommen werden. Hierdurch kann die Anordnung von Proteinen in der Membran sehr genau visualisiert werden, wodurch Rückschlüsse auf die laterale Organisation in der Plasmamembran möglich werden. Kombiniert man die Technik mit sehr lichtsensiblen Kameras, können sogar die Signale einzelner fluoreszierender Moleküle detektiert werden. Die Analyse der Bewegungsmuster von Einzelmolekülen ermöglicht die Bestimmung der genauen Diffusionsparameter bestimmter Proteinvarianten (Brown et al. 2009; Alcor et al. 2009).

Die konfokale Mikroskopie dagegen ermöglicht durch einen speziellen Aufbau separate Aufnahmen einzelner Schichten eines Objekts entlang der Fokusachse. Auch hier gibt es durch Lichtausschluss jenseits der

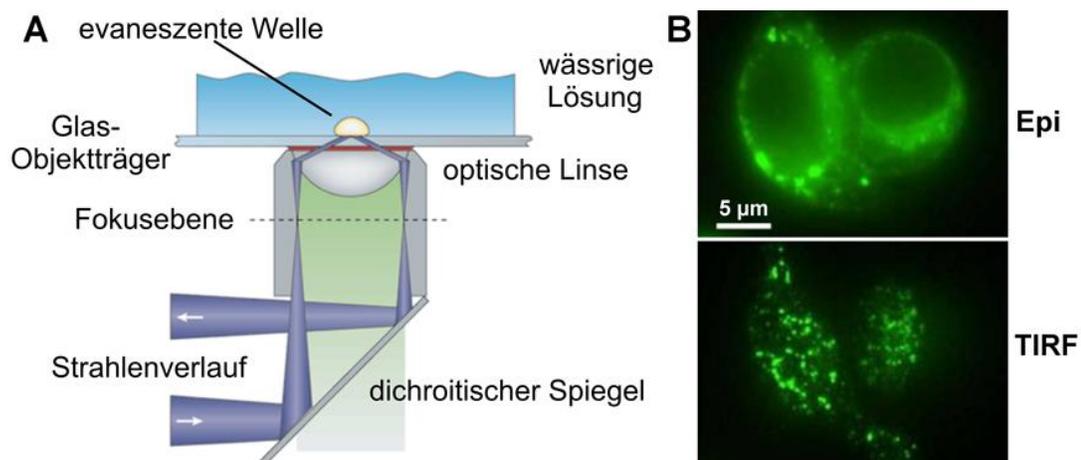


Abbildung 9 Total Internal Reflection (TIRF)-Mikroskopie

(A) Prinzip der TIRF-Mikroskopie: Schräg einfallendes Licht wird an der Grenzschicht zwischen Glas und wässrigem Medium reflektiert. Zusätzlich entsteht das optische Phänomen einer stehenden Welle, die abhängig vom Einfallswinkel einige 100 nm in das wässrige Medium hineinreicht. In diesem Bereich können sehr selektiv Fluorophore angeregt werden, wodurch wenig störende Hintergrundstrahlung erzeugt wird. (Abgewandelt aus Steyer und Almers 2001). (B) Säugerzellen, die ein fluoreszenzmarkiertes Membranprotein überexprimieren, aufgenommen entweder mit Epifluoreszenz- (oben) oder TIRF-Mikroskopie (unten). TIRF-Aufnahmen ermöglichen hierbei die gezielte und rauscharme Visualisierung von Proteinclustern in der basalen Plasmamembran. Die Abbildung wurde aus Brailoiu et al. 2010 entnommen und verändert.

Fokusebene sehr rauscharme Bildaufnahmen. Im Gegensatz zu TIRF-Mikroskopie ist die Ebene, in der die Aufnahmen gemacht werden, frei wählbar. Die Lichtempfindlichkeit ist allerdings deutlich geringer als bei TIRF-Aufnahmen. Trotzdem erlauben spezielle Versuchsaufbauten auch mit konfokaler Mikroskopie Rückschlüsse auf die Diffusion von Molekülen. Hierbei kann entweder die *fluorescence recovery after photo-bleaching* (FRAP)-Technik oder die *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (FCS)-Methode eingesetzt werden. Für beide Verfahren werden fluoreszenzmarkierte Proteine in Zellen überexprimiert. Für FRAP-Messungen wird in der untersuchten Zelle ein fluoreszierendes Areal durch kurzes Einstrahlen von starkem Laserlicht ausgebleicht. Das Durchmischen von ungebleichten Molekülen aus der angrenzenden Region mit den gebleichten kann beobachtet werden, wodurch auf die relative Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle geschlossen werden kann. Die konfokale Technik erlaubt FRAP-Messungen sowohl an inneren Zellstrukturen, als auch solche an der Plasmamembran (Rayan et al. 2010). Bei Analysen mit der FCS-Methode wird nur ein jeweils kleiner Bereich der Membran oder des Zellinneren zum Fluoreszieren angeregt. Durch die Bewegung fluorophorgekoppelter Moleküle in den illuminierten Bereich und aus ihm heraus, kommt es zu geringen Schwankungen der Intensität emittierter Fluoreszenz. Anhand der Fluktuationen der ermittelten Fluoreszenzen kann unter anderem auf die Diffusionsgeschwindigkeit und die ungefähre Anzahl der gemessenen Moleküle geschlossen werden (Haustein und Schwille 2007).

Die *stimulated emission depletion* (STED)-Mikroskopie, ermöglicht es auch, unterhalb der für lichtmikroskopische Aufnahmen üblichen Auflösungsgrenze von 200 - 300 nm zu arbeiten. Unter Verwendung eines konfokalen Laser-Raster Mikroskops (CLSM), kommt es hierbei durch spezielle Überlagerung eines anregenden und eines abregenden Laserstrahls zu punktförmiger Anregung unterhalb von 100 nm (Hell und Wichmann 1994). STED ermöglicht somit fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Objekten mit

Auflösungen in Bereichen, die bisher nur durch Elektronenmikroskopie aufzulösen waren.

2.3.3 Modellsysteme für die Analyse der Membranorganisation

Artifizielle Membranen

Der Aufbau von nativen Membranen ist sehr komplex - viele Bestandteile und deren Eigenschaften sind noch nicht bekannt. Dies erschwert die Untersuchung spezifischer Wechselwirkungen einzelner Membrankomponenten. Idealerweise sollten für eine genaue Analyse alle Faktoren bekannt sein, die einen Einfluss auf das untersuchte System haben. Um möglichst viele unbekannte Einflüsse auszuschließen, kann es deshalb sinnvoll sein, auf Modellsysteme auszuweichen, bei denen eine definierte Zusammensetzung bekannter Bestandteile und Eigenschaften gegeben ist. Die in einem solchen System erlangten Erkenntnisse können später auf die komplexere Situation zellulärer Membranen übertragen und überprüft werden. Als geeignete Modelle hierfür bieten sich artifiziell erstellte Membranen an. Verschiedene in Plasmamembranen vorkommende Lipide dienen als Bausteine für die Modelle. Die Lipide werden in eine wässrige Lösung eingebracht und bilden durch ihren amphiphilen Charakter (vgl. Abschnitt 2.2.1) unterschiedliche sphärische Strukturen aus. Mit Hilfe spezieller Protokolle kann erreicht werden, dass Vesikel entstehen, die entweder aus einer (unilamellar) oder mehreren (multilamellar) Lipiddoppelschichten aufgebaut sind und einen Teil der wässrigen Lösung umschließen (Jesorka und Orwar 2008). Gibt man diese - auch Liposomen genannten - Vesikel unter geeigneten Bedingungen auf ein Trägermaterial, können auch flächige Lipiddoppelschichten erzeugt werden (Reviakine und Brisson 2000). Sollen in dem Modell auch Proteininteraktionen untersucht werden, so können hierfür die gewünschten Proteine aus Zellen isoliert und in die artifiziellen Membranen eingebracht werden (Robelek et al. 2007;

Nimigean 2006). Durch den variablen Einsatz unterschiedlicher Lipid- und Proteinkombinationen kann eine Vielzahl von Bedingungen getestet werden.

Inwieweit die so erzielten Erkenntnisse die natürliche Situation in Plasmamembranen widerspiegelt, kann jedoch nur schwer beurteilt werden. Neben der schon angesprochenen deutlich höheren Komplexität der natürlichen Membran können beim Arbeiten mit Modellmembranen weitere Probleme auftreten. Faktoren wie die Proteinaktivität, die Menge der inkorporierten Membranbestandteile oder die richtige Orientierung von Proteinen in der Modellmembran sind nur schwer zu kontrollieren, können aber einen starken Einfluss auf die Funktionalität oder Organisation des Proteins haben.

Membrane Sheets

Eine Alternative zu Modellmembranen und der Untersuchung von Prozessen in der Membran intakter Zellen bieten zellfreie Plasmamembran-Präparationen. Hierfür werden durch mechanische Scherkräfte adhärent wachsende Zellen von der basalen Plasmamembran abgetrennt. Dies kann beispielsweise durch das schnelle Abziehen von aufliegendem Filterpapier oder einer Glasplatte erreicht werden (Rutter et al. 1986; Fujimoto et al. 1991). Einfacher in der Durchführung und besser zu reproduzieren ist die Behandlung der Zellen mit einem Ultraschall-Puls (Heuser 2000). Die nach der Behandlung auf dem Untergrund verbleibenden basalen Plasmamembranen werden auch als *Membrane Sheets* bezeichnet (Abbildung 10). Ursprünglich wurden diese Präparationen für elektronenmikroskopische Untersuchungen von Membranen verwendet, seit einiger Zeit kommen sie aber auch vermehrt bei fluoreszenzmikroskopischen Studien zum Einsatz. Die Verwendung von *Membrane Sheets* bietet den Vorteil, dass Untersuchungen von Membranbestandteilen unter Bedingungen stattfinden, die denen in der lebenden Zelle sehr nahe kommen. Durch die schnelle Präparation können Strukturen der Membran unter sehr natürlichen

Bedingungen beobachtet werden (Lang 2003). Die Organisation, sowie die Mengenverhältnisse einzelner Membranelemente, verbleiben im Vergleich zur nativen Situation nahezu unverändert und auch Einflüsse bisher unbekannter Membranbestandteile können berücksichtigt werden. Des Weiteren wird die zytosolische Membranseite ohne den Einsatz von Detergenzien zugänglich. Dies ermöglicht unter anderem einfache immunhistologische Färbungen von intrazellulären Membranepitopen. Hierdurch können neben einer Quantifizierung von Membranbestandteilen auch qualitative Aussagen gemacht werden - wie die mögliche Kolo-kalisation mit anderen Strukturen der Membran (Sieber et al. 2006). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich *Membrane Sheets* ebenfalls für funktionelle Studien eignen und auch diesbezüglich die Situation in intakten Zellen sehr gut widerspiegeln (Avery et al. 2000; Holroyd et al. 2002; Zilly 2006). Ein weiterer Vorteil der Methode besteht darin, dass mit einfacher Epifluoreszenzmikroskopie sehr rauscharme Aufnahmen von *Membrane Sheet*-Präparationen gemacht werden können. Durch das Fehlen von zytoplasmatischen Fluorophoren außerhalb der Fokusebene kommt es nur zu schwachen Hintergrundsignalen, die die Bildqualität kaum beeinträchtigen.

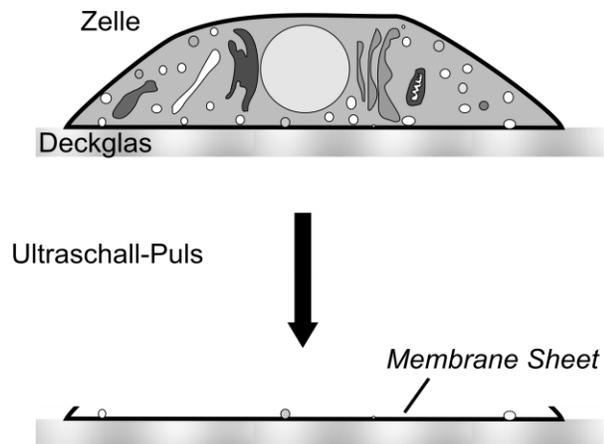


Abbildung 10 Erstellen von *Membrane Sheets*

Zellen werden auf Deckgläsern kultiviert und mit einem kurzen Ultraschall-Puls behandelt. Durch die Druckwelle reißt der obere Teil der Zelle ab und nur die basale Plasmamembran verbleibt auf dem Untergrund. Diese auch *Membrane Sheets* genannten basalen Membranen eignen sich als Grundlage für die mikroskopische Analyse von Membranstrukturen und funktionelle Studien von Membranproteinen in ihrer natürlichen Umgebung. (Veränderte Darstellung aus Lang 2003)

3 Zielsetzung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Identifizierung und Charakterisierung von Mechanismen der Organisation und Dynamik von Membranproteinen. Hierfür wurden Studien an intakten Zellen und Untersuchungen an isolierten, zellfreien Plasmamembranen durchgeführt.

Im ersten Teil der Dissertation sollte der Einfluss von extra- oder intratellulären Interaktionspartnern auf die Organisation des humanen Insulinrezeptors (hIR) untersucht werden. Hierfür sollte analysiert werden, ob sich die Ligandenbindung des Rezeptors oder Interaktionen mit der Glykokalix auf die Mobilität in der Membran auswirken. Zusätzlich sollte durch Deletion einzelner Bereiche des hIRs festgestellt werden, ob und welche Proteindomänen einen Einfluss auf die Dynamik des Rezeptors in der Plasmamembran haben. Um die Effekte intrazellulärer Faktoren zu untersuchen, sollte des Weiteren die Rezeptor-Mobilität in isolierten Plasmamembranen und in intakten Zellen verglichen werden.

Als zweites Thema sollten die Auswirkungen von Ca^{2+} auf die Mikrodomänenorganisation in Plasmamembranen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde geplant, den Einfluss von freien Calcium-Ionen auf das Clusterverhalten von SNARE-Proteinen zu analysieren. Proteine der SNARE-Familie wurden für diese Studien gewählt, da bereits gezeigt werden konnte, dass sie geclustert in Mikrodomänen der Membran vorkommen. Auf Grund ihrer geringen Größe eignen sich SNARE-Proteine außerdem als besonders überschaubares Modellsystem für die konzipierten Untersuchungen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ermittelt werden, in welchem Maße und in welchem Zeitraum ein Effekt von Calcium-Ionen auf die Organisation von SNARE-Protein-Clustern zu beobachten ist und ob dieser Prozess reversibel ist.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

Alle Standardchemikalien und Reagenzien wurden, falls nicht anders angegeben, von den in Deutschland ansässigen Firmen *Bio-Rad* (München), *Fermentas* (St. Leon-Rot), *Merck* (Darmstadt), *Promega* (Mannheim), *Roth* (Karlsruhe) oder *Sigma-Aldrich* (Hamburg) in p. a. Qualität bezogen.

4.1.1 Pufferlösungen

Bei einzelnen Pufferlösungen wurden verschiedene Varianten für bestimmte Experimente verwendet. Dies ist bei den entsprechenden Lösungen zusätzlich angegeben.

Sonifizierungs-Puffer

120 mM KGlu, 20 mM KAc, 10 mM EGTA, 20 mM HEPES, 0,5 mM DTT und 4 mM MgCl₂, pH 7,2 (verwendet für Experimente mit membrangebundenen Tyrosinkinasen - beschrieben im Abschnitt 6.1)

KGlu Puffer

120 mM KGlu, 20 mM KAc, 2 mM EGTA, 4 mM MgCl₂, 2 mM ATP und 20 mM HEPES, pH 7,2 (verwendet für Experimente mit membrangebundenen Tyrosinkinasen - beschrieben im Abschnitt 6.1)

Sonifizierungs KGlu Puffer

120 mM KGlu, 20 mM KAc, 2 mM EGTA, 20 mM HEPES, 2 mM ATP und 4 mM MgCl₂, pH 7,2

ATP wurde vor den Experimenten frisch zur Lösung gegeben und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. (Verwendet für Experimente mit SNARE-Proteinen - beschrieben im Abschnitt 6.2)

BSA - KGlu Puffer

120 mM KGlu, 20 mM KAc, 4 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 20 mM HEPES und 3 % (w/v) BSA, pH 7,4 (verwendet für Experimente mit SNARE-Proteinen - beschrieben im Abschnitt 6.2)

Ringerlösung

130 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 48 mM D(+)Glukose und 10 mM HEPES, pH 7,4

Ringerlösung (hohe Calcium-Konzentration)

130 mM NaCl, 4 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 48 mM D(+)Glukose und 10 mM HEPES, pH 7,4 (verwendet für Experimente mit SNARE-Proteinen - beschrieben im Abschnitt 6.2)

PBS

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,2

Paraformaldehyd - Stocklösung

16 % (w/v) PFA in ddH₂O bei 65 °C und alkalischer Hydrolyse auflösen, auf RT abkühlen lassen, auf pH 7,2 einstellen und bei -20 °C lagern. Zur Verwendung mit 10x PBS und ddH₂O auf 4 % (w/v) verdünnen, pH 7,2

Zytomix

120 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, 10 mM K₂HPO₄, 0,15 mM CaCl₂, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂ und 25 mM HEPES, pH 7,6 (pH-Wert mit KOH einstellen)

Stocklösung CaDPTA (125x)

250 mM DPTA und 250 mM CaCl₂ in ddH₂O, pH 7,2

Stocklösung DPTA (125x)

250 mM DPTA in ddH₂O, pH 7,2

CaDPTA/DPTA - BSA-KGlu Puffer

2 Volumenanteile CaDPTA (125x) Stocklösung werden mit 3 Volumenanteilen DPTA (125x) Stocklösung vermischt. 80µL der CaDPTA/DPTA Mischung werden auf 10 mL BSA - KGlu Puffer gegeben, pH 7,2. Hierdurch wird eine Konzentration von 54 µM freiem Calcium erreicht (siehe auch Holroyd et al. 2002). Da die Zugabe von DPTA den pH-Wert der Lösung ändert, ist es wichtig den pH erst nach dem Vermischen aller Bestandteile einzustellen.

TMA-DPH-Lösung

Gesättigte 1-(4-Trimethyl-Ammoniumphenyl)-6-Phenyl-1,3,5-Hexatrien p-Toluolsulfonat (TMA-DPH; #T204, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)-Lösung in PBS, 5 min bei 11000 x g zentrifugieren und Überstand im Verhältnis 1/3 in Mikroskopie-Pufferlösung verwenden.

Mowiol-Eindeckelmedium

6 g Glycerol, 2,4 g Mowiol (#4-88, Hoechst, Frankfurt, Deutschland), 6 mL ddH₂O, 12 mL 200 mM Tris, pH 7,2. Dann Zugabe von einigen DABCO (#0718.1, Roth, Deutschland)-Kristallen. ÜN auf einem Rotator bei RT unter Lichtausschluss lösen lassen. 5 min bei 11000 x g zentrifugieren und Überstand als Aliquots bei -20 °C einfrieren.

4.1.2 Zellkulturmedien

PC12-Standardmedium

DMEM Glc 4,5 g/L mit L-Gln und Phenol-Rot (PAA, Pasching, Österreich), 1,6 mM L-Gln 100 x (0.8 % (v/v)), 5 % (v/v) fötales Kälberserum, 10 % (v/v)

Pferdeserum (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 1 % (v/v)
Penicillin/Streptomycin 100 x (Penicillin 10.000 U/mL; Streptomycin 10 mg/mL) (PAA, Pasching, Österreich)

HepG2-Standardmedium

EMEM (Lonza, Verviers, Belgien), 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v)
Penicillin/Streptomycin 100 x (Penicillin 10.000 U/mL; Streptomycin 10 mg/mL) (PAA, Pasching, Österreich)

H460-Standardmedium

RPMI-1640 mit Phenol-Rot (PAA, Pasching, Österreich), 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 100 x (Penicillin 10.000 U/mL; Streptomycin 10 mg/mL) (PAA, Pasching, Österreich)

SkBr3-Standardmedium

RPMI-1640 mit Phenol-Rot (PAA, Pasching, Österreich) t, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 100 x (Penicillin 10.000 U/mL; Streptomycin 10 mg/mL) (PAA, Pasching, Österreich)

Hungermedien

Für das Erstellen von Hungermedien wurde die gleiche Zusammensetzung wie für die angegebenen Standardmedien verwendet mit der Änderung, dass keine Seren zugegeben wurden.

4.1.3 Antikörper

Primäre Antikörper

α EGFR: Kaninchen polyklonal IgG (#Sc-03, Santa Cruz Inc, USA)

Eingesetzte Verdünnung: 1/100

α EGFR (IGR 10): Ratte monoklonal IgG_{2a} (#Sc-57095, Santa Cruz Inc, USA). Eingesetzte Verdünnung: 1/100

α HER2: Kaninchen polyklonal IgG (#SC-284, Santa Cruz Inc, USA)

Eingesetzte Verdünnung: 1/100

α HER3: Kaninchen polyklonal IgG (#Sc-285, Santa Cruz Inc, USA)

Eingesetzte Verdünnung: 1/100

α Insulinrezeptor α : Kaninchen polyklonal IgG (#Sc-710, Santa Cruz Inc, USA). Eingesetzte Verdünnung: 1/100

α Insulinrezeptor α : Kaninchen polyklonal IgG (#Sc-7953, Santa Cruz Inc, USA). Eingesetzte Verdünnung: 1/100

α Insulinrezeptor β : Kaninchen polyklonal IgG (#Sc-711, Santa Cruz Inc, USA). Eingesetzte Verdünnung: 1/100

α Insulinrezeptor β : Kaninchen polyklonal IgG (#Sc-20739, Santa Cruz Inc, USA). Eingesetzte Verdünnung: 1/100

α Syntaxin1A (HPC-1); Maus monoklonal (Barnstable et al. 1985)

Eingesetzte Verdünnung: 1/200

α SNAP25 (C1.71.1); Maus monoklonal, erkennt AA20-40 (# 111001; Synaptic Systems, Deutschland). Eingesetzte Verdünnung: 1/200

α Synaptophysin (C1. 7.2); Maus monoklonal (# 101001, Synaptic Systems, Deutschland). Eingesetzte Verdünnung: 1/200

Wheat Germ Agglutinin (WGA) AlexaFluor 594 (#W11262, Invitrogen, Karlsruhe). Eingesetzte Verdünnung: 1/200

Sekundäre Antikörper

Esel anti Kaninchen AlexaFluor 594 (#A21207, Invitrogen, Karlsruhe)

Eingesetzte Verdünnung: 1/200

Esel anti Kaninchen AlexaFluor 488 (#A21206, Invitrogen, Karlsruhe)

Eingesetzte Verdünnung: 1/200

Ziege anti Maus Cy3 (#115-165-003, Dianova, Hamburg, Deutschland)

Eingesetzte Verdünnung: 1/400

Ziege anti Kaninchen Atto (#647N, Atto-Tec, Siegen, Deutschland)

Eingesetzte Verdünnung: 1/100

Ziege anti Ratte Cy3 (# 112-166-003, Dianova, Hamburg, Deutschland)
Eingesetzte Verdünnung: 1/200

4.1.4 Reagenzien / Faktoren

Stimulationsagentien für Tyrosinkinasen

Humanes Heregulin- β -1 (#100-03 PeproTech, Inc; USA)

Stocklösung: 1 μ g / μ L; Arbeitskonzentration: 25 ng/mL

Insulin-Lösung, human (#9278, Sigma Aldrich, USA)

Stocklösung: 1,7 mM; Arbeitskonzentration: 100 nM

Humanes rekombinantes EGF (#AF-100-15, PeproTech, USA)

Stocklösung: 20 μ g/mL; Arbeitskonzentration: 50 ng/mL

Reagenzien für Calcium-Versuche

Ionomycin (#Asc-116, Ascent Scientific, USA)

Stocklösung: 20 mM in DMSO; Arbeitskonzentration: 20 μ M

Carbachol (#C4382, Sigma-Aldrich, USA)

Stocklösung: 1 M in ddH₂O; Arbeitskonzentration: 5 mM

Thapsigargin (#T9033, Sigma-Aldrich, USA)

Stocklösung: 1 mM in DMSO; Arbeitskonzentration: 1 μ M

Protease Inhibitoren

complete, Mini, EDTA-free (#1836170, Roche, Mannheim, Deutschland)

Arbeitskonzentration: Konzentration (1x) nach Herstellerangaben

(hemmt Serin- und Cystein-Proteasen)

1,10-Phenanthroline (#P1294, Sigma-Aldrich, USA)

Stocklösung: 200 mM in EtOH (abs.); Arbeitskonzentration: 1 mM

(hemmt Metallo-Proteasen)

Pepstatin A (#P4265, Sigma-Aldrich, USA)

Stocklösung: 1,46 mM in DMSO; Arbeitskonzentration: 1,46 μ M

(hemmt von Aspartyl-Proteasen)

Enzymmix für Glykokalix-Abbau

Neuramidase (#N2876, Sigma-Aldrich, USA)

Arbeitskonzentration: 0,5 Units/mL

PNGase (#G5166, Sigma-Aldrich, USA)

Arbeitskonzentration: 0,1 Units/mL

Galactosidase (#P07305, BioLabs, Frankfurt, Deutschland)

Arbeitskonzentration: 0,16 Units/mL

4.1.5 Zelllinien

PC12-Zellen

PC12-Zellen wurden ursprünglich aus einem Nebennierentumor einer bestrahlten Ratte (*rattus norvegicus*) gewonnen (Klon 251; Heumann et al. 1983).

Die Zellen wurden alle 3 - 4 Tage, bei einer Konfluenz von ca. 80 % im Verhältnis 1/3 - 1/4 subkultiviert. Für die Langzeitaufbewahrung in flüssigem Stickstoff wurden 2×10^6 Zellen/mL eingefroren.

SkBr3-Zellen

Die Zellen stammen aus einem Adenokarzinom (*homo sapiens*), (#HTB-30; ATCC).

Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 3 - 4 Tage bei einer Konfluenz von 80 - 90 % im Verhältnis 1/3 - 1/4. Für die Kryokonservation wurden sie in einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen/mL eingefroren

HepG2-Zellen

HepG2 entstammen einem hepatozellulären Karzinom (*homo sapiens*), (#HB-8065; ATCC).

Bei einer Konfluenz der Zellen von 70 - 80 % wurden diese alle 4 - 5 Tage passagiert. Ein Anteil von 1/4 bis 1/5 wurde subkultiviert. Für das Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff wurde eine Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/mL eingesetzt.

H460-Zellen

H460- oder NCI-H460-Zellen wurden ursprünglich aus einem großzelligen Lungenkrebs (*homo sapiens*) isoliert (#HTB-177; ATCC).

Wegen sehr starken Wachstums müssen diese Zellen alle 3-4 Tage bei einer Konfluenz von ca. 80 % im Verhältnis 1/10 -1/20 passagiert werden. Die Zellen wurden für die Langzeitlagerung mit einer Konzentration 1×10^6 Zellen/mL in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.1.6 DNS-Konstrukte (erstellt durch Vorarbeiten anderer)

Syntaxin 1A-mGFP, beschrieben in (Sieber et al. 2006)

mGFP-SNAP25B, beschrieben in (Halemani et al. 2010),

(beide erhalten von Nagaraj D. Halemani)

pRcCMVi.hIR(B) Δ 23-mEGFP, beschrieben in (Uhles et al. 2003), wurde von Ingo Leibiger (Karolinska Institut, Stockholm, Schweden) zur Verfügung gestellt.

5 Methoden

5.1 Klonierung

Alle Klonierungen wurden nach Standardverfahren durchgeführt (Sambrook und Russell 2006). Die verwendeten Oligonukleotide wurden von *MWG Operon* (Ebersberg, Deutschland) bezogen und die Sequenzierungen bei *GATC-Biotech* (Konstanz, Deutschland) durchgeführt.

Als Grundlage für die DNS-Konstrukte, die für diese Arbeit erstellt wurden, diente der pRcCMVi.hIR(B) Δ 23-mEGFP Vektor. Dieser Vektor beinhaltet die Sequenz für den Wildtyp des humanen Insulinrezeptors (hIR) Isotyp B mit einer Deletion der letzten 23 Aminosäuren. C-terminal daran gekoppelt ist die Sequenz für eine monomere Variante des EGFP-Moleküls (siehe auch

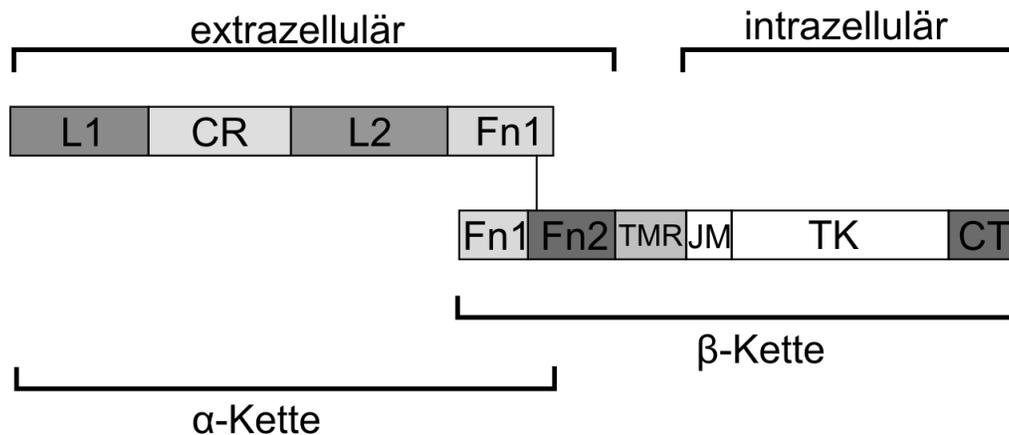


Abbildung 11 Aufbau des humanen Insulinrezeptors

Der humane Insulinrezeptor ist aufgeteilt in eine N-terminale α -Kette und eine C-terminale β -Kette, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Der Rezeptor weist einen Membrandurchgang im Bereich der β -Kette auf. Die α -Kette und ein kleiner Bereich der β -Kette befinden sich im extrazellulären Bereich, der größere Teil der β -Kette ist intrazellulär. Die Struktur kann weiter unterteilt werden in: L1 und L2 (Leucin-reiche Bereiche), CR (Cystein-reiche Domäne), Fn (Fibronectin Typ III- Domänen), TMR (Transmembran Bereich), JM (Membran-nahe Region), TK (Tyrosinkinase Domäne) und den CT (C-terminalen Bereich). Die Darstellung ist eine Abwandlung aus de Meyts und Whittaker 2002. Zur Vereinfachung wurde eine weitere Unterteilung der Fn-Domänen nicht aufgeführt.

4.1.6). Auf dieser Basis wurden über PCR- Amplifikation unterschiedliche Deletionskonstrukte des hIRs erstellt. Hierfür wurden die entsprechend deletierten Sequenzen über Restriktionsverdau in den pRcCMVi Grundvektor (siehe auch Moede et al. 1999) - anstelle der Wildtyp-Sequenz - eingebracht. Die gewählten Deletionsbereiche orientierten sich an den einzelnen Proteindomänen (Abbildung 11), die in strukturellen Studien über den hIR beschrieben wurden (Ebina et al. 1985; McKern et al. 2006).

Zur besseren Übersicht sind alle in der Arbeit verwendeten Konstruktvarianten des hIRs in Abbildung 12 aufgeführt. Die Bezeichnungen der erstellten Konstrukte richten sich nach den deletierten Aminosäuresequenzen.

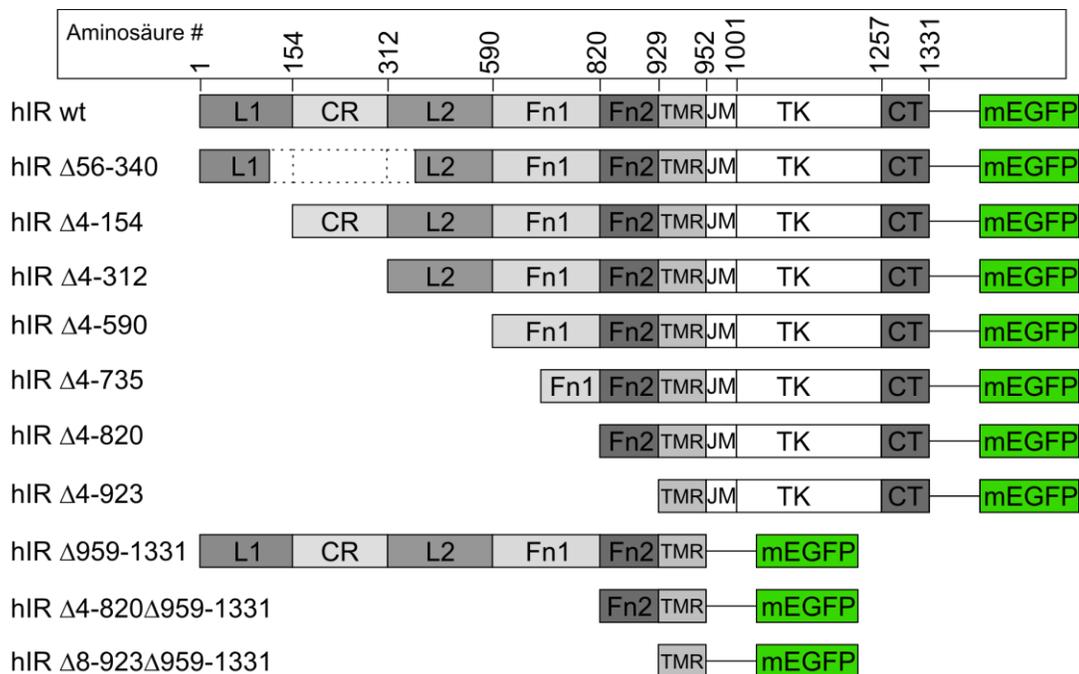


Abbildung 12 Verwendete Konstrukte des hIR

Das oben in der Abbildung als „hIR wt“ dargestellte Konstrukt diente als Grundlage für die unterschiedlichen Deletionskonstrukte, die im Rahmen der Arbeit zum Einsatz kamen. Alle Varianten wurden in Verbindung mit einer C-terminalen mEGFP-Markierung im Plasmid pRcCMVi überexprimiert.

5.2 Beschichtung von Deckgläsern mit Poly-L-Lysin (PLL)

Es sind für die Versuche runde Deckgläser mit dem Durchmesser 25 mm und Stärke No. 0 (#0110650, Marienfeld, Deutschland) verwendet worden.

Die Gläser wurden auf einem Rührschüttler zunächst für 1 Std mit 1 M HCl behandelt, dann 3x mit ddH₂O gewaschen. Daraufhin folgte ein einstündiges Bad in 1 M NaOH und ein erneutes dreimaliges Waschen mit ddH₂O. Zuletzt wurden die Deckgläser für zwei weitere Stunden in EtOH (abs.) geschüttelt, wonach der Alkohol abgegossen und die Gläser autoklaviert wurden. Nach vollständigem Trocknen wurden die Deckgläser unter sterilen Bedingungen einzeln in die Vertiefungen von 6 - Well Platten gelegt und für 20 min bei RT mit 500 µL einer 100 µg/mL PLL-Lösung in ddH₂O (#P1524, Sigma Aldrich) beschichtet. Danach wurde die Lösung abgesaugt und die Deckgläser 2x mit jeweils 2 mL ddH₂O gewaschen. Die Gläser wurden anschließend für mindestens 2 Std unter der Sterilbank getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

5.3 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien PC12, HepG2, H460 und SkBr3 (siehe auch 4.1.5) wurden unter sterilen Bedingungen kultiviert. Es wurde Standard-Zellkulturplastikware der Firmen *Sarstedt* (Nürnbrecht, Deutschland) und *Labomedic* (Bonn, Deutschland) verwendet.

5.3.1 Auftauen und Passagieren

Zellsuspensionaliquots wurden für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Verwendung wurden Aliquots für drei bis fünf Minuten in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut - bis nur noch ein geringer Teil der Suspension gefroren war. Es wurden 10 mL Standardmedium der jeweiligen Zelllinie (siehe auch 4.1.2) in ein 15 mL Zentrifugationsröhrchen vorgelegt, die aufgetaute Zellsuspension wurde möglichst schnell in das

Medium überführt und für 3 min bei 200 xg und RT zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen mit 0,8 mL frischem Standardmedium - mittels Auf- und Abpipettieren - mit einer 1000 µL Pipettenspitze resuspendiert und in eine mit 10 mL Standardmedium gefüllte 25 cm² Zellkulturflasche gegeben. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Nach 24 Std wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und durch frisches Standardmedium ersetzt, um tote Zellen im Überstand zu entfernen. Je nach Zelltyp wurde alle 3 - 5 Tage passagiert. Hierfür wurde das Medium komplett abgesaugt, die Zellen 1x mit PBS gewaschen und für 5 min bei 37 °C mit einigen 1 - 3 mL Trypsin-EDTA (PAA, Pasching, Österreich) inkubiert (0,5 mL bei 25 cm² Zellkulturflaschen, 1,5 mL bei 75 cm² und 3 mL bei 175 cm²). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zuerst durch Anschlagen der Zellkulturflasche an einen festen Gegenstand von der Oberfläche gelöst, dann mit 10 mL Standardmedium abgewaschen und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach Zentrifugieren der Zellsuspension bei 200 xg bei RT für 3 min wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 0,8 mL Standardmedium mittels mehrfachen Pipettierens durch eine 1000 µL Pipettenspitze resuspendiert. Die Suspension wurde dann in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Standardmedium gegeben. Für die genaue Verdünnung der jeweiligen Zelllinien siehe Abschnitt 4.1.5.

Für einige Versuche wurden die Zellen auf PLL beschichteten Deckgläsern kultiviert. Hierfür wurde nach dem Splitten ein Teil der Zellsuspension mit Standardmedium auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen pro mL eingestellt und 500 µL der Lösung auf die einzelnen Deckgläser gegeben. Dann wurden die Zellen für 15 min bei 37 °C und 5 % CO₂ adhären gelassen, danach wurden 2 mL Standardmedium zugegeben und bis zum Versuch 24 - 48 Std weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für Versuche wurden Zellen der Passagen 4 - 20 verwendet.

5.3.2 Einfrieren der Zellen für die Langzeitlagerung

Für das Einfrieren wurden die Zellen bis auf ca. 80 % Konfluenz anwachsen gelassen. Dann wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen 1x mit PBS gewaschen und für 5 min bei 37 °C mit 1 - 3 mL Trypsin-EDTA (*PAA*, Pasching, Österreich) inkubiert. Zum Ablösen der Zellen wurde die Zellkulturflasche dann gegen eine feste Oberfläche geschlagen, die Zellen mit 10 mL Standardmedium abgewaschen und in ein Zentrifugationsröhrchen gefüllt. Die Suspension wurde bei 200 x g bei RT für 3 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde mittels einer 1000 µL Pipettenspitze resuspendiert und mit einer Mischung aus Standardmedium/fötalem Kälber Serum/DMSO (im Volumenverhältnis 70/20/10) auf eine Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen pro mL eingestellt. Die Mischung ist danach in 1 mL Aliquots in Einfrierröhrchen gefüllt worden, welche zunächst für 24 Std in einem Isopropanol-isolierten Gefriergefäß bei -80 °C eingefroren wurden. Danach wurden sie für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

5.3.3 Transfizieren von Zellen

Zum Transfizieren der Zellen wurden diese - bei einer Konfluenz von etwa 80 %, wie zuvor beschrieben, mit Hilfe von Trypsin-EDTA (*PAA*, Pasching, Österreich) von der Zellkulturflasche gelöst, mit Medium abgewaschen und abzentrifugiert.

Bei der Transfektion mittels Elektroporation wurde das Zellpellet mit Cytomix resuspendiert und auf eine Zellkonzentration von $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen pro mL eingestellt. Jeweils 400 µL dieser Suspension wurden mit 20 - 50 µg aufgereinigter DNS versetzt und in eine 2 mm Elektroporations-Küvette (#1652086, *BioRad*, München) gegeben. Die Elektroporation wurde mit dem Genepulser Xcell™ (*Biorad*, München) für die jeweiligen Zelltypen mit den folgenden Einstellungen durchgeführt:

PC12: exponentielles Protokoll; 1150 V, 50 µF, 50 Ω

HepG2: exponentielles Protokoll; 200 V, 950 μ F, 200 Ω

Die elektroporierte Zellsuspension wurde in 3 mL Standardmedium überführt, gemischt und auf PLL beschichtete Deckgläser, mit 0,5 mL Lösung pro Deckglas, ausplattiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden weitere 2 mL Standardmedium pro Deckglas zugegeben und die Zellen bis zum Versuch 24 - 48 Std weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

5.3.4 Stimulation der Zellen

Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, auf PLL-beschichteten Deckgläsern ausplattiert und in Standardmedium inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium durch Hungermedium ersetzt. Nach einer Übernachtinkubation erfolgte die Stimulation der Zellen in Hungermedium bei 37 °C und 5 % CO₂. HepG2-Zellen wurden für 15 min mit 100 nM Insulin, H460-Zellen sind für 5 min mit 50 ng/mL EGF-Lösung und SkBr3 mit 25 ng/mL Heregulin stimuliert (siehe Abschnitt 4.1.4). Nach der Stimulation wurden die Zellen sofort sonifiziert (siehe Abschnitt 5.3.8), fixiert und anschließend immunhistochemisch gefärbt (siehe Abschnitt 5.3.9).

5.3.5 Behandlung von PC12-Zellen mit Ionomycin

Variante für TRIF- und FRAP-Messungen

Die Zellen wurden mit Syntaxin1A oder SNAP25 Konstrukten transfiziert, auf PLL-beschichteten Deckgläsern ausplattiert und für einen Tag bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dann wurden die Zellen in Ringerlösung mikroskopiert, transfizierte Zellen wurden ausgesucht. Nach einer FRAP-Messung oder der Aufnahme eines TIRF-Bildes wurden die Zellen für 5 min in Ringerlösung (hohe Calcium-Konzentration) mit 20 mM Ionomycin inkubiert. Unter Kontrollbedingungen wurden zusätzlich 10 mM EGTA hinzugegeben und der pH-Wert erneut auf 7,4 eingestellt. Nach der Inkubationszeit wurde eine weitere FRAP-Messung an derselben Zelle durchgeführt bzw. ein TIRF-Bild aufgenommen. Die TIRF-Aufnahmen wurden bei ca. 50 % Intensität des 488

nm-Lasers mit einer Belichtungszeit von 200 ms gemacht. Da die Fluoreszenzintensität von GFP durch einen veränderten pH-Wert beeinflusst werden kann, wurde - um einen pH-Effekt auszuschließen - im Anschluss Ringerlösung mit 50 mM NH_4Cl zugegeben. Danach wurde direkt ein weiteres Bild bei gleicher Laserleistung aufgenommen. Die Analyse der Bilder wurde mit Hilfe von *ImageJ* durchgeführt.

Variante für Calcium-Recovery Experimente

Für die *Recovery* Experimente (siehe Abschnitt 6.2.2) wurden PC12-Zellen auf PLL-beschichtete Deckgläser ausplattiert und für einen Tag bei 37 °C und 5 % CO_2 anwachsen gelassen. Das Medium wurde dann gegen Ringerlösung (hohe Calcium-Konzentration) mit 20 μM Ionomycin ausgetauscht und die Zellen bei RT für 5 min inkubiert. Für Kontrollbedingungen wurden zusätzlich 10 mM EGTA zugegeben (pH-Wert wurde vor Zugabe erneut auf 7,4 eingestellt). Dann wurden die Zellen 3 x mit Medium gewaschen und in Medium bei 37 °C bei 5 % CO_2 weiter inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (siehe Abbildung 28) wurden *Membrane Sheets* erstellt. Diese wurden dann fixiert und immunhistochemisch (siehe Abschnitt 5.3.9) gegen Syntaxin1 oder SNAP25 gefärbt. Sowohl dem Fixativ als auch allen für die Immunanfärbung verwendeten Lösungen wurden zusätzlich 2 mM EGTA zugesetzt. Die angefärbten *Membrane Sheets* wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie analysiert.

5.3.6 Behandlung von PC12-Membrane Sheets mit 54 μM freiem Calcium

PC12-Zellen wurden auf PLL-beschichteten Deckgläsern ausplattiert und für zwei Tage bei 37 °C und 5 % wachsen gelassen. In eiskaltem Sonifizierungs-KGlu-Puffer wurden *Membrane Sheets* erstellt. Die nativen Proben wurden bei 37 °C für unterschiedliche Zeitintervalle (siehe Abbildung 26) mit CaDPTA/DPTA - BSA-KGlu-Puffer inkubiert. Für Kontrollbedingungen

wurden *Membrane Sheets* mit BSA-KGlu Puffer behandelt, der zusätzlich 2 mM DPTA enthielt.

In einem analog aufgebauten Experiment (Abbildung 27) wurden die PC12 *Membrane Sheets* für 10 min bei 37 °C mit CaDPTA/DPTA - BSA-KGlu Puffer oder als Kontrollkondition mit BSA-KGlu Puffer mit 2 mM DPTA inkubiert. Parallel dazu wurden in einem zweiten Ansatz die jeweiligen Konditionen mit verschiedenen Proteaseinhibitoren (complete/Mini/EDTAfree Mix, Pepstatin A und 1,10-Phenanthroline) versetzt (siehe auch Abschnitt 4.1.4).

In beiden Experimenten wurden die *Membrane Sheets* nach der Inkubation fixiert und gegen Syntaxin1, SNAP25 oder Synaptophysin angefärbt. Sowohl die Fixier- als auch alle Färbelösungen wurden zusätzlich mit 2 mM EGTA versetzt. Die *Membrane Sheets* wurden dann mit einem Epifluoreszenzmikroskop analysiert.

5.3.7 Glykokalixabbau an HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden wie oben beschrieben mit dem hIR-mEGFP-Wildtyp-Konstrukt transfiziert, auf PLL-beschichtete Deckgläser ausplattiert und zwei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden dann einmal mit PBS und einmal mit HepG2-Hungermedium bei RT gewaschen. Danach wurde pro Deckglas 1 mL Enzymmix (bestehend aus Neuramidase (0,5 Units/mL), PNGase (0,1 Units/mL) und Galactosidase (0,16 Units/mL) in Hungermedium) oder für Kontrollbedingungen nur Hungermedium zu den Proben gegeben. Nach 1 Std Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde einmal mit Hungermedium gewaschen und die Proben danach entweder für FRAP-Experimente oder WGA-Färbung weiter verwendet.

5.3.8 Erstellen von *Membrane Sheets*

Für die Erstellung von *Membrane Sheets* wurde mit dem Ultraschallgerät *Sonopuls* (#GM2070; *Bandulin*, Berlin, Deutschland) gearbeitet. Es wurden Zellen verwendet, die zuvor für 24 - 48 Std auf PLL beschichtete Deckgläser kultiviert worden waren (siehe Abschnitt 5.3.1). In eiskaltem Sonifizierungspuffer wurden die Zellen in einem Abstand von etwa 0,5 cm unter dem Sonifizierungsstab (#MS73; *Bandulin*, Berlin, Deutschland) platziert und für 0,1 s einem Ultraschallimpuls ausgesetzt. Die Impulsstärke wurde für jeden Zelltyp so optimiert, dass nach der Ultraschallbehandlung auf dem Deckglas eine sternförmige, ungetrübte Region im weißlich erscheinenden Zellrasen sichtbar wurde. (In diesen Bereichen wird durch den Ultraschall bei den meisten Zellen der obere Bereich abgetrennt und es verbleiben nur noch die basalen Membranen auf der Glasoberfläche - die sogenannten *Membrane Sheets*.) Die behandelten Proben wurden dann entweder sofort nativ für Versuche verwendet oder fixiert. Für die Fixierung wurde für 1,5 Std bei RT in 4 % PFA (w/v) in PBS inkubiert.

5.3.9 Immunanfärbung

Für diese Arbeit wurden Immunanfärbungen an *Membrane Sheets* durchgeführt (siehe auch Lang et al. 2001). Für die Färbung wurden die jeweiligen Zellen für 24 - 48 Std auf PLL beschichteten Deckgläsern kultiviert. Danach wurden *Membrane Sheets* erstellt. Alle weiteren Schritte wurden bei RT durchgeführt. Für alle Immunanfärbungen von Proben, die zuvor mit erhöhten Calcium-Konzentrationen behandelt wurden (siehe Abschnitte 5.3.5 und 5.3.6), ist in den nachfolgenden Schritten allen Lösungen 2 mM EGTA zugefügt worden.

Nach 1-1,5 Std Fixierung in 4 % PFA (w/v) in PBS wurde restliches Fixativ mit 50 mM NH₄Cl in PBS für 20 min gequenchet. Dann wurde 3x für jeweils 10 min mit PBS gewaschen. Als nächstes wurde für 1 Std mit dem primären Antikörper inkubiert, 3x für 10 min mit PBS gewaschen und dann eine

weitere Stunde mit dem sekundären Antikörper behandelt (Verdünnungen der Antikörper siehe Abschnitt 4.1.3). Die jeweiligen Antikörper wurden für die Färbungen mit 1 % BSA (w/v) in PBS verdünnt, 45 min bei RT inkubiert, bei 11000 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand für die Färbung verwendet. Für Proben, die zuvor mit erhöhten Calcium-Konzentrationen behandelt wurden (siehe Abschnitte 5.3.5 und 5.3.6), sind die Antikörper mit 3 % BSA (w/v) in PBS verdünnt und inkubiert worden.

Für die Inkubation der Proben mit den Antikörpern wurden pro Kondition 150 µL der verdünnten Antikörperlösung auf Parafilm (#PM-996, *Pechiney Plastic Packaging*, USA) platziert und die einzelnen Deckgläser mit der Zell-Seite darauf gelegt. Die Antikörperfärbungen wurden unter Lichtausschluss in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Nach der Behandlung mit dem sekundären Antikörper wurde 3x für jeweils 10 min mit PBS gewaschen. Dann wurden die Proben direkt unter Verwendung von TMA-DPH-Lösung mikroskopiert. Für eine langfristige Aufbewahrung wurden Proben mit Kunstharz konserviert. Hierfür wurden 15 µL Mowiol-Lösung auf einen Objektträger gegeben, die Deckgläser luftblasenfrei mit der Zell-Seite darauf platziert und 24 Std lichtgeschützt bei RT aushärten gelassen.

5.3.10 *Wheat germ agglutinin (WGA) - Färbung*

Für die Färbung wurden die - wie in Abschnitt 5.3.7 beschriebenen - vorbehandelten HepG2-Zellen verwendet. Von den Zellen wurden *Membrane Sheets* erstellt und 1,5 Std bei RT mit 4 % (w/v) PFA Lösung in PBS inkubiert. Danach wurden die Proben für 20 min bei RT in 50 mM NH₄Cl in PBS gequench und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurde auf Parafilm (#PM-996, *Pechiney Plastic Packaging*, USA) 150 µl WGA-Lösung (3 % BSA (w/v) in PBS mit 1/200 WGA AlexaFluor 594) pro Probe vorgelegt und die Deckgläser mit der Zellseite auf die Lösung platziert. Nach 90 min Inkubation bei RT im Dunklen wurden die Proben dreimal mit

PBS gewaschen und - wie in Abschnitt 5.4.1 beschrieben - mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop analysiert.

5.4 Mikroskopie

5.4.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Für die Epifluoreszenzmikroskopie wurden das *Zeiss Axio Observer D1* (*Zeiss*, Oberkochen, Deutschland) in Kombination mit einem x 100 Öbobjektiv (Plan-Apochromat, NA 1,4) und einer gekühlten digitalen 12 Bit CCD Kamera (*Sensicam QE*; *PCO AG*, Kehlheim, Deutschland) verwendet. Der benutzte Kamerachip hatte 1376x1040 Pixel und eine Pixelgröße von 6,45x6,45 μm^2 . Die Kamera- und Shuttereinstellungen während der Bildaufnahmen wurden mittels der Software *CamWare* (*PCO AG*, Kehlheim, Deutschland) gesteuert und die Proben mit einer Xenon-Lampe (*XBO75 100.26B*; *LEJ GmbH*, Jena, Deutschland) in Verbindung mit verschiedenen Filtersätzen angeregt. Für die Detektion von TMA-DPH Fluoreszenz wurde die Filterkombination F11000 (Anregungsfilter D 350/50, Strahlteiler 400 DCLP und Emissionsfilter E 420 LP) eingesetzt. Mit Cy3 oder AlexaFluor 594 angefärbte Proben wurden mit der Filterkombination F36-503 TRITC (BrightLine HC 543/22, BS 562 und Bright Line HC 593/40) mikroskopiert. Alle beschriebenen Filterzusammenstellungen stammen von der *AHF Analysenteknik AG* (Tübingen, Deutschland).

5.4.2 Mikroskopie von *Membrane Sheets*

Membrane Sheets wurden, wie oben beschrieben, mittels Epifluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Hierfür wurden die fixierten und angefärbten Proben (siehe Abschnitt 5.3.9) in eine spezielle Mikroskopierkammer eingespannt. Die Kammer ermöglicht, die Deckgläser in einer Pufferlösung zu mikroskopieren. Zur Visualisierung der *Membrane Sheets* wurde PBS mit dem Lipidfarbstoff TMA-DPH versetzt und auf die Proben gegeben. Hierfür wurde pulverförmiges TMA-DPH in PBS gegeben,

so dass eine gesättigte Lösung entstand. Die Mischung wurde zentrifugiert, der Überstand im Verhältnis 1/3 in frisches PBS gegeben und zur Mikroskopie verwendet. Die im TMA-DPH-Kanal (siehe Abschnitt 5.4.1) sichtbaren *Membrane Sheets* wurden so ausgewählt, dass nur möglichst intakte Plasmamembranen aufgenommen wurden. Nach Bildaufnahme im TMA-DPH Kanal wurde, entsprechend der Antikörperfärbung, im GFP- oder Cy3-Kanal ein weiteres Bild gemacht.

Analyse von *Membrane Sheet* Bildern

Die Auswertung der aufgenommenen *Membrane Sheet*-Bilder wurde mit der Bildanalysesoftware *ImageJ* durchgeführt. Anhand der Aufnahmen im TMA-DPH-Kanal wurden die *Membrane Sheets* ausgewählt, die für die Analyse verwendet werden sollten. Anhand der Lipidfärbung wurden Areale festgelegt und im entsprechenden Bereich des Bilds im Cy3-Kanal die Messung durchgeführt. So konnte einerseits sichergestellt werden, dass nur intakte *Membrane Sheets* für die Analyse berücksichtigt wurden und dass andererseits die Auswahl der Membranareale nicht unbewusst durch den Grad der Färbung im Cy3-Kanal beeinflusst wurde. Im Cy3-Kanal wurden dann der mittlere Grauwert, die Standardabweichung des Grauwerts, sowie die Größe und genaue Position des gemessenen Areals bestimmt. Zusätzlich wurde jeweils eine Hintergrundmessung neben dem analysierten *Membrane Sheet* durchgeführt. Pro Bild wurden jeweils maximal fünf *Membrane Sheets* aufgenommen und pro Experiment-Kondition mindestens 15 - 20 *Sheets*. Die Endauswertung der gemessenen Daten erfolgte mit Microsoft Excel. Hier wurden von den gemessenen mittleren Grauwerten zuerst die entsprechenden Hintergrundwerte abgezogen und dann aus allen Messungen einer Kondition der Mittelwert bestimmt. Die ermittelten Werte aus verschiedenen Experimenttagen wurden wiederum gemittelt und zusätzlich der Standardfehler bestimmt.

5.4.3 Total internal reflection (TIRF)-Mikroskopie

Für die TIRF-Mikroskopie wurde ein motorisiertes Olympus IX81 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit einem x 60 NA 1,49 Apochromat Objektiv in Verbindung mit variabel verwendbaren x 1,6 und x 2 oder x 4 Nachvergrößerungslinsen eingesetzt. Das Mikroskop war ausgestattet mit einer 16 Bit EMCCD Kamera (16 x 16 μm^2 Pixel Größe, ImagEM C9100-13, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). Für die Bildaufnahme wurde mit einem 488 nm Argon-Laser in Verbindung mit dem Olympus-Filtersatz U-MTIR488-HC belichtet. Die Mikroskop- und Lasereinstellung wurden mit Hilfe der *Cell^R* Software (Olympus, Hamburg, Deutschland) gesteuert.

Einzelmolekül Aufnahmen mit TIRF-Mikroskopie

Für die Mikroskopie von GFP-markierten Einzelmolekülen mussten die entsprechenden Proben zuerst stark ausgebleichen werden. Im Rahmen von Vorversuchen zeigte sich, dass die beste Bleichleistung bei maximaler Laserintensität im TIRF-Modus erzielt wurde. Für die Versuche wurden transfizierte Zellen zuerst - wie zuvor beschrieben - auf PLL beschichteten Deckgläsern kultiviert. Dann wurden *Membrane Sheets* erstellt und die Proben direkt in KGlu-Puffer mikroskopiert. Bei maximaler Laserintensität wurden Sequenzen von 500 Bildern in Intervallen von 0,084 Sek aufgenommen. Durch wiederholte Aufnahme von Bildsequenzen wurde die GFP-Fluoreszenz bis nahezu auf Hintergrundniveau ausgebleicht. Mit Hilfe des „SpotTracker 2D“- Plugins von *ImageJ* wurden dann in den aufgenommenen Sequenzen die Bewegungsverläufe einzelner Objekte analysiert. Anhand der Bewegung der Objekte über die Zeit, ist das *mean square displacement* (MSD) nach der folgenden Formel berechnet worden:

$$MSD = \langle r^2(t) \rangle = \left\langle \frac{1}{N} \sum_{i=0}^N (r_i(t) - r_i(0))^2 \right\rangle$$

Wobei **N** die Anzahl der gemessenen Einzelschritte; **t** die Zeitintervalle und $(r_i(t) - r_i(0))^2$ die quadrierte Distanz zwischen zwei gemessenen

Einzelschritten im Zeitintervall t ist (Ebeling 2004). Für die Berechnungen wurden jeweils 100 aufeinanderfolgende Bilder analysiert.

5.4.4 Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)-Analyse

Für die FRAP-Messungen wurde das konfokale Mikroskop *Olympus FluoView1000*, ausgerüstet mit einem UPLANSAPO x 60 NA 1,35 Objektiv, verwendet. Die zu untersuchenden Zellen wurden 24 - 48 Std vor der Analyse mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert. Die Messungen an intakten Zellen wurden in Ringerlösung und die Analysen von *Membrane Sheets* in KGlu-Puffer durchgeführt. Im Epifluoreszenz-Modus wurden transfizierte Zellen ausgewählt und auf die basale Membran fokussiert. Es wurden unterschiedliche Einstellungen für die Versuche mit den hIR-mEGFP-Konstrukten und für die Messungen mit dem Syntaxin1A-GFP-Vektor verwendet. Für die Analysen mit dem hIR wurde eine Pixelgröße von 207 nm, die 488 nm Laser-Linie auf 0,5 % Leistung und ein Bleichareal von 4,1 x 4,1 μm^2 eingestellt. Die Bildaufnahmen erfolgten hier mit 0,2 Hz. Die Messungen an Syntaxin1A-GFP wurden bei einer Pixelgröße von 103 nm, 0,2 % Leistung des 488 nm Lasers, mit einem Bleichareal von 3 x 3 μm^2 und einer Bildrate von 0,5 Hz durchgeführt.

Für alle Messungen wurde jeweils eine Gesamtsequenz von 80 Bildern erstellt. Hierbei wurden zuerst drei Bilder aufgenommen und dann das zuvor festgelegte Areal in der basalen Plasmamembran der Zelle mit dem 405 nm Laser bei 100 % Intensität ausgebleicht. Danach wurden weitere 77 Bilder aufgenommen.

Für die spätere Analyse wurde neben der Bleichregion auch die Fluoreszenzentwicklung in zwei Kontrollregionen - in einem nicht geblichenen Bereich der basalen Membran und zusätzlich im Hintergrund außerhalb der Zelle - gemessen. Da es häufiger zu Fokusdrift oder dem Ausbleichen von Präparaten während der Aufnahmen kam, wurde eine Qualitätskontrolle für die Analyse eingeführt. Es wurden nur Messungen in

die Auswertung mit einbezogen, bei denen die mittlere Fluoreszenzintensität der letzten vier Werte im ungebleichten Bereich der basalen Membran nicht um mehr als 15 % von der mittleren Fluoreszenzintensität der drei Anfangswerte abwich.

Für die weitere Analyse wurden die Daten zuerst in *Microsoft Excel* zusammengefasst und dabei der jeweilige Hintergrundwert von jedem Messwert abgezogen.

Die Ergebnisse wurden dann jeweils mit Hilfe von *OriginPro 8G* mit folgender Hyperbola-Formel aus Ficz 2005a gefittet:

$$y(t) = y_0 + \text{Rec}_{\text{Max}} \times t / (T_{1/2} + t)$$

- wobei $T_{1/2}$ die Halbwertszeit der zurückkehrenden Fluoreszenz, y_0 den y-Achsenabschnitt und Rec_{Max} den Maximalwert des zurückkehrenden Fluoreszenzsignals aus dem hyperbolischen Fit angibt. Die beiden Werte $T_{1/2}$ und Rec_{Max} können verwendet werden, um die Dynamik des analysierten Membranproteins genauer zu charakterisieren. Ein niedriger $T_{1/2}$ Wert spricht für eine hohe Mobilität des Proteins in der Membran. Ohne weitere Angaben, kann mit Hilfe von $T_{1/2}$ keine absolute Diffusionsgeschwindigkeit von Objekten in der Membran ermittelt werden, ein relativer Vergleich unterschiedlicher Messungen zueinander ist jedoch möglich. Der Wert Rec_{Max} dagegen entspricht dem Anteil mobiler Membranproteine in der gemessenen Probe (Reits und Neefjes 2001). Durch die Berechnung dieser Größe können somit Aussagen über das Verhältnis zwischen stationären und mobilen Proteinen in der Membran gemacht werden. Aus den an verschiedenen Tagen ermittelten Werten wurden Mittelwert und Standardfehler bestimmt.

Der ermittelte Wert $T_{1/2}$ wurde weiter für die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten verwendet. Der Diffusionskoeffizient wurde nach folgender Formel aus Ficz 2005a berechnet:

$$D = (w^2 / 4 \times T_{1/2}) \times \gamma_D$$

- wobei D der Diffusionskoeffizient, w der Radius der geblichenen Region, γ_D der Korrekturfaktor für die Form der Bleichregion und $T_{1/2}$ die zuvor ermittelte Halbwertszeit der zurückkehrenden Fluoreszenz ist. Der Korrekturfaktor γ_D , der benötigt wird, um die ursprünglich für eine runde Bleichregion entworfene Formel an eine quadratische Bleichregion anzupassen, wurde Ficz 2005b entnommen.

6 Ergebnisse

6.1 Einfluss intrazellulärer und extrazellulärer Interaktionspartner auf die Organisation des humanen Insulinrezeptors

Es wurde früheren Studien gezeigt, dass der humane Insulinrezeptor (hIR) in Clustern in der Plasmamembran organisiert ist (Uhles et al. 2003; Kabayama et al. 2007) und dass der Cluster-Prozess auch eine medizinische Relevanz besitzt (Inokuchi 2007; Kabayama et al. 2007). Der dem Clustern zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch unbekannt. Im Rahmen dieser Dissertation wurde deshalb der Einfluss unterschiedlicher Bindungspartner auf die Dynamik und die Anordnung des hIRs analysiert. Systematisch wurden hierbei zuerst die Wechselwirkung mit möglichen intrazellulären Bindungspartnern und dann die Rolle potentieller Einflüsse aus dem extrazellulären Bereich untersucht.

6.1.1 Intrazelluläre Bindungspartner des hIRs

Vergleich der Mobilität des hIRs in *Membrane Sheets* und in Membranen lebender Zellen

Für die Untersuchungen am hIR wurden HepG2-Zellen verwendet. Diese Zelllinie ist ausgewählt worden, da sie den Insulinrezeptor stärker als Zellen vieler anderer Gewebetypen exprimieren (Podskalny et al. 1985). Potentiell sind hier auch Interaktionspartner des Rezeptors vermehrt endogen vorhanden.

Um festzustellen, ob zytoplasmatische Faktoren die Organisation des hIRs in der Plasmamembran beeinflussen, wurde die Mobilität des Rezeptors in Membranen gemessen. Eine Änderung in der Organisation des Rezeptors sollte indirekt auch durch eine veränderte Dynamik des Proteins in der Membran zu erkennen sein. Insbesondere ein Einfluss auf das Clusterverhalten des hIRs sollte sich auch in der mittleren

Diffusionsgeschwindigkeit in der Membran widerspiegeln. Die Dynamik des Rezeptors in der Membran lässt sich methodisch einfach durch FRAP-Messungen ermitteln. FRAP –Analysen wurden sowohl an intakten Zellen, als auch mit *Membrane Sheet*-Präparationen durchgeführt. Die Verwendung von *Membrane Sheets* ermöglichte es, Messungen in Abwesenheit sämtlicher zytosolischer Elemente durchzuführen und damit mögliche Wechselwirkungen dieser Faktoren mit dem untersuchten Rezeptor zu unterbinden. Für den Versuch wurde die Wildtyp-GFP-Variante des hIRs in HepG2-Zellen überexprimiert und aus den transfizierten Zellen *Membrane Sheets* generiert. Vergleichende FRAP-Messungen wurden dann sowohl an intakten Zellen, als auch an *Membrane Sheets* durchgeführt. Für die FRAP-Untersuchungen wurde, wie in Abschnitt 5.4.4 näher beschrieben, ein definiertes Areal in der basalen Membran der jeweiligen Zellen ausgeblendet. Danach wurde die - durch die Diffusion der fluoreszierenden Membranproteine - in den geblichenen Bereich zurückkehrende Fluoreszenz über einige Minuten hinweg beobachtet. Aus diesen Aufnahmen konnten verschiedene Mobilitätsparameter ermittelt werden. Berechnet wurde der extrapolierte Maximalwert der zurückkehrenden Fluoreszenz sowie der Zeitpunkt, an dem der halbmaximale Wert der zurückkehrenden Fluoreszenz erreicht war. Die ermittelten Größen ermöglichten den Vergleich der Proteinmobilität in der Membran bei Abwesenheit intrazellulärer Interaktionspartner.

Die ermittelten Mobilitätsparameter zeigten eine fast identische Dynamik des hIRs in den beiden getesteten Konditionen (Abbildung 13). Neben der berechneten Halbwertszeit der zurückkehrenden Fluoreszenz ($T_{1/2}$; Zellen: 48,0 s +/- 16,6 s (SEM), *Membrane Sheets*: 45,0 s +/- 16,2 s (SEM)) war auch der Anteil der mobilen Fraktionen der Proteine - beschrieben durch den maximal erreichbaren Fluoreszenzwert - unter beiden Bedingungen ähnlich (Rec_{Max} ; Zellen: 73,9 % +/- 3,1 % (SEM), *Membrane Sheets*: 66,2 % +/- 3,6 % (SEM)). Anhand dieser Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass die Mobilität des hIRs nicht durch zytosolische Faktoren beeinflusst wird, da die

Dynamik des und damit dessen Organisation Rezeptors sowohl in intakten Zellen - bei Anwesenheit des Zytosols - als auch in analysierten *Membrane Sheets* sehr ähnlich ist.

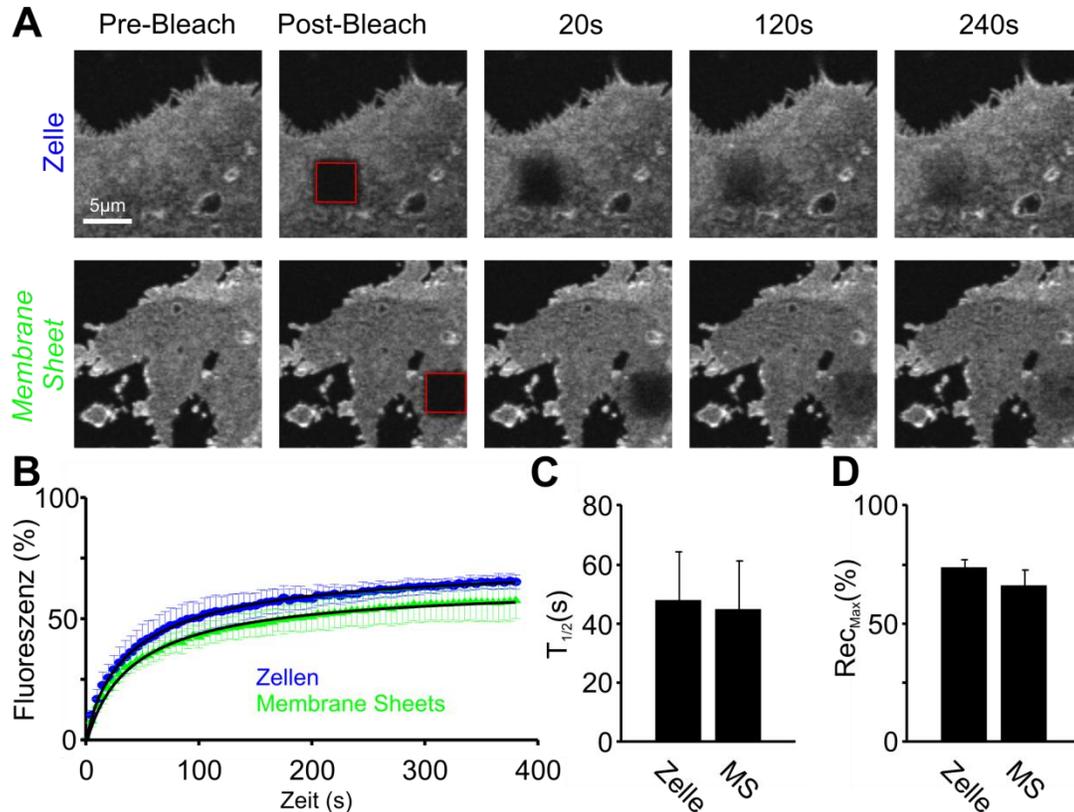


Abbildung 13 Vergleichbare Dynamik von Membranproteinen in intakten Zellen und zellfreien Membranpräparationen

Es wurden FRAP-Experimente an HepG2-Zellen durchgeführt, die den GFP-markierten hIR überexprimierten. Die Messungen wurden sowohl an intakten Zellen (A, oben) als auch an *Membrane Sheet*-Präparationen (A, unten) durchgeführt. Hierfür wurde die Fluoreszenz in der basalen Plasmamembran in einer quadratischen Region (rote Markierungen in A) ausgebleicht und das durch mobile Membranproteine bedingte Rückkehren der Fluoreszenz beobachtet. Aus drei unabhängigen Experimenten an jeweils 3-6 intakten Zellen und 3 *Membrane Sheets* wurde die rückkehrende Fluoreszenz gemittelt und Mittelwerte +/- SEM berechnet (B). Hieraus wurden - wie zuvor beschrieben (Methoden, Abschnitt 5.4.4) - die Halbwertszeit (C) und die maximal rückkehrende Fluoreszenz (D) der jeweiligen Bedingungen ermittelt. Für beide Versuchsanordnungen konnten sehr ähnliche Mobilitätsparameter des hIR-mEGFP-Konstrukts bestimmt werden.

Rolle der intrazellulären Domäne des hIRs

Da gezeigt werden konnte, dass Bestandteile des Zytoplasmas scheinbar keinen Einfluss auf die Dynamik des hIRs in der Plasmamembran haben,

wurde entschieden zu testen, ob grundsätzlich intra- oder extrazelluläre Domänen des Proteins bestimmend für die Membran-Mobilität sind. Hierfür wurden die Diffusions-Parameter unterschiedlicher Deletionsvarianten des hIRs mittels FRAP-Analysen mit der des Wildtyps verglichen. In einem ersten Schritt wurden Deletionskonstrukte des hIRs getestet, denen entweder der komplette extrazelluläre oder der gesamte intrazelluläre Anteil des Rezeptors fehlte. Wie in Abbildung 14 gezeigt, konnte bei FRAP-Messungen festgestellt werden, dass bei fehlenden extrazellulären Domänen des hIRs die laterale Diffusion des Proteins in der Membran deutlich erhöht wird, wie der Unterschied zwischen den berechneten Halbwertszeiten des zurückkehrenden Fluoreszenzsignals es verdeutlichte ($T_{1/2}$; Wildtyp: 28,0 s +/- 7,0 s (SEM); mit extrazellulärer Deletion: 4,2 s +/- 0,9 s (SEM)). Die Variante des hIRs bei der die intrazellulären Bereiche des Rezeptors deletiert wurden, wies dagegen eine ähnliche Mobilität wie der Wildtyp auf ($T_{1/2}$; mit intrazellulärer Deletion: 35,0 s +/- 7,1 s (SEM)). Zusätzlich wurde auch der mobile Anteil des Rezeptors nur bei einer Deletion des extrazellulären Bereichs verringert. Der hierfür errechnete Maximalwert der zurückkehrenden Fluoreszenz lag leicht unterhalb der anderen getesteten Konstrukte (Rec_{Max} ; Wildtyps: 87,8 % +/- 5,1 % (SEM), intrazellulär deletierte Variante: 83,8 % +/- 8,5 % (SEM), extrazellulär deletierte Version: 55,0 % +/- 7,2 % (SEM)). Dieser Unterschied könnte jedoch auch ein Analyseartefakt darstellen, da sich die gezeigten Werte auf extrapolierte Daten beziehen. Ein direkter Vergleich entsprechender Rohdaten zeigt eine nur sehr geringe Abweichung zwischen den jeweiligen Werten der unterschiedlichen Konstrukte. Die ermittelten Werte für die unterschiedlichen hIR-Varianten gaben deutliche Hinweise darauf, dass nicht der intrazelluläre Anteil, sondern Bereiche des extrazellulären Anteils des Rezeptors für das Diffusionsverhalten des hIRs von entscheidender Bedeutung sind. Diese Ergebnisse stehen auch im Einklang mit den Resultaten des vorherigen Experiments, bei dem gezeigt werden konnte, dass Interaktionen mit

potentiellen intrazellulären Bindungspartnern offensichtlich keinen Einfluss auf die Mobilität des Rezeptors in der Membran haben.

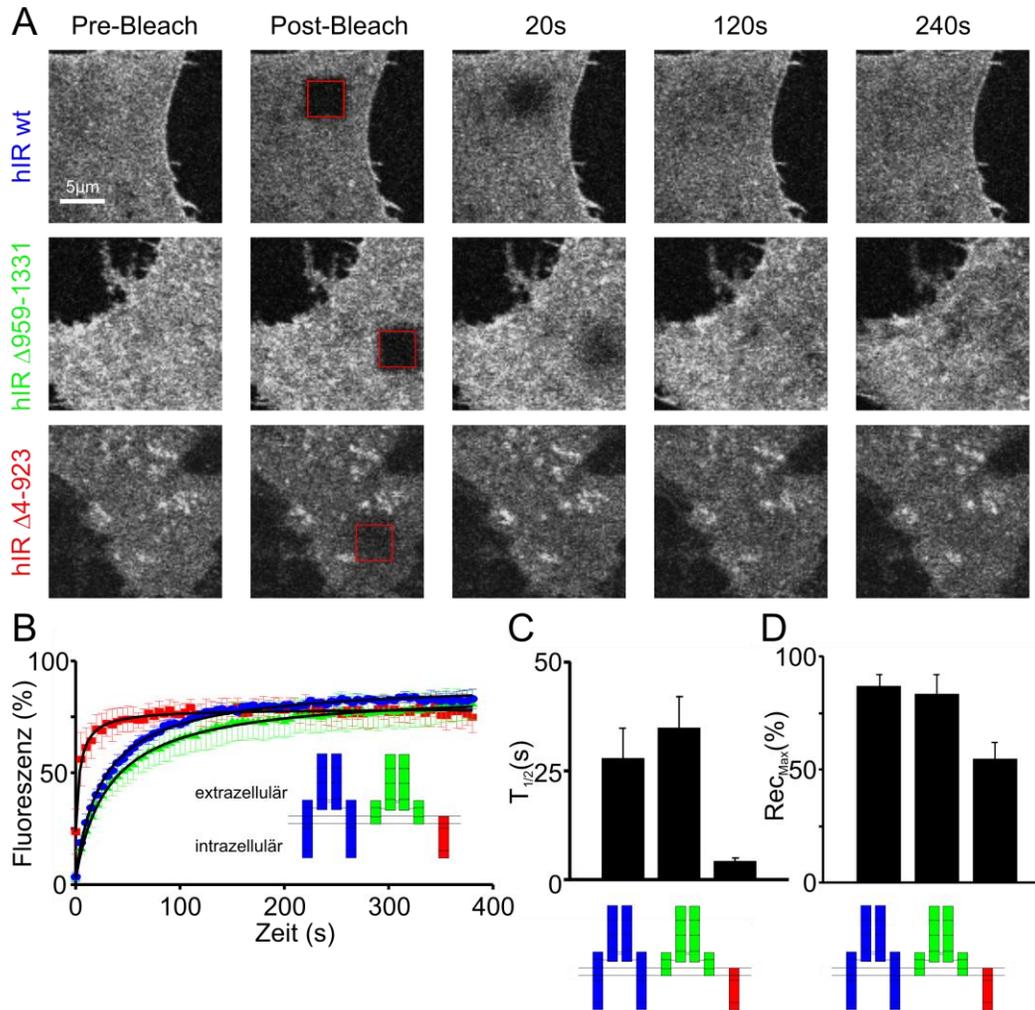


Abbildung 14 Die Deletion der intrazellulären Domänen des hIRs beeinflusst nicht die Diffusionsgeschwindigkeit des Rezeptors in der Plasmamembran

FRAP-Analysen an HepG2-Zellen, die verschiedene Deletionsvarianten des hIR-mEGFP-Konstrukts überexprimierten, zeigten eine verstärkte Mobilität des Proteins bei Deletion der extrazellulären Domänen des hIRs (A). Es konnte bei fehlendem extrazellulärem Anteil des hIRs beobachtet werden (A, unten), dass die Fluoreszenz deutlich schneller in das gebleichte Areal zurückkehrte, als bei überexprimiertem Wildtyp-Konstrukt (A, oben und B). Dies spiegelte sich auch in der berechneten Halbwertszeit der zurückkehrenden Fluoreszenz wider, welche deutlich unter der des Wildtyp-Konstrukts lag (C). Auch der ermittelte Maximalwert für die zurückkehrende Fluoreszenz (D) war etwas geringer als der Wert für die nicht-deletierte Variante des hIR. Die Deletion der intrazellulären Domänen des hIRs (A, mitte) schien dagegen kaum Einfluss auf die verschiedenen Mobilitätsparameter zu haben. Für eine detaillierte Beschreibung der FRAP-Methodik siehe Abbildung 13 und Methoden, Abschnitt 5.4.4. Die dargestellten Daten (B, C und D) wurden in drei unabhängigen Experimenten mit 3-7 Zellen pro Versuchstag und Kondition ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM.

6.1.2 Extrazelluläre Bindungspartner

Durch die bisherigen Versuche konnte ausgeschlossen werden, dass die Mobilität des hIRs durch Interaktionen mit Bestandteilen aus dem Inneren der Zelle beeinflusst wird. Weder Entfernen des Zytoplasmas, noch das Unterbinden von Wechselwirkungen durch die Deletion intrazellulärer Rezeptordomänen, konnte das Diffusionsverhalten des Proteins in der Membran ändern. Zusätzlich haben die Ergebnisse gezeigt, dass der extrazelluläre Teil des hIRs maßgeblich an Interaktionen beteiligt ist, die sich entscheidend auf die Diffusion des Rezeptors in der Membran auswirken (Abbildung 14). In den folgenden Experimenten sollte deshalb der Einfluss von Bindungspartnern aus dem Extrazellulärbereich auf die Mobilität des Rezeptors in der Zellmembran näher charakterisiert werden. Zusätzlich sollte auch der extrazelluläre Anteil des hIRs, der an möglichen Interaktionen beteiligt ist, genauer identifiziert werden.

Dynamik des hIRs in der Membran nach Insulin-Stimulation

Um zu untersuchen, ob sich die Bindung des Liganden an den hIR auf die Mobilität des Proteins in der Plasmamembran auswirkt, wurden Zellen, die eine GFP-markierte Variante des hIRs exprimierten, mit Insulin inkubiert. Sowohl vor der Inkubation, als auch 1 und 10 min nach Insulinbehandlung wurden FRAP-Analysen an den Zellen durchgeführt. Wie in Abbildung 15 gezeigt, konnte eine ähnliche Dynamik des hIRs in unstimulierten oder mit Insulin behandelten Zellen beobachtet werden. Weder die berechnete Halbwertszeit der zurückkehrenden Fluoreszenz (Kontrolle: 59,9 s \pm 12,2 s (SEM), Insulinstimulation; 1 min: 64,8 s \pm 7,4 s (SEM), 10 min: 70,6 s \pm 9,0 s (SEM) noch der theoretische Maximalwert für die wiederkehrende Fluoreszenz (Kontrolle: 68,1 % \pm 7,7 % (SEM), Insulinstimulation; 1min: 65,8 % \pm 9,6 % (SEM), 10 min: 71,2 % \pm 6,2 % (SEM)) ergaben deutliche Unterschiede zwischen Kontroll- und Stimulationsbedingungen. Es scheinen also weder die direkte Liganden-Bindung an den extrazellulären Teil des

hIRs, noch eine nachfolgende potentielle Rekrutierung von intrazellulären Interaktionspartnern eine Auswirkung auf die Mobilität des hIRs in der Membran zu haben.

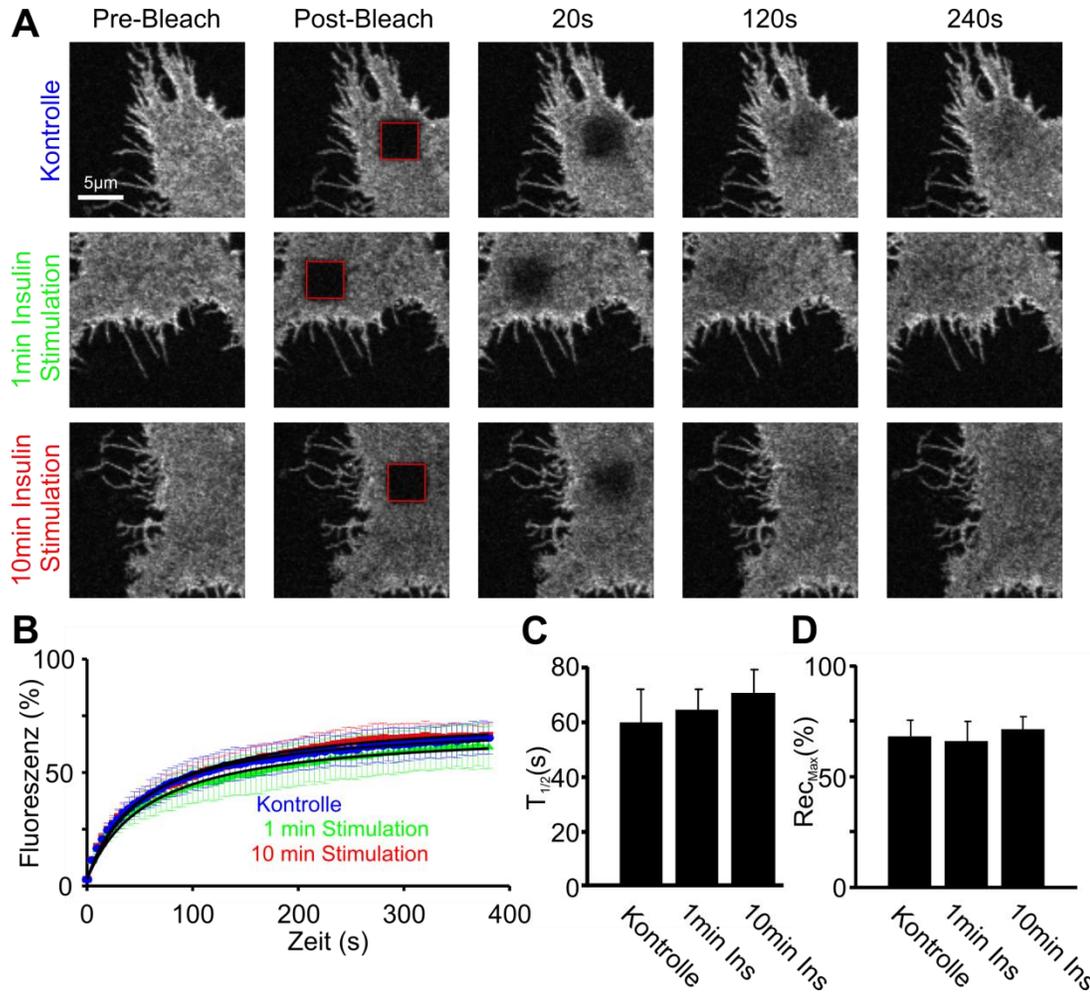


Abbildung 15 Bindung von Insulin hat keinen Einfluss auf die Diffusionsfähigkeit des hIRs

Die Mobilität des Wildtyp-hIR-mEGFP-Konstrukts wurde in HepG2-Zellen mittels FRAP-Messung an unbehandelten Kontrollen (A, oben), nach Stimulation mit Insulin nach 1 min (A, mitte) und nach 10 min (A, unten) analysiert. Aus dem dargestellten Verlauf der Fluoreszenzrückkehr (B) wurden die Halbwertszeiten (C, „ $T_{1/2}$ “) und die maximale rückkehrende Fluoreszenz (D, „ Rec_{Max} “) ermittelt (genauere Beschreibung siehe Abbildung 13 oder Methoden, Abschnitt 5.4.4). Aus drei unabhängigen Experimenten - mit jeweils 3-6 gemessenen Zellen pro Kondition - wurden die Mittelwerte mit \pm SEM bestimmt. Weder eine kurzfristige noch eine längere Stimulation mit Insulin scheint die Mobilität des Rezeptors in der Membran zu ändern.

Stimulationsbedingte Internalisierung des hIRs

Die Stimulation des hIRs mit Insulin zeigte keinerlei Auswirkung auf die Dynamik des Proteins in der Membran. Dieses Ergebnis war unerwartet, da die Bindung von Insulin an den Rezeptor zu einer Konformationsänderung der Proteinstruktur führt (Kiselyov et al. 2009; Whitten et al. 2009) und zusätzlich zu vielfältigen Wechselwirkungen mit intrazellulären Interaktionspartnern (Schmelzle et al. 2006). Diese Prozesse könnten jeweils zu einer Änderung der Organisation und damit auch zu Änderungen im Diffusionsverhalten des hIRs in der Membran führen. Dies war jedoch nicht nachweisbar. Um sicherzustellen, dass sich das verwendete Insulin auch funktionell auf den Rezeptor auswirkt, ist untersucht worden, ob es zu einer stimulationsbedingten Internalisierung des hIRs bei behandelten Zellen kommt. Für die Quantifizierung dieses Endozytose-Prozesses wurden *Membrane Sheets* von zuvor stimulierten Zellen erstellt und der hIR mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper angefärbt. Hierbei wurden Antikörper verwendet, die jeweils gegen ein intrazelluläres (Abbildung 16; A, B) und ein extrazelluläres (Abbildung 16; C, D) Epitop des Rezeptors gerichtet waren. Nach Insulin-Behandlung zeigte sich jedoch nur bei intrazellulärer Markierung des hIRs ein Rückgang der Fluoreszenzintensität auf 57,9 % +/- 4,4 % (SEM), wobei die Intensität der Färbung gegen den extrazellulären Teil des hIRs kaum Änderungen zu unstimulierter Kontrolle zeigte. Es kam dagegen zu einem geringen Anstieg der gemessenen Fluoreszenzintensität auf 113,9 % +/- 10,8 % (SEM).

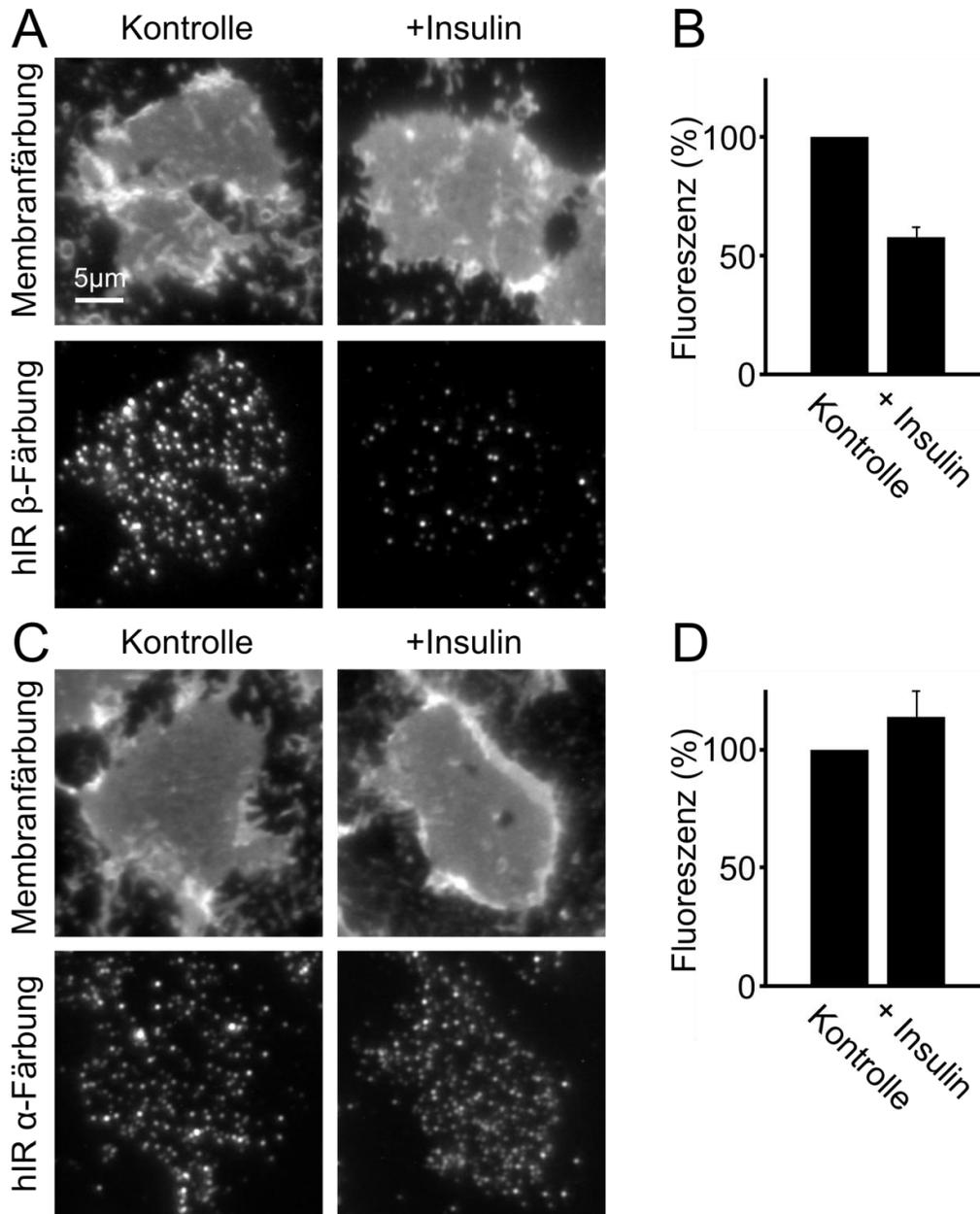


Abbildung 16 Einfluss von Insulin-Stimulation auf die Endozytose des humanen Insulinrezeptors

HepG2-Zellen wurden für 15 min bei 37 °C mit Insulin inkubiert, anschließend wurden *Membrane Sheets* generiert und immunhistochemisch gegen- entweder einen extrazellulären Bereich der α -Kette (A und B) oder gegen ein intrazelluläres Epitop in der β -Kette (C und D) des hIRs - angefärbt. Nur die intrazelluläre Anfärbung zeigte nach Stimulation einen Rückgang der Fluoreszenzintensität. Die Immunanfärbung des extrazellulären Anteiles des hIRs zeigte keinen Unterschied zu nicht stimulierten Kontrollen. In A und B sind jeweils in der ersten Reihe zusätzlich Lipidanfärbungen der jeweiligen *Membrane Sheets* gezeigt. (B und D) Quantifizierung der relativen Immunanfärbungsintensität nach Insulin-Stimulation - normalisiert auf Kontrollbedingungen. Angegeben sind die Mittelwerte von $n = 3$ (B) und $n = 5$ (D) \pm SEM. Für die Analyse wurden 18 - 50 Sheets pro Versuchstag und Kondition mit einbezogen.

Etablierung des Membrane Sheet-Systems als Methode zur Messung der stimulationsabhängigen Internalisierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen

Da die hIR-Anfärbung auf *Membrane Sheets* nach Insulin-Stimulation zum Teil widersprüchliche Ergebnisse ergab, wurde getestet, ob sich diese Methode grundsätzlich für die Analyse von Endozytose-Prozessen von Rezeptoren in der Membran eignet. Zu diesem Zweck wurden sowohl der Her2- und Her3-Rezeptor als auch der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) untersucht. Diese Proteine gehören wie der hIR zur Familie der membrangebundenen Tyrosinkinasen. Hierdurch sollte belegt werden, dass die *Membrane Sheet*-Technik für die Analyse der stimulationsbedingten Internalisierung des hIRs grundsätzlich anwendbar ist.

Die Untersuchung der Internalisierung des Her2- und des Her3-Rezeptors wurde nach Heregulin-Stimulation an *Membrane Sheets* von SkBr3-Zellen durchgeführt. SkBr3-Zellen exprimieren neben dem Her3- auch verstärkt den Her2-Rezeptor (Wu et al. 2003) und wurden deshalb als Grundlage für die Versuche verwendet.

Nach Stimulation der Zellen mit Heregulin wurden *Membrane Sheets* erstellt und die Fluoreszenzintensität der Immunanfärbungen gegen den Her2- und den Her3-Rezeptor quantifiziert. Ein Vergleich mit nicht stimulierten Kontrollen zeigte, dass nach Stimulation nur noch ein Anteil von 45,3 % +/- 6,8 % (SEM) der Fluoreszenzfärbung gegen den Her3-Rezeptor zu detektieren war. Dagegen war der Effekt der Stimulation auf die gemessene Her2-Rezeptor-Immunfluoreszenz deutlich geringer. Normalisiert auf die Kontrollkondition, wurde nur eine Verringerung auf 76,3 % +/- 12,1 % (SEM) der Fluoreszenzintensität beobachtet (Abbildung 17).

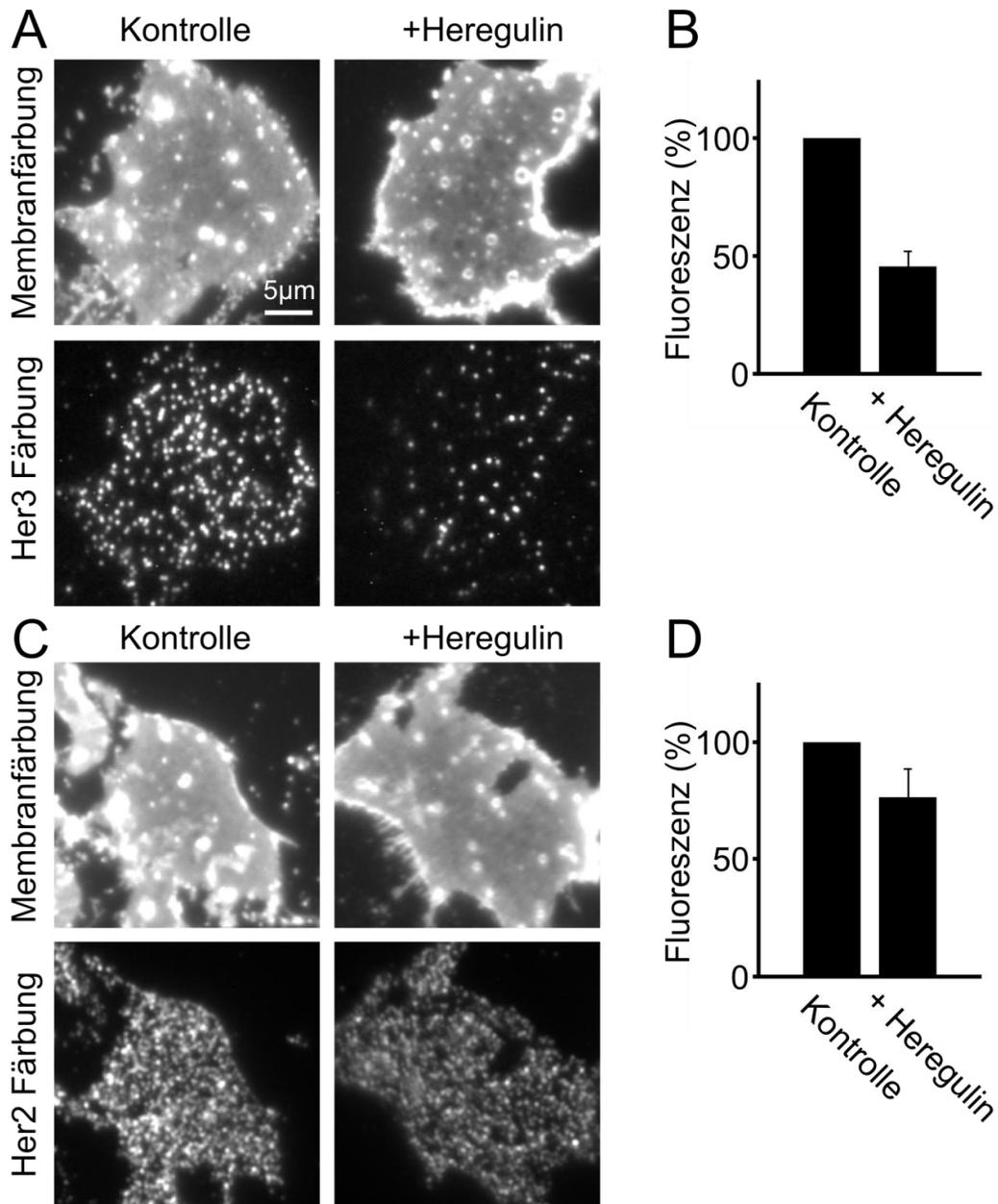


Abbildung 17 Heregulinstimulation verringert sowohl die Konzentration von Her3- als auch von Her2-Rezeptorproteinen an der Plasmamembran

Nach Stimulation von SkBr3-Zellen für 5 min bei 37 °C mit Heregulin wurden *Membrane Sheets* erstellt und gegen Her3 (A und B) oder Her2 (C und D) angefärbt. Beide Her-Varianten zeigten nach Heregulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen einen Rückgang in der Intensität der Immunanfärbung. In A und C sind jeweils oben Lipidfärbungen der untersuchten *Membrane Sheets* gezeigt. Die relative Fluoreszenzänderung der Immunanfärbung der Proben nach Stimulation wurde ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei (B) bzw. vier (D) unabhängigen Versuchstagen, wobei 22-44 *Sheets* pro Tag und Kondition analysiert wurden.

Um zu ermitteln, ob ein Internalisierungseffekt auch bei stimulierten EGF-Rezeptoren zu beobachten ist, wurden H460-Zellen mit EGF behandelt und die Intensität der Fluoreszenzfärbung mit der von nicht behandelten Zellen verglichen. Die Zelllinie H460 exprimiert den EGF-Rezeptor endogen (Simonetti et al. 2010) und kann deshalb gut als Testsystem für die Internalisierung des Rezeptorproteins verwendet werden.

Für die Auswertung wurden sowohl die Färbung gegen ein intrazelluläres als auch gegen ein extrazelluläres Epitop des EGF-Rezeptors auf *Membrane Sheets* quantifiziert. Hierbei konnte bei beiden Detektionsvarianten des Rezeptors festgestellt werden, dass - im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollen - nur noch etwa die Hälfte der Fluoreszenzintensität zu messen war. Die Färbung gegen die intrazelluläre Region zeigte eine Verringerung auf 55,5 % +/- 9,9 % (SEM) und die gegen den extrazellulären Anteil des EGF-Rezeptors gerichtete Färbung eine Abnahme auf 40,2 % +/- 9,5 % (SEM). Die in Abbildung 18 für den EGF-Rezeptor ermittelten Daten wurden teilweise auch in der Veröffentlichung (Bill et al. 2010) gezeigt.

In den vorausgegangenen Experimenten konnte bewiesen werden, dass die Internalisierung verschiedener Rezeptortypen mit Hilfe von Immunanfärbungen an *Membrane Sheets* nachvollzogen werden kann. Dies ist auch ein Indiz dafür, dass die Stimulation der Zellen mit Insulin erfolgreich war und die Ergebnisse, die im Rahmen der vorhergegangenen FRAP-Messungen (Abbildung 15) erzielt wurden, zuverlässig sind.

Die bei der Analyse des hIRs aufgetretenen widersprüchlichen Aussagen (Abbildung 16 B und D) schienen also nicht auf der grundsätzlichen Methodik zu beruhen, sondern deuten im speziellen Fall des verwendeten Antikörpers auf einen limitierten Zugang gegen das entsprechende Epitop des hIRs hin (Abbildung 16 D).

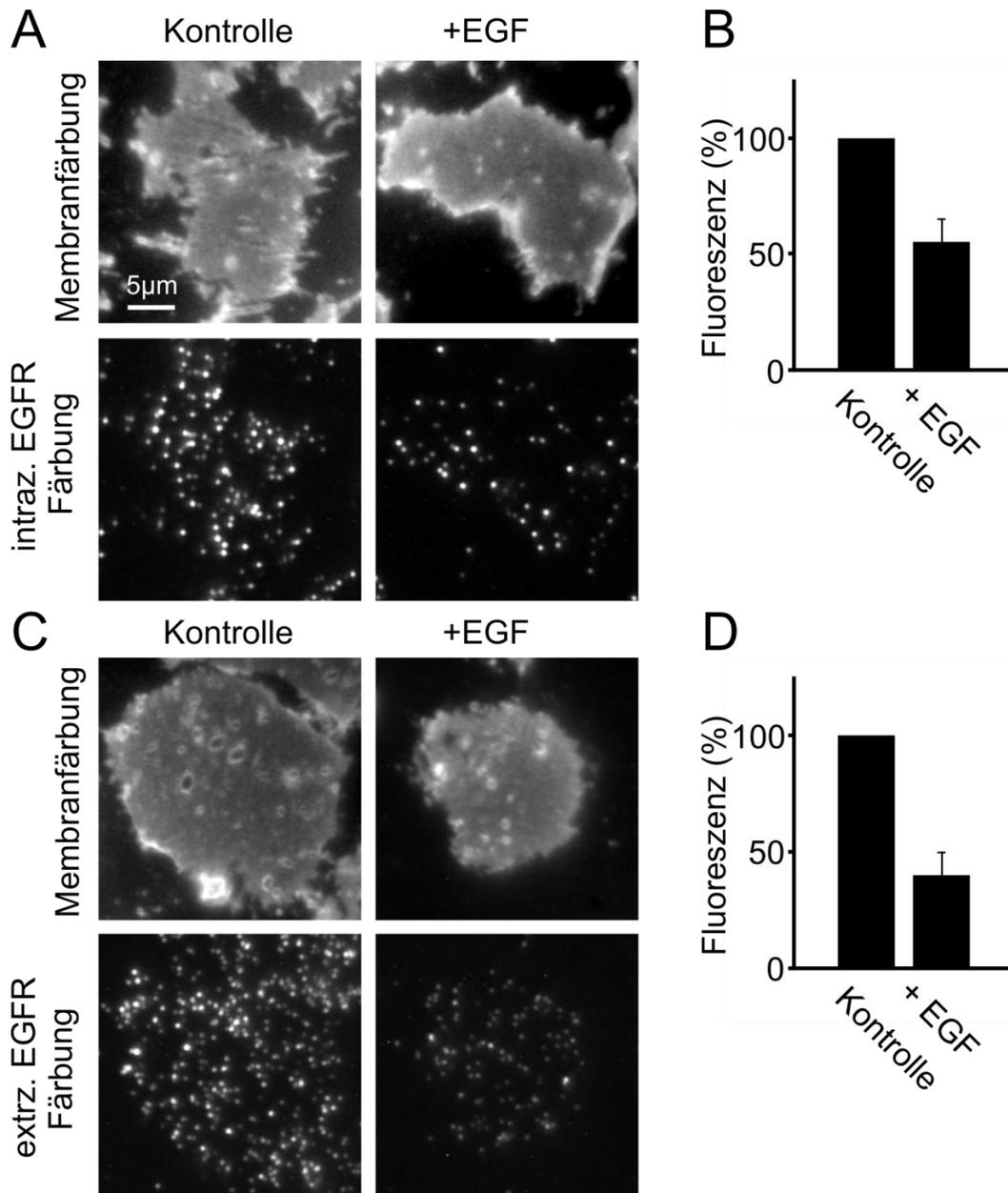


Abbildung 18 Nach Stimulation mit epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) werden weniger EGF-Rezeptoren an der basalen Plasmamembran detektiert

Gezeigt sind *Membrane Sheet*-Färbungen gegen ein intrazelluläres (A und B) oder ein extrazelluläres Epitop (C und D) des EGFR der H460-Zellen. Beide Varianten zeigen nach einer Vorbehandlung der Zellen mit EGF (5 min bei 37 °C) eine schwächere Anfärbung des EGFR. (A und C), oben, Lipidfärbungen der *Membrane Sheets*. Der relative Rückgang im Vergleich zu Kontrollkonditionen ist in B und D angegeben. Hierfür wurden die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchstagen +/- SEM ermittelt (B, D). Pro Versuchstag und Kondition wurden 24-66 *Membrane Sheets* mit in die Messungen einbezogen. Die Abbildung ist teilweise Bill et al. 2010 entnommen und wurde modifiziert.

Verlässlichkeit der hIR-Antikörperfärbung

Im Rahmen der vorausgegangenen Versuche ist deutlich geworden, dass es Probleme mit den verwendeten Antikörpern gegen den hIR gibt. Um die Qualität und Spezifität der verwendeten Antikörper genauer zu untersuchen, wurden *Membrane Sheets* von Zellen, die eine GFP-markierte Variante des hIRs überexprimierten, mit den verschiedenen Antikörpern - gerichtet gegen den hIR – angefärbt. Bei einer Bindung des verwendeten Antikörpers an den in den Zellen überexprimierten hIR sollte es zu einer deutlichen Überlagerung des roten Antikörpersignals mit dem grünen Signal des an den hIR gekoppelten GFPs kommen. Zusätzlich sollten auch *Membrane Sheets* von Zellen, die das hIR-GFP-Protein überexprimieren, deutlich stärker durch den Antikörper angefärbt werden, als nicht-transfizierte Zellen. Ein Vergleich der im roten Kanal erscheinenden Fluoreszenzfärbung mit dem GFP-Signal des überexprimierten hIRs zeigte jedoch eine geringe oder nur teilweise Kollokalisierung der Fluoreszenzen (Abbildung 19; rechte Spalte). Der gegen den extrazellulären Teil des hIRs gerichtete Antikörper (Abbildung 19, A) erkannte scheinbar nur einen geringen Prozentsatz des überexprimierten Rezeptors. Selbst in *Membrane Sheets* von Zellen, in denen hIR-GFP stark exprimiert wurde, konnte nur ein geringer Anstieg in der Intensität der Antikörperfluoreszenz beobachtet werden. Ein größerer Anteil wurde offensichtlich durch den Antikörper erkannt, der ein intrazelluläres Epitop des hIRs detektiert. Jedoch wurde auch hier nur eine Subpopulation erfasst (Abbildung 19; B). Um für weitere Versuche auf andere Antikörper ausweichen zu können wurden verschiedene andere kommerziell erhältliche Antikörper auf die gleiche Art und Weise getestet. Auch diese zeigten jedoch für die Immunfluoreszenzfärbung des hIRs keine besseren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Alle verwendeten Antikörper sind im Material- und Methodenteil aufgeführt.

Da nur Subpopulationen des Proteins nachgewiesen werden können, eignen sich Antikörperfärbungen nicht als Grundlage für eine genaue Analyse der lateralen Verteilung des hIRs in der Membran. Es wurde deshalb

entschieden, in weiteren Untersuchungen am hIR nur noch mit GFP-markierten Varianten des Rezeptors zu arbeiten und darauf zu vertrauen, dass diese ähnliche Charakteristiken aufweisen, wie der endogen vorkommende Rezeptor. Trotz der aufgetretenen Probleme scheint der Antikörper gegen intrazelluläre Domänen des hIRs die Abnahme des Rezeptors in der Zellmembran nach Stimulation zu erfassen (siehe Abbildung 16 A und B). Für eine relative Quantifizierung des Internalisierungseffekts scheint der Antikörper demzufolge geeignet, wenngleich nur ein kleiner – vermutlich aber repräsentativer - Teil der hIR-Proteine bei der Immunanfärbung erkannt wird.

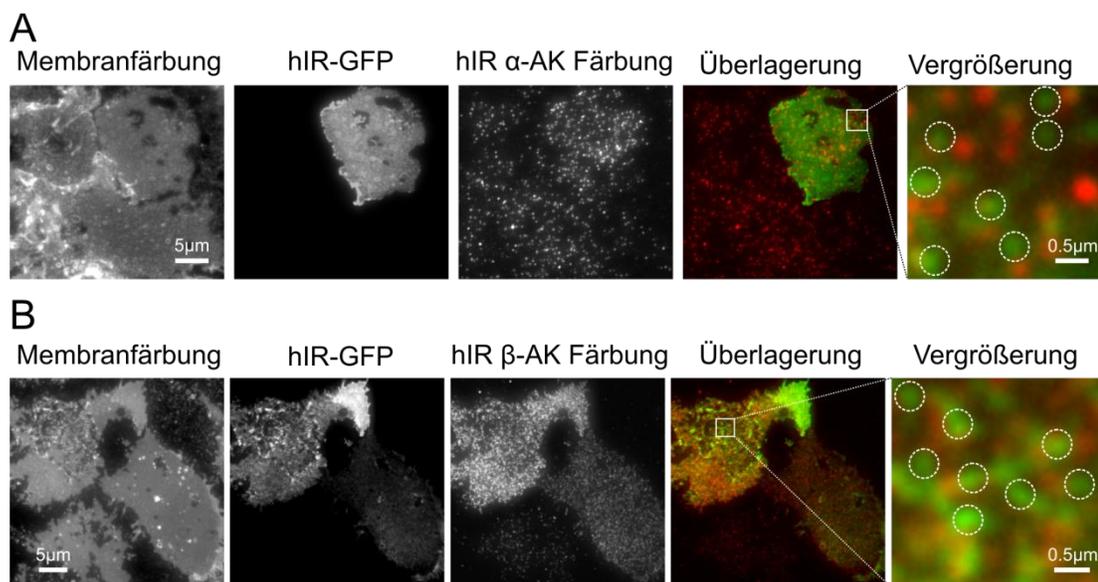


Abbildung 19 Verwendete hIR-Antikörper zeigen unzuverlässige Spezifität

In HepG2-Zellen wurde Wildtyp hIR-mEGFP überexprimiert und *Membrane Sheets* der Zellen immunhistochemisch gefärbt. Links ist eine Lipidfärbung der untersuchten Membranpräparationen gezeigt. Überlagerung von GFP-Signalen und Antikörperfärbung gegen den extrazellulären (A) oder gegen den intrazellulären (B) Anteil des hIRs zeigten kaum (A) oder nur geringe (B) Übereinstimmung beider Fluoreszenzkanäle. Vergrößerungen (rechts) zeigen, dass der im grünen Kanal erscheinende überexprimierte hIR-mEGFP (Kreise) nicht durch die verwendeten Antikörper (roter Kanal) erkannt wird.

Interaktionen mit der Glykokalix

Da der hIR eine Vielzahl von Glykosylierungsstellen aufweist (de Meyts und Whittaker 2002), wurde getestet, ob die Wechselwirkungen mit der Glykokalix einen Einfluss auf die Beweglichkeit des Rezeptors in der Membran haben. Zu diesem Zweck wurden - wie in Abbildung 15 - FRAP-Studien an Zellen durchgeführt, die eine hIR-Variante mit gekoppeltem EGFP exprimierten. Neben unbehandelten Zellen wurde auch eine Kondition analysiert, bei der die Zellen zuvor mit einer Mischung unterschiedlicher Glykokalix-abbauenden Enzyme behandelt worden waren (siehe Abschnitt 5.3.7). Die Wirksamkeit der Enzymmischung wurde an einem Versuchstag parallel zur FRAP-Analyse getestet. Hierfür wurden Zellen mit den Enzymen behandelt und mit fluoreszenzmarkiertem WGA angefärbt (siehe Abschnitt 5.3.10). WGA bindet an bestimmte Anteile der Glykokalix von Zellmembranen (Chazotte 2011). Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen konnte eine geringe Bindung von WGA an Zellen gemessen werden, die zuvor mit dem Enzymmix inkubiert worden waren. Wie in Abbildung 20 zu sehen, konnte bei behandelten Zellen eine auf 64,7 % +/- 27 % (SD) verringerte Fluoreszenzintensität der WGA-Färbung detektiert werden. Dies war ein Indiz für einen teilweisen Abbau der Glykokalix durch die verwendeten Enzyme.

Ein Unterschied im Rahmen der analysierten Dynamikparameter konnte zwischen den untersuchten Bedingungen nicht festgestellt werden (Abbildung 20). Sowohl die berechnete Halbwertszeit der rückkehrenden Fluoreszenz (Kontrolle: 17,6 s +/- 3,8 s (SEM), nach Enzyminkubation: 16,9 s +/- 1,1 s (SEM)), als auch die maximal zurückkehrende Fluoreszenz (Kontrolle: 89,4 % +/- 4,0 % (SEM), nach Enzymbehandlung: 87,5 % +/- 2,1 % (SEM)) waren mit und ohne Abbau der Glykokalix vergleichbar.

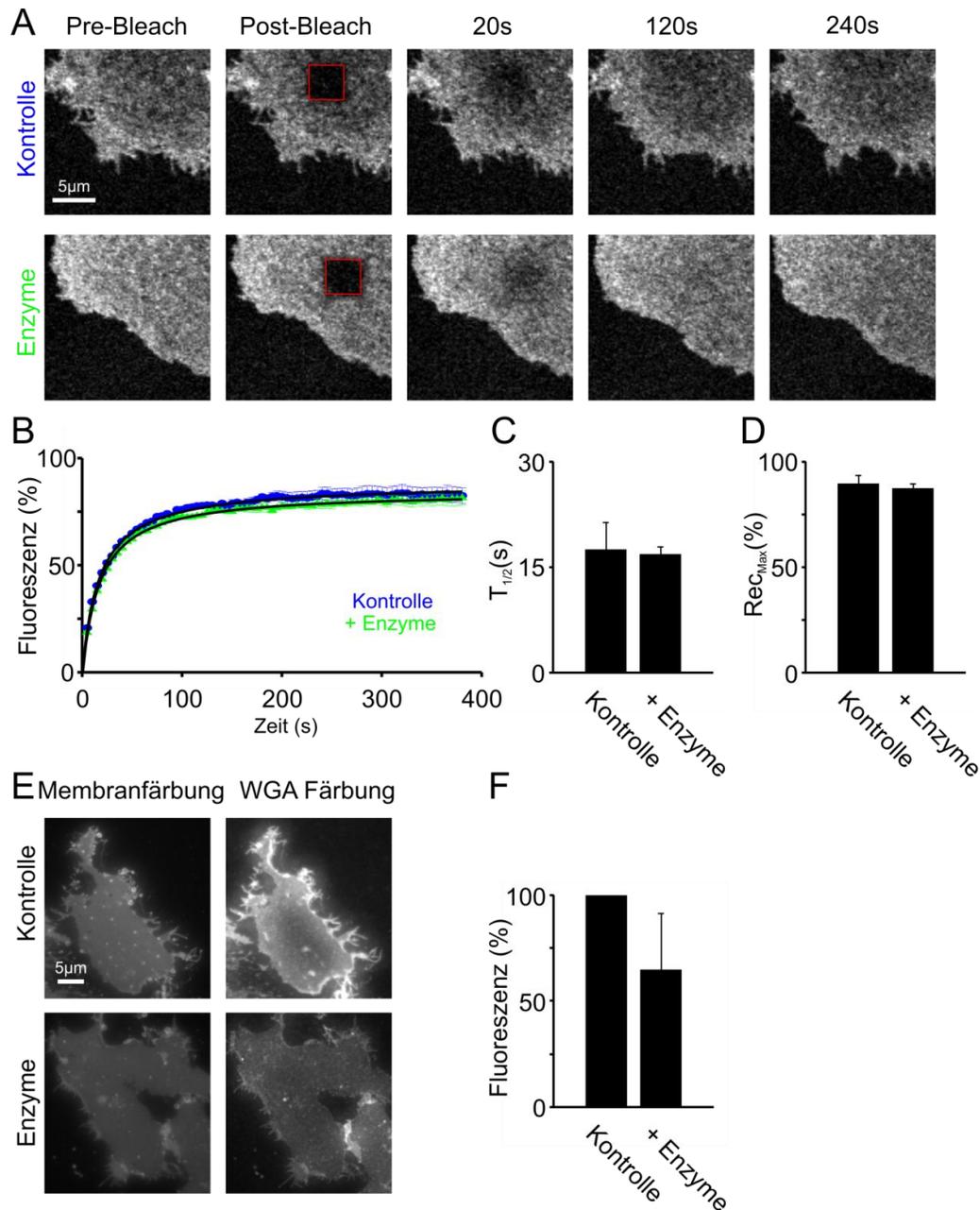


Abbildung 20 Die Diffusion des hIRs in der Membran wird nicht durch die Glykokalix beeinflusst

HepG2-Zellen, die Wildtyp-hIR-mEGFP überexprimierten, wurden mit einer Mischung Glykokalix-abbauender Enzyme (Neuramidase, PNGase und Galactosidase) behandelt. Vergleichende FRAP-Studien (vergl. Abbildung 15) an unbehandelten Kontrollen (A, oben) und an Zellen mit Vorbehandlung (A, unten) zeigten keine Unterschiede in der Mobilität der hIR Proteine (B). Weder die berechnete Halbwertszeit der zurückkehrenden Fluoreszenz (C), noch die ermittelte maximale rückkehrende Fluoreszenz (D) scheinen durch die Behandlung beeinflusst (Berechnung beschrieben in Abschnitt 5.4.4). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchstagen +/- SEM mit 4-7 untersuchten Zellen pro Versuchstag und Kondition.

(E,F) Aktivitätsnachweis der verwendeten Enzyme. Parallel zu einem FRAP-Versuch wurden aus einem Teil der vorbehandelten HepG2-Zellen *Membrane Sheets* generiert und an diesen eine Glykokalix-Färbung mit WGA durchgeführt. Der eingesetzte WGA-Farbstoff bindet an die Glykokalix und ist durch einen fluoreszierenden Marker nachweisbar. Die *Membrane Sheet*-Präparationen der Zellen, die zuvor mit den Enzymen behandelt worden waren, zeigten eine Verringerung der Intensität des Fluoreszenzsignals im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (E). (F) Mittlere gemessene Fluoreszenzintensität normalisiert auf die Kontrollbedingung +/- SD von einem Versuchstag und 47 untersuchten Zellen.

Identifikation der mobilitätsbestimmenden Domäne des hIRs

Keiner der bisher untersuchten extrazellulären Bindungspartner konnte die Mobilität des hIRs in der Membran entscheidend beeinflussen. Es konnte aber gezeigt werden, dass die extrazellulären Anteile des hIRs eine Auswirkung auf die Mobilität des Rezeptors haben (Abbildung 14). Es wurde deshalb entschieden, sich dem Problem mittels einer detaillierten Deletionsanalyse zu nähern. In den nachfolgenden Experimenten wurde systematisch untersucht, welche extrazelluläre Domäne des hIR-Proteins potentiell an entsprechenden Interaktionen beteiligt sein könnte.

Ein Bereich von weniger als 300 Aminosäuren in der α -Kette des hIRs wirkt sich auf die Dynamik des Rezeptors in der Membran aus

Um weiter einzugrenzen, welche Sequenzen im extrazellulären Anteil des hIRs sich essentiell auf das Diffusionsverhalten des Rezeptors in der Zellmembran auswirken, wurde eine Version des hIRs in Zellen überexprimiert, bei der im mittleren Bereich der α -Kette ein Abschnitt von 284 Aminosäuren deletiert wurde (hIR Δ 56-340, siehe Abbildung 12). Obwohl dieses Konstrukt schon zu etwa 80 % mit der Wildtypversion des hIRs identisch war, konnten FRAP-Untersuchungen Unterschiede in der Mobilität der Proteinvarianten in der Membran feststellen (Abbildung 21). Bei einer vergleichbaren mobilen Fraktion an untersuchten Proteinen (Rec_{Max} ; Wildtyp: 82,8 % +/- 1,0 % (SEM), hIR Δ 56-340: 85,1 % +/- 4,7 % (SEM)), zeigte die Deletionsvariante eine insgesamt schnellere Diffusion in der Membran. Dieser Effekt konnte durch die berechnete Halbwertszeit der zurückkehrenden Fluoreszenzintensität während der Messung quantifiziert

werden ($T_{1/2}$; Wildtyp: 69,1 s \pm 2,4 s (SEM), hIR Δ 56-340: 43,2 s \pm 14,9 s (SEM)). Da das untersuchte Deletionskonstrukt zum größten Teil mit der ursprünglichen Wildtypvariante übereinstimmt, könnten im Bereich der deletierten Region Proteindomänen vorhanden sein, die für die Verringerung der Mobilität des Rezeptors in der Membran entscheidend sind. Der gemessene Unterschied fällt jedoch im Vergleich zu dem Konstrukt mit gänzlich deletierter extrazellulärer Domäne (hIR Δ 4-923) deutlich geringer aus (siehe Abbildung 14). Es könnten dementsprechend auch weitere extrazelluläre Domänen des hIRs einen Einfluss auf die Dynamik des Rezeptors in der Membran haben.

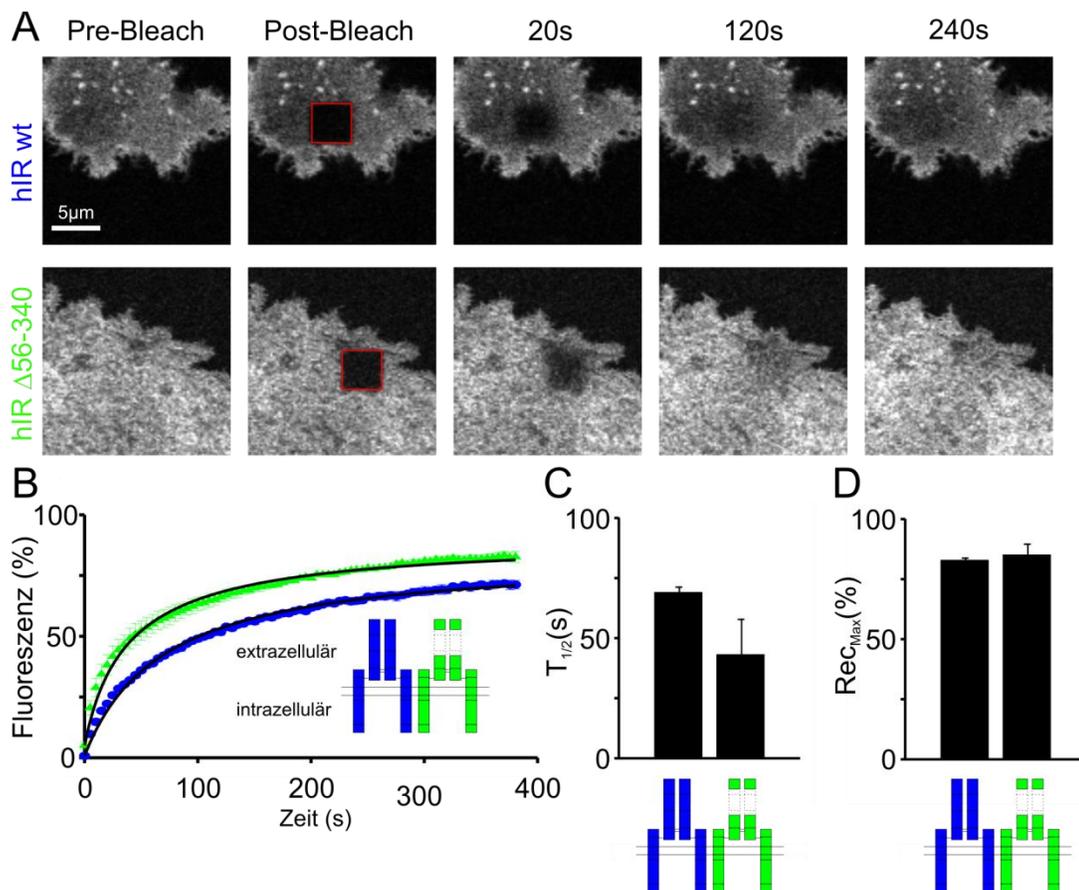


Abbildung 21 Einfluss einer Region im extrazellulären Anteil auf die Diffusion des hIRs in der Membran

In FRAP-Experimenten wurde, wie in Abbildung 15 beschrieben, die Diffusion von Wildtyp-hIR-mEGFP (A, oben) mit einem Deletionskonstrukt verglichen, in dem nur wenige extrazelluläre Domänen des hIRs entfernt wurden (A, unten). Hierbei konnte nach dem Ausbleichen von Membranarealen ein schnelleres Rückkehren der Fluoreszenz (B) mit einer geringeren Halbwertszeit (C) als beim hIR-Wildtyp beobachtet werden. Der berechnete

Maximalwert für die zurückkehrende Fluoreszenz (D) war für beide analysierten Konstrukte ähnlich (die Analyseverfahren ist beschrieben in Abschnitt 5.4.4). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Versuchstagen, wobei pro Tag und Bedingung 4 - 6 Zellen ausgewertet wurden.

Einfluss membrannaher Proteindomänen auf die Mobilität des hIRs in der Membran

Um zu ermitteln, wie hoch der Einfluss der Transmembranregion des hIRs auf die Dynamik des Rezeptors in der Plasmamembran ist, wurden verschiedene hIR-Varianten kloniert, die möglichst nur die Region des Membrandurchgangs des Rezeptors beinhalteten. Hierbei ergaben sich jedoch Probleme, da zahlreiche getesteten hIR-Versionen, die in Zellen überexprimiert wurden, nicht in den Plasmamembranen der Zellen, sondern nur zytoplasmatisch nachweisbar waren (siehe auch Abbildung 24). Erst in einem späten Stadium des Projekts gelang es, ein Konstrukt zu erstellen, das bis auf die Transmembranregion nur einen relativ geringen extrazellulären Anteil des hIRs aufwies und an der basalen Membran von überexprimierenden Zellen detektiert werden konnte - die hIR $\Delta 4-820\Delta 959-1331$ Variante (siehe auch Abbildung 12). Die FRAP-Messungen an diesem Konstrukt ergaben eine nur wenig abweichende Dynamik des Proteins in der Membran im Vergleich mit der Wildtypversion des hIRs (Abbildung 22). Die aus den FRAP-Ergebnissen ermittelten Parameter der zurückkehrenden Fluoreszenzen zeigten für den theoretisch zu erwartenden Maximalwert der wiederkehrenden Fluoreszenz (Rec_{Max} ; Wildtyp: 79,0 % \pm 3,0 % (SEM), hIR $\Delta 4-820\Delta 959-1331$: 75,0 % \pm 3,8 % (SEM)) nur eine geringe Abweichung zwischen Wildtyp- und Deletionskonstrukt. Die berechneten Halbwertszeiten, die Rückschlüsse auf die Dynamik der Proteine in der Membran zulassen, zeigten für das Deletionskonstrukt eine etwas stärkere Mobilität als für den Wildtyp ($T_{1/2}$; Wildtyp: 18,4 s \pm 0,6 s (SEM), hIR $\Delta 4-820\Delta 959-1331$: 15,1 s \pm 0,5 s (SEM)).

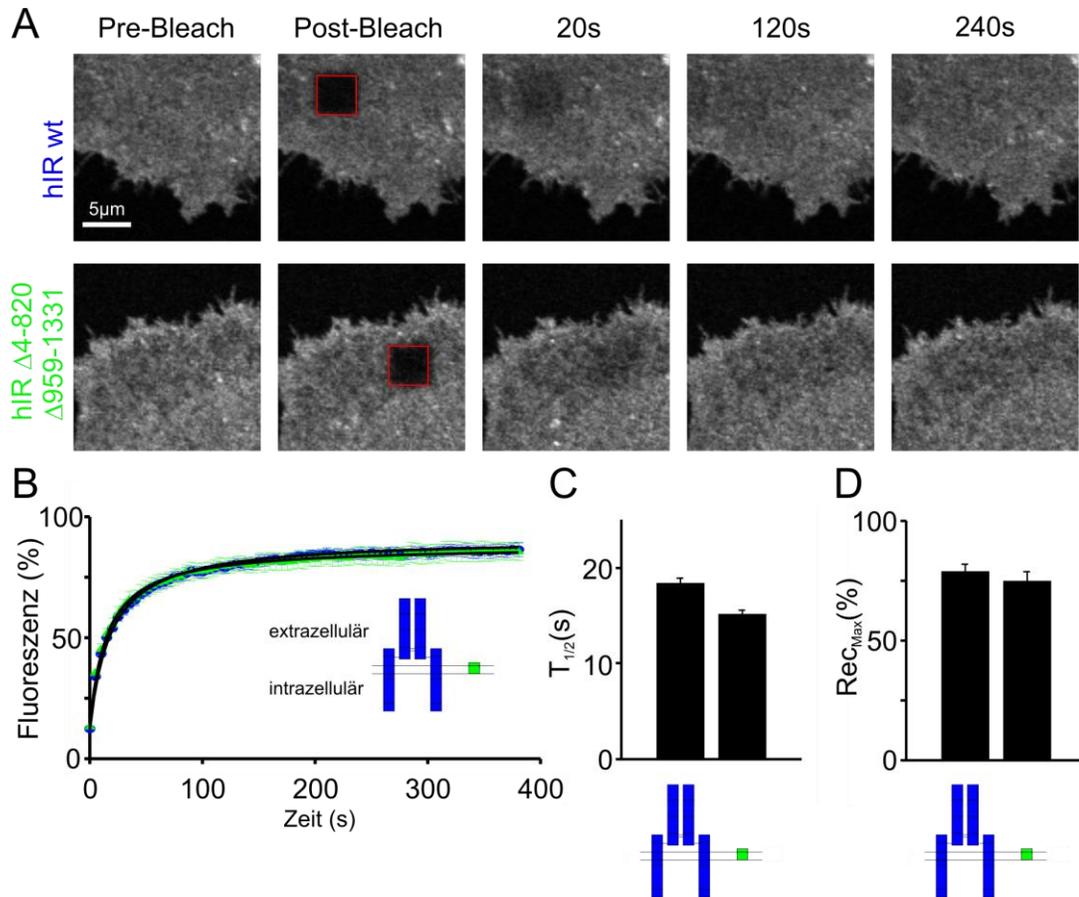


Abbildung 22 Umfangreichere Deletion führt wiederum zu verlangsamer Diffusion

Die in Abbildung 14 und Abbildung 21 gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine teilweise Deletion der extrazellulären Domäne zu einer Erhöhung der Mobilität des hIRs in der Membran führt. Um zu testen, ob die Dynamik des Rezeptors durch eine zusätzliche Deletion weiter ansteigt, wurde eine Deletionsvariante des hIR-mEGFP-Wildtyps, die neben der Transmembranregion nur eine membrannähe extrazelluläre Domäne aufweist, getestet. Die stark deletierte Variante des hIRs (A, unten) zeigte vergleichbare Mobilität in der Membran wie der intakte hIR (A, oben). FRAP-Analysen wurden, wie in Abbildung 13 beschrieben, an HepG2-Zellen durchgeführt, die entsprechende Konstrukte exprimierten. Sowohl die ermittelten Werte für die Halbwertszeiten (C), als auch der für den Maximalwert (D) der zurückkehrenden Fluoreszenzen (B), ergaben keine deutlichen Unterschiede zwischen den eingesetzten hIR-mEGFP-Varianten. Die gezeigten Daten sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Versuchstagen mit jeweils 4 - 6 Zellen pro Einzelexperiment und Kondition.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Daten, die in Abbildung 21 gezeigt sind. Abgesehen von den Domänen, die offensichtlich einen Einfluss auf die Mobilität des Rezeptors in der Membran haben (Abbildung 14 und Abbildung 21), wurden bei dem hier getesteten Konstrukt noch weitere Bereiche des hIRs entfernt. Trotzdem kam es zu einer relativen

Verlangsamung der gemessenen Diffusion des Proteins in der Membran. Die ermittelten widersprüchlichen Daten können an dieser Stelle nicht sinnvoll interpretiert werden. Mögliche Erklärungsansätze, die eine Begründung für die vorliegende Problematik darstellen könnten, werden in der Diskussion genauer erörtert. Ein Vergleich der relativen Diffusions-Halbwertszeiten der untersuchten hIR-Varianten ist zur Veranschaulichung der Problematik in Abbildung 23 zusammengefasst.

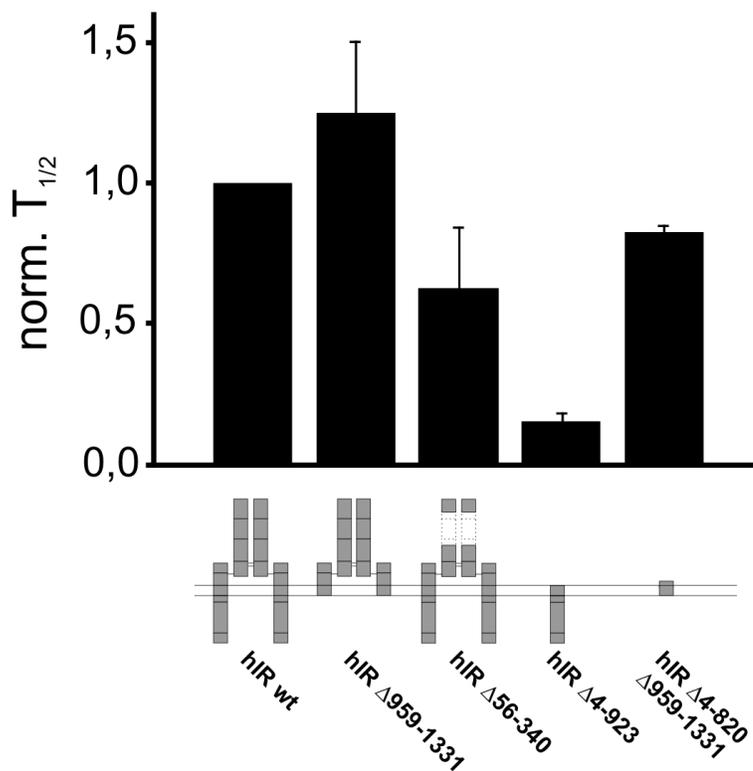


Abbildung 23 Übersicht über $T_{1/2}$ -Werte der analysierten hIR-Konstrukte

Die Abbildung zeigt die durch FRAP-Analysen ermittelten Halbwertszeiten aller untersuchten hIR-Deletionsvarianten. Die Werte wurden auf die gemittelten Halbwertszeiten der Wildtypvariante des hIRs normalisiert, die jeweils als Kontrollkondition zu den verschiedenen Deletionsvarianten gemessen wurden. Vergleiche auch Abbildung 14, Abbildung 21 und Abbildung 22.

Schwierigkeiten bei Mobilitätsanalysen des hIRs

Für eine genauere Analyse des hIRs wurden weitere Deletionsvarianten des Rezeptors kloniert und in Zellen überexprimiert. Bis auf die in den bisherigen Experimenten gezeigten Versionen konnte jedoch in transfizierten Zellen nur intrazelluläre Lokalisation der Konstrukte beobachtet werden (Abbildung 24). An *Membrane Sheet*-Präparationen der jeweiligen Zellen konnten keine oder nur sehr geringe Fluoreszenzsignale der jeweilig überexprimierten Konstrukte nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine nähere Eingrenzung als der in Abbildung 21 beschriebene extrazelluläre Bereich - der für die Mobilität des hIRs in der Membran entscheidenden Proteindomäne - war deshalb im Rahmen des Projekts nicht möglich.

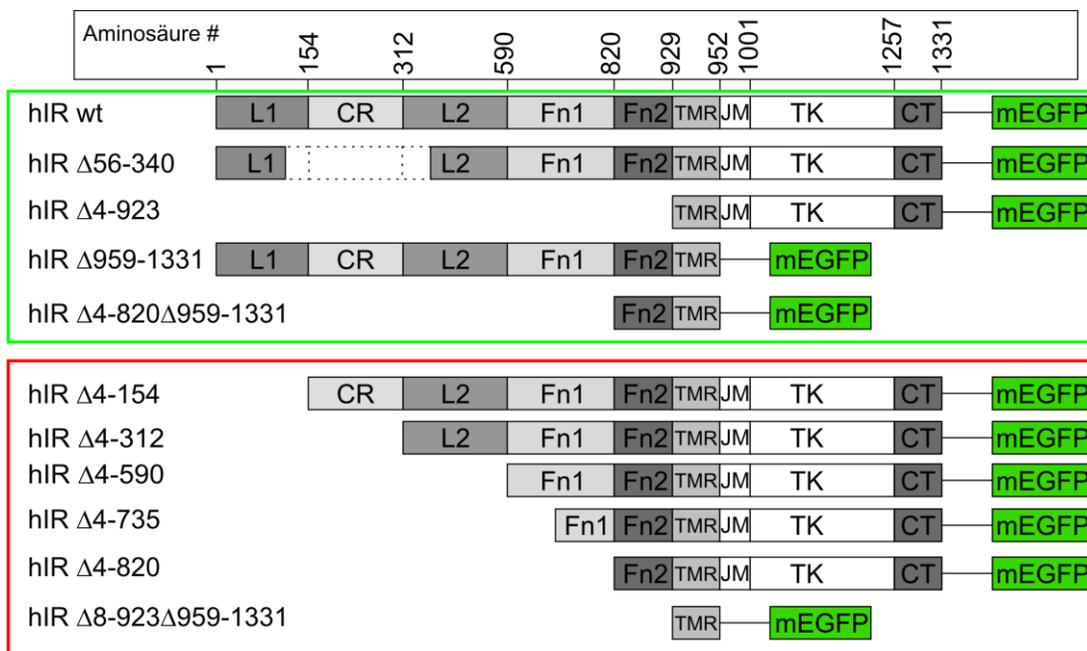


Abbildung 24 Ein Teil der Deletionsvarianten des hIRs werden nicht in die Plasmamembran inkorporiert

Nur ein Teil der im Rahmen der Arbeit erstellten Deletionskonstrukte des hIRs konnte in der Plasmamembran von transfizierten Zellen nachgewiesen werden (grüner Kasten). Viele andere Varianten des Rezeptors wurden nicht - oder für Analysen unzureichend - in die Zellmembran inkorporiert (roter Kasten). *Membrane Sheet*-Präparationen von HepG2-Zellen, transfiziert mit den beschriebenen hIR-Variationen, zeigten bei mikroskopischer Analyse keine oder extrem schwache GFP-Fluoreszenzsignale in basalen Membranen (Daten nicht gezeigt).

Ein weiteres Problem, das im Verlauf der Untersuchungen mittels FRAP-Messung deutlich wurde, war die zum Teil starke Varianz in der ermittelten Halbwertszeit der zurückkehrenden Fluoreszenz bei Analysen des hIR-mEGFP-Wildtyps. Die ermittelten Werte waren im Verlauf einzelner Experimentserien stabil, bei weiter auseinanderliegenden Versuchsreihen konnten jedoch zum Teil starke Variationen beobachtet werden (siehe z.B. Abbildung 15 und Abbildung 20). Ein Grund hierfür könnte eine allmähliche Änderung der Proteinzusammensetzung in den Membranen der verwendeten Zelllinie sein. Ein solcher Prozess könnte sich über mehrere Zellgenerationen verstärken. Es konnte allerdings kein generell erkennbares Muster im Vergleich hoher oder niedriger Zell-Passagen entdeckt werden.

6.1.3 Machbarkeitsstudie zur Einzelmolekülanalyse von GFP-markierten hIR Molekülen mittels TIRF-Mikroskopie

Alternativ zur Klärung des Einflusses von Domänen auf die Mobilität des hIRs wurde auch die Mobilität verschiedener Rezeptor-Deletionsvarianten auf der Einzelmolekül-Ebene untersucht.

Um die Bewegung einzelner hIR-Moleküle in der Membran zu beobachten, wurden Zellen mit hIR-EGFP-Varianten transfiziert und mit Hilfe von TIRF-Mikroskopie Bildserien aufgenommen. TIRF-Mikroskopie ermöglicht eine selektive Anregung von Fluorophoren in der basalen Membran von Zellen (siehe Abschnitt 2.3.2). Durch das besonders gute Signal/Rausch-Verhältnis der mittels dieser Mikroskopie-Technik aufgenommenen Bilder, eignet sich die TIRF-Methode auch für die Aufnahme von lichtschwachen Einzelmolekülsignalen (Kasai et al. 2011; Dixit und Ross 2010).

Für die Aufnahmen in dieser Arbeit wurde in einem ersten Schritt versucht, die basale Membran von transfizierten Zellen mit Laserlicht hoher Intensität auszubleichen. Die jeweiligen Zellen sollten solange dem Laserlicht exponiert werden, bis nur noch einzelne ungeblichene GFP-markierte Moleküle in der Membran verbleiben würden. Es wurde jedoch festgestellt, dass diese Methode bei intakten Zellen kaum anwendbar ist. Bei der Mikroskopie von

Zellen diffundierten fortwährend ungeblichene Fluorophore aus den Membranbereichen außerhalb des TIRF-Feldes in die basale Membran. Hierdurch wurde ein Bleichen der Zellen sehr zeitaufwendig und führte letztendlich nicht zu Resultaten. Durch den Einsatz von *Membrane Sheets* konnte dieses Problem umgangen werden. Die Proben wurden durch den Laser schneller gebleicht und bei einigen Aufnahmen konnte mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit die Bewegung von Einzelmolekülen identifiziert werden. Für die Messungen wurden bei maximaler Laserintensität 500 Bilder hintereinander aufgenommen, wobei alle 0,084 s ein Bild gemacht wurde. Dies war die maximale Bildfrequenz, die mit dem verwendeten System zu erreichen war und bei der Signale potentieller Einzelmoleküle noch von dem Hintergrundrauschen differenziert werden konnten. Die Auswahl der jeweilig untersuchten Signale wurde manuell vorgenommen. Da GFP mit einer Frequenz von etwa 10 Hz blinkt (Dickson et al. 1997), wurde versucht, die Bewegung von Einzelmolekülen über ein entsprechendes Blinken zu identifizieren. Als zusätzliches Kriterium, sollten gemessene Fluoreszenzsignale potentieller Einzelmoleküle – außerhalb von Blinkereignissen – eine konstante Fluoreszenzintensität emittieren. Des Weiteren sollten untersuchte Fluoreszenzsignale im Verlauf von Messungen innerhalb eines einzelnen stufenlosen Schritts gebleicht werden. Bei Aufnahmen von fluoreszierenden Objekten, die alle drei beschriebenen Eigenschaften aufwiesen, wurde - wie in Abschnitt 5.4.3 beschrieben - der genaue Bewegungsverlauf der Signale software-unterstützt analysiert. Die zugrunde gelegten Kriterien für die Selektion von Einzelmolekülaufnahmen konnten jedoch nicht systematisch analysiert werden. Trotz einer möglichst objektiven Auswahl, ist somit unsicher inwiefern im Rahmen der Analysen tatsächlich die Bewegungsverläufe von Einzelmolekülen aufgenommen werden konnten.

In Abbildung 25 sind einige Beispiele von ausgewerteten Molekülbewegungen verschiedener hIR-mEGFP-Varianten gezeigt. Gezeigt ist auch die Aufnahme eines hIR-Konstrukts, welches nur aus der

Transmembranregion des Rezeptors und intrazellulär gekoppeltem mEGFP aufgebaut ist (hIR $\Delta 8-923\Delta 959-1331$, siehe auch Abbildung 12). Da nur ein sehr geringer Anteil des Konstrukts in der Plasmamembran zu detektieren war, konnte es wegen der geringen Fluoreszenzintensität nicht für FRAP-Messungen eingesetzt werden. Bei Einzelmoleküluntersuchungen konnten jedoch mehrfach Bewegungen einzelner GFP-markierter Moleküle der hIR-Variante aufgezeichnet werden. Für andere untersuchte Deletions-Varianten des hIRs konnten keine Einzelmolekülbewegungen identifiziert werden.

Um mögliche Unterschiede der Diffusion der gemessenen Deletionsvarianten in der Zellmembran festzustellen, wurde aus der Bewegung der Moleküle auch das *mean square displacement* (MSD) bestimmt. Wie später genauer beschrieben, können durch das MSD Rückschlüsse auf das Diffusionsverhalten der analysierten Moleküle gezogen werden. Da im Rahmen von zahlreichen Versuchen nur wenige zuverlässige Aufnahmen von Einzelmolekülen gemacht werden konnten, war eine weitere statistische Auswertung der Daten nicht möglich. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Technik grundsätzlich funktionieren könnte, wenngleich noch offene Punkte zu diskutieren sind.

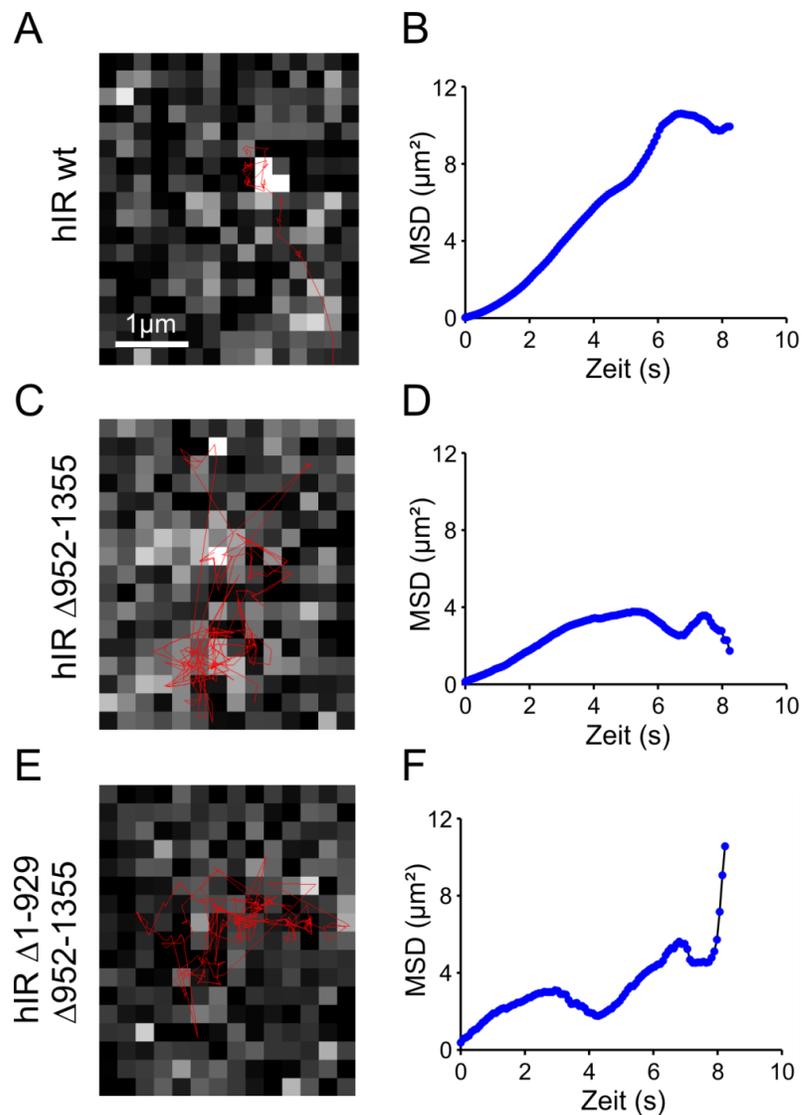


Abbildung 25 Einzelmolekülanalyse des hIRs und hIR-Deletionsvarianten

Die linke Spalte der Abbildung (A, C, E) zeigt Bewegung und Verläufe (rote Linien) von möglichen Einzelmolekülen verschiedener hIR-mEGFP-Varianten über 100 Einzelbilder hin mit einer Aufnahme­frequenz von 0,084 s pro Bild. Die Messungen wurden mit TIRF-Mikroskopie in *Membrane Sheet*-Präparationen bei entsprechend transfizierten HepG2-Zellen durchgeführt. Zusätzlich wurde das *mean square displacement* (MSD) der jeweilig identifizierten Molekülbewegungen über den Gesamtzeitraum von 8,4 s berechnet (B, D, F). (Beschreibung siehe Abschnitt 5.4.3). Die gezeigten Daten sind Beispielergebnisse eines Versuchstages.

6.2 Einfluss von Ca^{2+} auf die Organisation von SNARE-Proteinen

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Calcium-Ionen auf die Organisation und Dynamik von zwei Proteinen aus der SNARE-Familie analysiert.

Voruntersuchungen aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Lang haben Hinweise darauf gegeben, dass durch elektrostatische Mechanismen die Verteilung von Membranproteinen verändert wird (Zilly et al. 2011). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der beobachtete Effekt anhand der Proteine Syntaxin und SNAP25, die jeweils stark negativ geladene intrazelluläre Domänen besitzen, verifiziert und näher untersucht werden.

Der Effekt von Calcium-Ionen auf die Organisation der SNAREs wurde mit Hilfe unterschiedlicher Mikroskopie-Techniken analysiert. In früheren Arbeiten konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der Abnahme der Intensität der Immunanfärbung und einem höheren Grad an Packungsdichte von untersuchten Proteinen festgestellt werden. Hierbei wurden Hinweise gefunden, dass sich durch die verstärkte Clusterung von Proteinen die Zugänglichkeit von Epitopen für verwendete Antikörper verschlechterte (Zilly 2006). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde an *Membrane Sheets* die Intensität und auch die Verteilung der Immunanfärbung mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Da bereits gezeigt werden konnte, dass eine Immobilisierung von Membranproteinen ebenfalls mit einer höheren Packungsdichte bzw. einer verstärkten Clusterbildung von Membranproteinen in Zusammenhang steht (Sieber et al. 2007), sind auch Mobilitätsparameter der untersuchten SNARE-Proteine als Maß für die Organisation der Proteine in der Membran verwendet worden. Hierfür wurde der Einfluss der Calcium-Ionen auf die Membranorganisation an lebenden Zellen anhand veränderter Diffusion in der Zellmembran mit Hilfe von FRAP-Messungen und TRIF-Mikroskopie untersucht.

Die meisten der in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden in (Zilly et al. 2011) veröffentlicht.

6.2.1 Ca²⁺ induzierte Veränderung der lateralen Verteilung von SNAP25 und Syntaxin1

Vorarbeiten zum Einfluss von Calcium auf die Organisation von Membranproteinen konnten zeigen, dass Calcium die Immunanfärbung von verschiedenen Membranproteinen verringert. Außerdem schien das Erhöhen der Calcium-Konzentration zu einer verstärkten Clusterung der untersuchten Proteine zu führen. Diese Beobachtung basierte jedoch nur auf einem visuellen Eindruck und erlaubte somit keine objektive Quantifizierung (Zilly 2006). Für eine eindeutigere Charakterisierung des beobachteten Effekts fehlte - im Fall der SNARE-Proteine Syntaxin und SNAP25 - bisher sowohl die genaue Beschreibung des zeitlichen Ablaufs der Reaktion, als auch eine Methode, um die veränderte Organisation der Proteine in der Membran zu quantifizieren.

Um diese bisher fehlenden Parameter zu ermitteln, wurden native *Membrane Sheets* von PC12-Zellen mit einem Calcium/DPTA Puffersystem mit 54 µM freiem Calcium inkubiert (siehe Abschnitt 5.3.6). Wie in Abbildung 26 gezeigt, wurde die Behandlung nach unterschiedlichen Zeitpunkten durch das Fixieren der *Membrane Sheets* abgebrochen. Danach wurden Immunanfärbungen gegen Syntaxin1 oder SNAP25 durchgeführt. Die Intensität der jeweiligen Färbungen wurde analysiert und gegen die direkt fixierte Kontrollkondition normalisiert. Zusätzlich wurde für jeden Messwert die prozentuale Standardabweichung der gemessenen Pixelintensitäten berechnet. Die relative Standardabweichung der gemessenen Pixelwerte eignet sich als Maß für die Organisation der untersuchten Proteine, da hierüber festgestellt werden kann, ob sich beim Vergleich unterschiedlicher Konditionen eine homogenere oder heterogenere Verteilung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten ergibt. Bei einer sehr homogenen

Verteilung der untersuchten Proteine in der Membran wird auch ein Bild einer entsprechenden Immunanfärbung nur geringe Schwankungen in der Fluoreszenzintensität verschiedener Bildpunkte aufweisen. Bei einer heterogeneren Verteilung von untersuchten Membranproteinen – wie es bei verstärktem Clustern der Proteine der Fall ist – wird auch eine entsprechende Antikörperfärbung eine höhere Variabilität in den Intensitätswerten der unterschiedlichen Bildpunkte zeigen. Eine einfache Quantifizierung dieser Schwankung in den Pixelwerten ist möglich, indem die relative Standardabweichung der Einzel-Pixelwerte zur gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität aller analysierten Bildpunkte berechnet wird. Mit Hilfe dieser Analysemethode konnte bestimmt werden, innerhalb welchen Zeitraums die Behandlung mit Calcium eine Wirkung auf die Organisation bzw. auf die Immunanfärbung der untersuchten Proteine zeigt (Abbildung 26, B und E). Zusätzlich wurde aber auch eine Quantifizierung des Cluster-Effekts möglich (Abbildung 26, C und D). Für die Quantifizierung wurde von der berechneten relativen Standardabweichung der Pixelintensitäten der jeweiligen Konditionen zusätzlich der Wert der direkt fixierten Kontrollbedingung abgezogen. Anhand der ermittelten Daten konnte festgestellt werden, dass der Rückgang der Intensität der jeweiligen Immunanfärbung und die verstärkt geclusterte Anordnung der Membranproteine zeitlich parallel verläuft. Sowohl bei Syntaxin1 als auch bei SNAP25 setzten beide Prozesse nach Inkubationszeiten von 1 bis 5 min ein.

Für eine anschauliche Illustration des Effekts von Calcium auf die Clusterung der Proteine wurden die aufgenommenen Fluoreszenzfärbungen der unterschiedlichen Zeitpunkte jeweils auf den gleichen Intensitätsmittelwert skaliert (Abbildung 26, A und B jeweils untere Zeile).

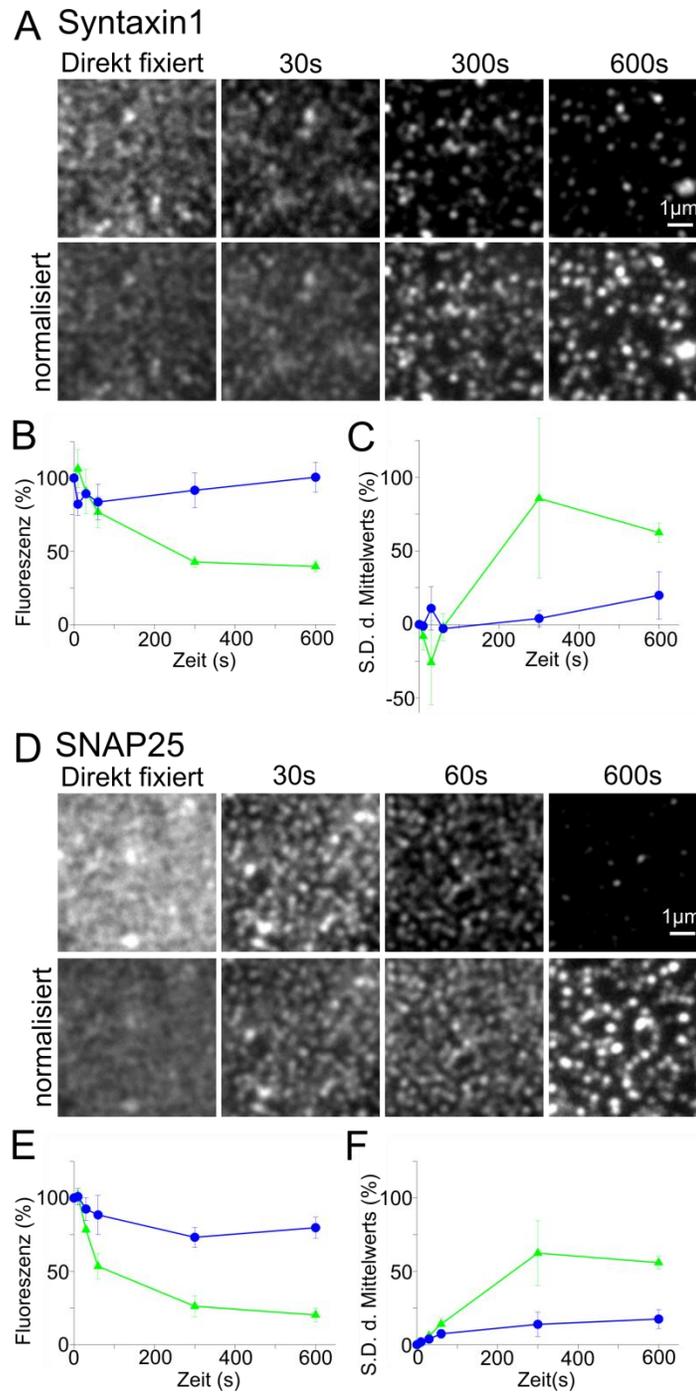


Abbildung 26 Rückgang der Immunfluoreszenz-Intensität nach Ca^{2+} -Behandlung geht einher mit einer verstärkt geclusterten Organisation von Membranproteinen

(A, D) Syntaxin (A) und SNAP25 (D) Immunanfärbungen an *Membrane Sheets*, zuvor behandelt für unterschiedliche Zeitintervalle mit $54 \mu\text{M Ca}^{2+}$. Die jeweils obere Zeile zeigt Bilder gleicher Skalierung und verdeutlicht die schwächer werdende Immunanfärbung nach längeren Ca^{2+} -Inkubationen. Für die Bilder der unteren Zeilen von A und D wurden die Skalierungen normalisiert, um zu zeigen, dass nach längeren Ca^{2+} -Behandlungen ein deutlicheres Clustern der Membranproteine stattfindet. Hierfür wurden die Bilder

hintergrundkorrigiert und die jeweilige mittlere Bildintensität auf die mittlere Intensität der direkt fixierten Kontrolle normalisiert und dann gleich skaliert. Sowohl für Syntaxin (B, C) als auch SNAP25 (E, F) wurde die mittlere prozentuale Fluoreszenzintensität (B, E) bestimmt. Zusätzlich wurde die SD der mittleren Bildintensität (normalisiert auf den jeweiligen mittleren hintergrundkorrigierten Wert) berechnet und auf den Wert der direkt fixierten Kontrolle bezogen (C, F). Dargestellt sind die Ergebnisse für Ca^{2+} -Behandlung (grüne Graphen) und die jeweiligen Kontrollbedingungen (blaue Graphen). Die berechneten Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten sind \pm SEM dargestellt. Pro Tag und Kondition wurden 26-74 *Membrane Sheets* ausgewertet. Eine veränderte Version der Abbildung ist in Zilly et al. 2011 veröffentlicht.

Ausschluss von Proteaseaktivität als Mechanismus für die Ca^{2+} -abhängige Abnahme der Immunanfärbung von SNARE-Proteinen

Die in Abbildung 26 dargestellten Reduzierungen der SNARE-Immunanfärbung könnten theoretisch auch ein Hinweis auf Ca^{2+} -Aktivierung von Proteasen sein. Die beschriebenen Experimente wurden an *Membrane Sheets* durchgeführt und es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass nach der Erstellung der *Membrane Sheets* Protease-Aktivität an der Membran stattfindet. Um sicher zu stellen, dass der Rückgang der Intensität der Immunanfärbung nicht auf Proteaseaktivität zurückzuführen ist, wurden die Experimente teilweise wiederholt. In parallelen Versuchen wurden während der Inkubation mit Calcium-Ionen zusätzlich verschiedene Proteaseinhibitoren mit in die Lösungen gegeben. Zusätzlich zu Syntaxin und SNAP25 wurde noch ein weiteres Membranprotein, Synaptophysin, untersucht, das weniger empfindlich auf Ca^{2+} reagiert hat (Zilly 2006). Für alle drei untersuchten Proteine konnte nachgewiesen werden, dass es nach Inkubation mit Calcium-Ionen auch in der Gegenwart von Protease-Inhibitoren gleichermaßen zu einer Verringerung der Intensität der Fluoreszenzfärbungen kommt (Abbildung 27).

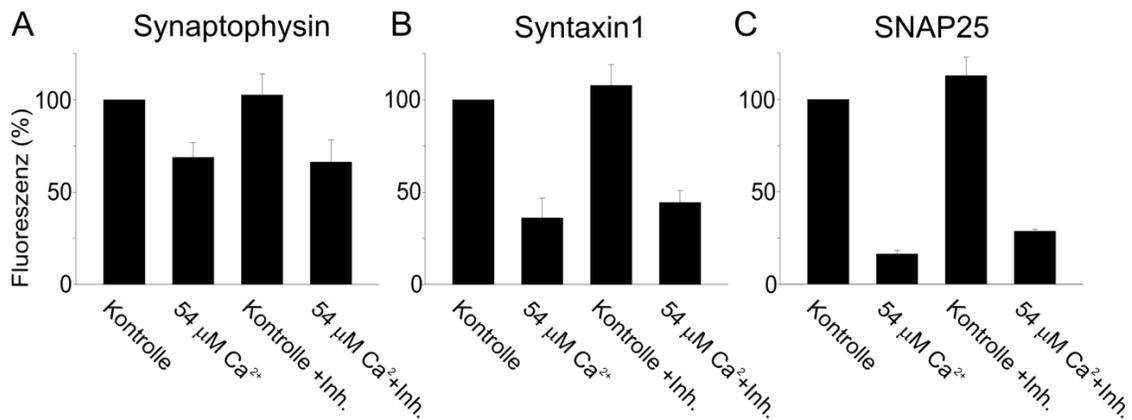


Abbildung 27 Veränderung der Immunanfärbung nach Ca²⁺-Inkubation ist nicht durch Proteaseaktivität bedingt

Membrane Sheet-Präparationen von PC12 Zellen wurden für 10 min bei 37 °C mit oder ohne 54 µM freiem Ca²⁺ inkubiert. In einem parallelen Ansatz wurde zusätzlich eine Mischung verschiedener Proteaseinhibitoren zugegeben (complete Mini EDTA-free Cocktail (inhibiert Serin- und Cystein-Proteasen), 1 mM 1,10-Phenanthroline (hemmt Metallo-Proteasen) und 1,46 µM Pepstatin A (Hemmung von Aspartyl-Protease-Aktivität)). Die Intensität von Immunanfärbungen gegen Synaptophysin (A), Syntaxin1 (B) und SNAP25 (C) wurde auf die von Kontrollen (inkubiert ohne Ca²⁺ und ohne Inhibitoren) normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten +/- SEM, es wurden pro Experiment und Bedingung 42-74 *Membrane Sheets* ausgewertet. Die Abbildung wurde in abgewandelter Form auch in Zilly et al. 2011 publiziert.

6.2.2 Die Calcium-bedingte Abnahme der Immunanfärbung von SNARE Proteinen ist umkehrbar

Um festzustellen, ob die durch Calcium induzierte geringere Anfärbbarkeit von Proteinen auch umkehrbar ist, wurde die intrazelluläre Calcium-Konzentration in lebenden Zellen künstlich erhöht. Hierfür wurden die Zellen in einer Pufferlösung mit erhöhter Calcium-Konzentration inkubiert. Zusätzlich wurde Ionomycin zugegeben, welches Calcium-Ionen durch Zellmembranen transportieren kann. Kontrollkonditionen wurden mit EGTA versetzt, das die Calcium-Ionen der Pufferlösung bindet. Für eine Regeneration der Zellen wurden diese nach der 5 min Ionomycin-Behandlung in Medium bei 37 °C inkubiert (siehe auch Abschnitt 5.3.5). Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden dann *Membrane Sheets* der Zellen erstellt und Immunanfärbungen gegen Syntaxin und SNAP25 durchgeführt. Die gemessenen Intensitäten der Fluoreszenzfärbungen wurden gegen die jeweilige Kontrollkondition normalisiert und als prozentualer Wert dargestellt

(Abbildung 28). Anhand der Untersuchungen war zu erkennen, dass der Calcium-Effekt nach etwa 1 - 2 Std Regeneration nur noch sehr schwach in den Zellen nachweisbar war.

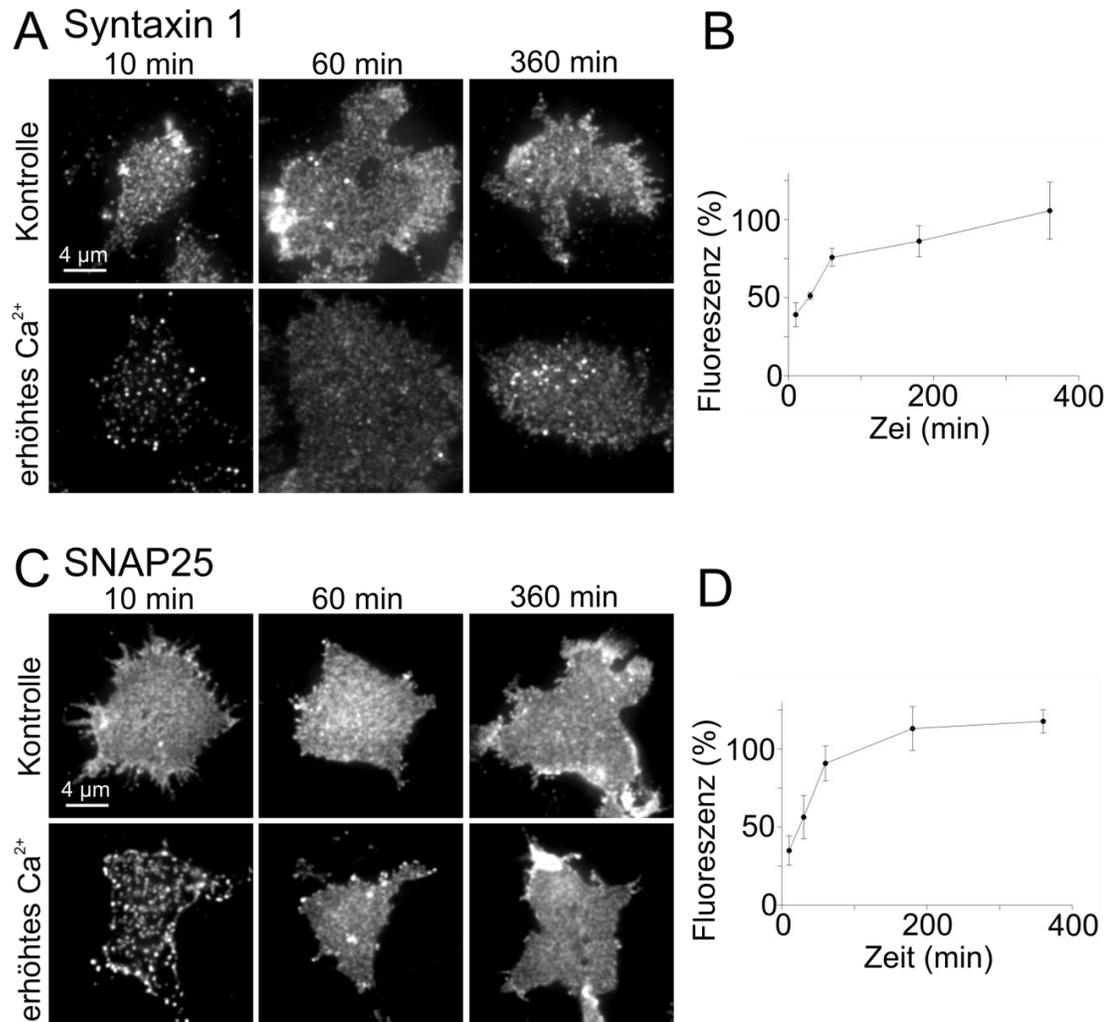


Abbildung 28 Ca²⁺-bedingter Immunfluoreszenzrückgang ist reversibel

PC12-Zellen wurden zuerst für 5 min mit Ionomycin und zusätzlich mit und ohne Ca²⁺-Ionen in einer Pufferlösung und dann in Medium für die angegebenen Zeitintervalle bei 37 °C inkubiert. Dann wurden *Membrane Sheets* generiert und gegen Syntaxin1 (A, B) oder SNAP25 (C,D) angefärbt. (B, D) Gezeigt sind die gegen die jeweilige Kontrollkondition normalisierten relativen Fluoreszenzintensitäten. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Für jede Kondition der einzelnen Versuche wurden 17 - 50 *Membrane Sheets* ausgewertet. Die dargestellte Abbildung wurde leicht verändert bereits in Zilly et al. 2011 veröffentlicht.

6.2.3 Intrazelluläres Ca^{2+} verändert die Mobilität von Syntaxin-GFP

Um eine Auswirkung der Calcium-Konzentration auf Syntaxin auch direkt in lebenden Zellen untersuchen zu können, wurde Syntaxin1A-GFP in Zellen überexprimiert und die Dynamik des Proteins in der Membran mit Hilfe von FRAP-Messungen analysiert. Hierbei wurden Diffusionsparameter wie die Halbwertszeit und die maximal zurückkehrende Fluoreszenz bestimmt (siehe auch Abschnitt 5.4.4). Wie zu Beginn des Kapitels 6.2 bereits erörtert, sollte sich eine veränderte Organisation von Syntaxin-Molekülen auch in einer Änderung der Mobilität der Proteine in der Membran widerspiegeln. Der Anteil mobiler Syntaxin-GFP Moleküle entspricht hierbei dem bei den Messungen berechneten Wert für die maximal zurückkehrende Fluoreszenz (Rec_{Max}) (Goehring et al. 2010). Eine Abnahme dieser Messgröße korreliert folglich mit einer verstärkten Immobilisierung der untersuchten Syntaxin-Moleküle in der Zellmembran. Zusätzlich ergibt sich bei FRAP-Messungen durch die Bestimmung der Halbwertszeit ($T_{1/2}$) der zurückkehrenden Fluoreszenz auch die mittlere Diffusionsgeschwindigkeit der untersuchten Proteine in der Membran (Canel et al.). Ein relativer Vergleich der Rec_{Max} - und $T_{1/2}$ -Werte verschiedener experimenteller Bedingungen ermöglicht somit auch Aussagen über eine Veränderung im Clustergrad bzw. der Diffusionsgeschwindigkeit untersuchter Proteine.

Für die FRAP-Analysen wurde die Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma der mit Syntaxin1A-GFP transfizierten Zellen - mit Hilfe des Ionen-Transporters Ionomycin - erhöht. FRAP-Messungen wurden an der gleichen Zelle sowohl vor, als auch nach der Behandlung mit Ca^{2+} /Ionomycin durchgeführt (genauer beschrieben in Abschnitt 5.3.5). Hierbei konnte eine Änderung der Mobilitätsparameter von Syntaxin1 in der Membran untersuchter Zellen festgestellt werden (Abbildung 29; B, C und D). Neben einer verstärkten Diffusion nach Calcium-Behandlung (Abbildung 29; C und E) konnte auch eine Verringerung des mobilen Anteils des Proteins in der Membran ermittelt werden (Abbildung 29; D). Parallel wurden Kontrollanalysen durchgeführt, bei

denen die Zellen in einem Puffer inkubiert wurden, der neben Calcium und Ionomycin auch EGTA enthielt. Die so behandelten Zellen zeigten vor und nach der Behandlung keine deutlichen Unterschiede der Mobilität von Syntaxin-GFP (Daten nicht gezeigt).

Neben der Abnahme des Rec_{Max} und einer Verringerung des $T_{1/2}$ -Wertes konnte nach Ca^{2+} -Behandlung auch ein leichter Rückgang der Fluoreszenz beobachtet werden (vergleiche obere und untere Zeile in Abbildung 29 A, siehe auch Abbildung 30). Dies könnte ein weiterer Hinweis auf ein verstärktes Clustern der Syntaxin-GFP-Moleküle durch den Einfluss von Calcium-Ionen sein. Infolge eines höheren Clustergrades der Syntaxin-Proteine kommt es auch zu einer räumlichen Annäherung der gebundenen GFP-Moleküle. Hierdurch könnte es zu einem Homo-FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) bzw. einem *self-quenching* zwischen den GFP-Molekülen kommen, welches in einer Abnahme der zu beobachtenden Fluoreszenz resultieren sollte. Vergleichbare Effekte sind bereits für verschiedene Fluorophore beschrieben (Hamann et al. 2002).

Ähnliche Ergebnisse wie für Syntaxin-GFP konnten auch bei entsprechenden Versuchen an GFP-SNAP25 beobachtet werden (Zilly et al. 2011).

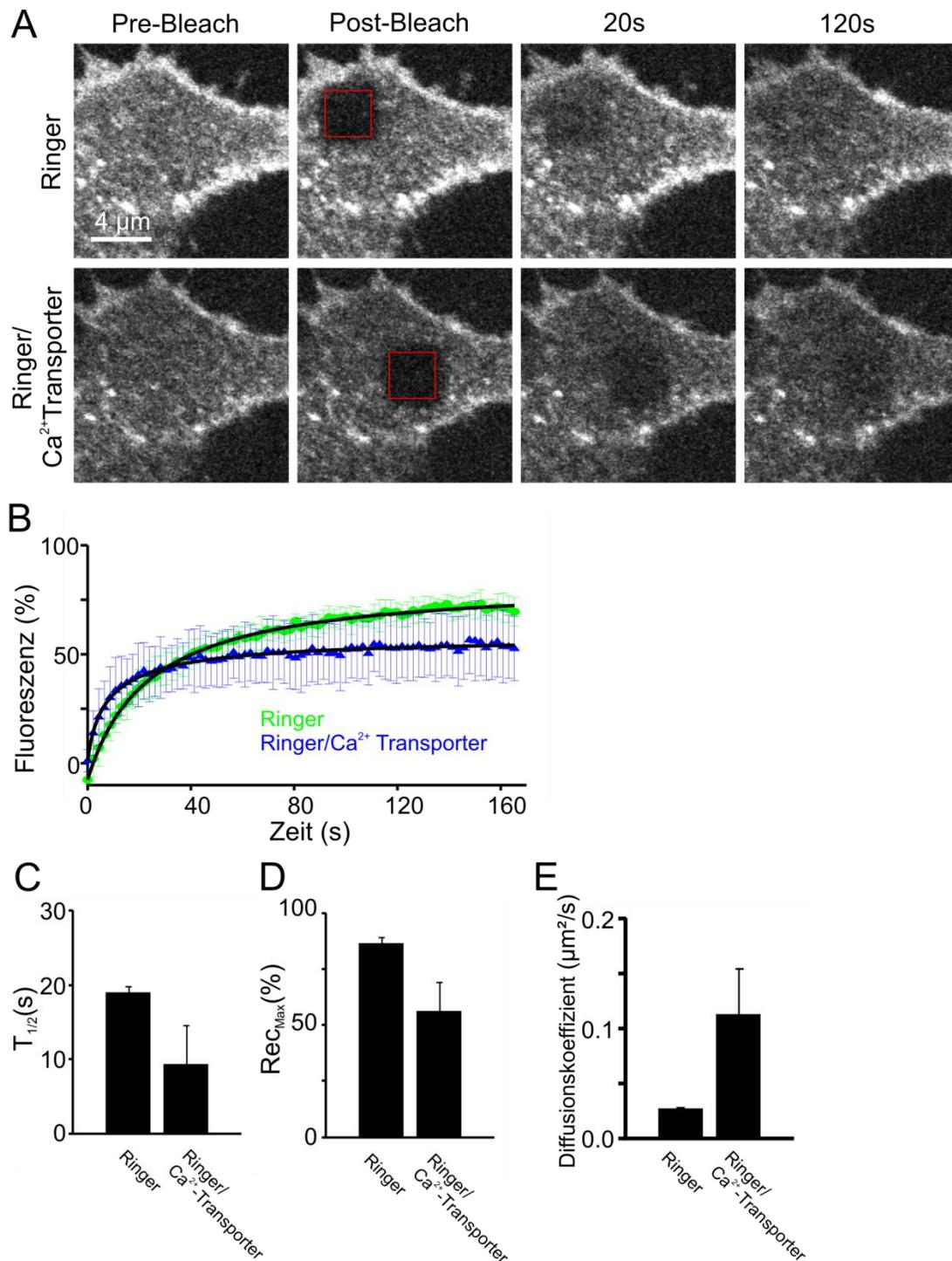


Abbildung 29 Messungen der Mobilität von Proteinen in der Membran zeigen, dass Ca²⁺-Behandlung den Anteil der immobilen Fraktion und die Diffusion der mobilen Fraktion erhöht

In A sind FRAP-Messungen an PC12-Zellen gezeigt, die Syntaxin1A-GFP exprimieren. Wie in Abschnitt 5.3.5 beschrieben, wurden Zellen zuerst in Ringerlösung (A, oben) und nach 5 min Inkubation mit Ca²⁺-Transporter Ionomycin und erhöhter Ca²⁺-Konzentration (A, unten) gemessen. Die rückkehrenden Fluoreszenzintensitäten (B) zeigten nach Ca²⁺-Behandlung

sowohl eine niedrigere Halbwertszeit (C), als auch einen geringeren Wert für die ermittelte maximal zurückkehrende Fluoreszenz (D). Der berechnete Diffusionskoeffizient ist nach der Behandlung mit Ca^{2+} deutlich höher als in Kontrollkonditionen (E). In analog durchgeführten Kontrollen wurde Calcium durch zusätzliche Zugabe von EGTA cheliiert. Hier wurden keine Unterschiede aufgrund der verschiedenen Bedingungen festgestellt (Daten nicht gezeigt). Dargestellt sind Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen mit 3 - 5 Zellen pro Experiment und Kondition. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM ($n=3$). Die dargestellte Abbildung wurde in geänderter Form auch schon in Zilly et al. 2011 veröffentlicht.

6.2.4 Calcium-Behandlung verringert die Fluoreszenz von GFP-markierten SNARE-Proteinen

Wie zuvor beschrieben, wurde bei FRAP-Analysen festgestellt, dass das Erhöhen der intrazellulären Calcium-Konzentration die GFP-Fluoreszenz überexprimierter SNAREs möglicherweise über Homo-FRET-Effekte beeinflusst. Um dieses Phänomen genauer zu quantifizieren, wurden die in Abbildung 29 beschriebenen Versuche wiederholt und mit TIRF-Mikroskopie analysiert (Abbildung 30). Für die Messungen wurden sowohl Zellen untersucht, die Syntaxin1A-GFP exprimierten, als auch Zellen, die mit GFP-SNAP25 transfiziert waren. Ähnlich wie zuvor wurden die Zellen in einem Puffer mit Calcium und Ionomycin inkubiert, um die Calcium-Konzentration im Inneren der Zellen zu erhöhen. Sowohl vor der Behandlung mit Calcium, als auch nach 5 und 10 min Inkubation, wurden im TIRF-Modus Bilder der basalen Membranen der Zellen aufgenommen (Abbildung 30; A und C). Für Kontrollen wurde zusätzlich EGTA mit in die Pufferlösung gegeben, um die Calcium-Ionen zu chelatieren. Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Messungen wurden ermittelt und auf die Kondition vor Calcium-Behandlung normalisiert (Abbildung 30, B und D). Da bekannt ist, dass die Intensität der GFP-Fluoreszenz auch durch eine Änderung des pH-Werts beeinflusst werden kann (Bizzarri et al. 2009), wurden die Zellen am Ende jeder Messung in Ringerlösung mit zusätzlich 50 mM Ammoniumchlorid (NH_4Cl) inkubiert und ein weiteres TIRF-Bild aufgenommen. Ammoniumchlorid-Ionen können in die untersuchten Zellen diffundieren, würden einen potentiell vorhandenen pH-Gradienten im Zytosol der Zellen abbauen (Holroyd et al.

2002) und zu einer erneuten Änderung der GFP-Fluoreszenzintensität führen. Es zeigte sich jedoch bei keiner der Messungen eine Veränderungen der Fluoreszenzintensität durch Zugabe der Lösung (Daten nicht gezeigt). Somit konnte ein pH-Effekt ausgeschlossen werden.

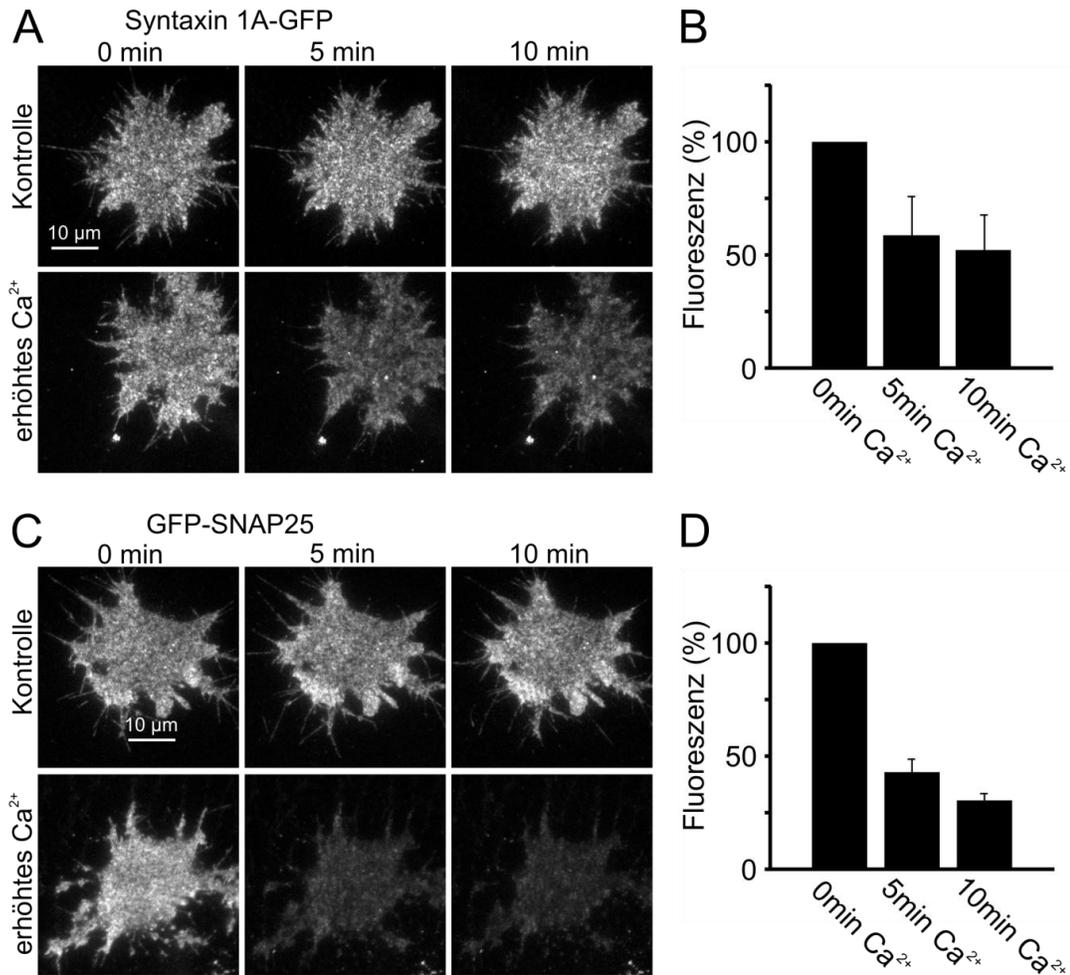


Abbildung 30 TIRF-Mikroskopie zur Messung der Ca²⁺-induzierten Abnahme von Syntaxin-GFP- und GFP-SNAP25-Fluoreszenz in lebenden Zellen

PC12-Zellen, die Syntaxin1A-GFP (A, B) oder GFP-SNAP25 (C, D) exprimieren, wurden zusammen mit Ionomycin und extrazellulärem Ca²⁺ (A und C, unten) 5 und 10 min bei RT inkubiert (A und C, zweite und dritte Spalte) und mittels TIRF-Mikroskopie, wie in Abschnitt 5.4.3 beschrieben, analysiert. Für Kontrollbedingungen wurde freies Calcium durch Zugabe von EGTA chelatiert (A und C, oben). Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM (n=3). Pro Kondition und Einzelexperiment wurden 5 - 7 Zellen analysiert. Die Abbildung und gezeigten Werte wurden in abgeänderter Darstellung schon in Zilly et al. 2011 veröffentlicht.

6.2.5 Carbachol und Thapsigargin stimulierte Anstiege der intrazellulären Calcium-Konzentration zeigten bei PC12-Zellen keine Änderung der Membranprotein-Organisation

Für die bisherigen Experimente an lebenden Zellen (Abbildung 29 und Abbildung 30) wurde die Calcium-Konzentration im Zytoplasma der Zellen durch den Einsatz des Ionen-Transporters Ionomycin erhöht. In einem weiteren Experiment sollte die intrazelluläre Calcium-Ionen-Konzentration über Stimuli erhöht werden, die eher einem physiologischen Ca^{2+} -Anstieg ähneln. Hierfür wurden die Zellen mit Carbachol und Thapsigargin behandelt. Carbachol bindet an Calcium-Kanäle in der Plasmamembran und bewirkt ein Öffnen der Kanäle (Wang et al. 2009), wodurch Ionen in das Zellinnere einfließen können. Die Inkubation mit Thapsigargin bewirkt dagegen, dass Calcium aus Zellorganellen in das Zytoplasma ausgeschüttet wird (Giorgi et al. 2010). Es wurden ähnlich wie in Abbildung 30 PC12-Zellen mit Syntaxin1A-GFP transfiziert und die Fluoreszenzintensität in der basalen Membran der Zellen mit TIRF-Mikroskopie analysiert. In Vorversuchen wurden Einzelinkubationen mit Carbachol und Thapsigargin getestet. Die Zellen wurden hierfür bei 5 mM Calcium im Puffer mit verschiedenen Inkubationszeiten sowohl bei RT als auch bei 37 °C behandelt. In keiner der untersuchten Konditionen zeigte sich eine Veränderung der gemessenen Fluoreszenzintensität (Ergebnisse nicht gezeigt). Um den Effekt der Stimulation zu verstärken, wurden die Zellen gleichzeitig mit Carbachol und Thapsigargin behandelt, zusätzlich die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auf 10 mM erhöht und die Proben bei 37 °C inkubiert. Sowohl vor der Behandlung, als auch nach 10 und 20 min Inkubation wurden TIRF-Mikroskopie-Aufnahmen gemacht (Abbildung 31 A). Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden gegen die Kondition vor der Behandlung normalisiert (Abbildung 31 B). Ein Effekt der Stimulation auf die Fluoreszenz von Syntaxin1A-GFP konnte nicht beobachtet werden. Im Rahmen der gezeigten Versuche wurden nur wenige Zellen analysiert, wodurch die ermittelten Daten statistisch nicht aussagekräftig sind. Falls jedoch ein

starker Ca^{2+} -Effekt vorgelegen hätte, wäre dies zumindest in einer entsprechenden Tendenz in der Änderung gemessener Fluoreszenzintensitäten erkennbar gewesen.

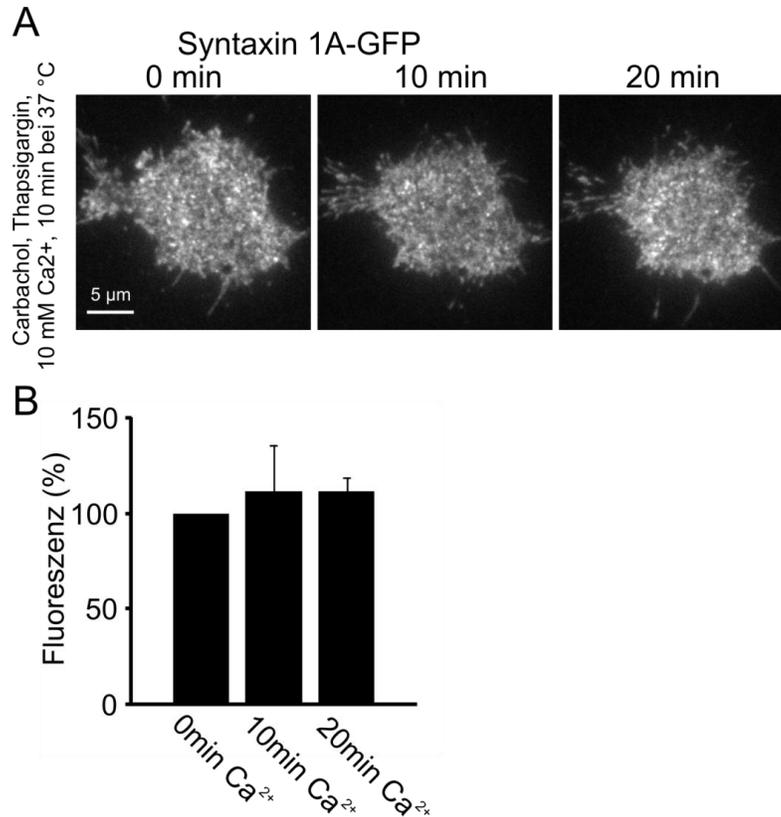


Abbildung 31 Ca^{2+} -Einstrom durch Ionenkanäle und Ausschüttung von Ca^{2+} aus intrazellulären Reservoirs sind nicht ausreichend für eine Änderung der Membranorganisation

Mit Syntaxin1A-GFP transfizierte PC12-Zellen wurden in Ringerlösung mit 10 mM CaCl_2 , 5 mM Carbachol und 1 μM Thapsigargin bei 37 °C inkubiert und wie in Abschnitt 5.4.3 beschrieben, nach 10 und 20 min (A, zweites bzw. drittes Bild) im TIRF-Modus mikroskopiert. (B) Quantifizierung der Fluoreszenzintensität der basalen Membran nach angegebenen Zeiten, normalisiert auf die 0 min-Kontrolle. Gezeigt sind Mittelwert \pm SD von einem Versuchstag und drei analysierten Zellen.

7 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wurden Mechanismen untersucht, die Verteilung und Mobilität von Proteinen in der Plasmamembran bestimmen, sowohl an intakten Zellen, als auch mit dem *Membrane Sheet*-Assay. Im ersten Teil der Arbeit sind hierbei die Interaktionen verschiedener Bindungspartner mit dem humanen Insulinrezeptor (hIR) genauer charakterisiert worden. In einem zweiten Projekt wurde der Einfluss von ionischen Interaktionen auf die Organisation von SNARE-Proteinen in der Zellmembran umfangreich analysiert.

7.1 Einfluss intra- und extrazellulärer Bindungspartner auf die Organisation des hIRs in der Plasmamembran

Der hIR gehört zur Familie der membrangebundenen Tyrosinkinase. Zu dieser Proteingruppe zählen verschiedene Rezeptormoleküle, die in entscheidende zelluläre Prozesse, wie beispielsweise die DNS-Replikation, die Zellmotilität und die Zelldifferenzierung involviert sind (Yarden und Sliwkowski 2001; Bill et al. 2010). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass viele dieser Rezeptor Tyrosinkinase - auch der hIR - in abgetrennten Mikrodomänen der Plasmamembran vorkommen (Nagy et al. 1999; Uhles et al. 2003; Yang et al. 2007; Szab et al. 2008). Es konnte weiter nachgewiesen werden, dass Defekte in der Mikrodomänen-Formierung des hIRs in Zusammenhang mit *Diabetes mellitus* Typ-2 gebracht werden können (Inokuchi 2007; Kabayama et al. 2007). Für eine genauere Charakterisierung der Mechanismen, die den hIR organisieren, wurde in dieser Arbeit der Einfluss potentieller Bindungspartner auf die Anordnung und Dynamik des Rezeptors in der Zellmembran analysiert.

Zu diesem Zweck wurden im Rahmen der Analysen die generellen Interaktionen mit intrazellulären Bestandteilen, die Wirkung der Stimulation des Rezeptors und der Einfluss von Wechselwirkungen mit der Glykokalix auf die Mobilität des Membranproteins getestet. Um festzustellen, ob eine

bestimmte Proteindomäne des hIRs für die Dynamik des Rezeptors in der Zellmembran relevant ist, wurden auch unterschiedliche Deletionsvarianten des Proteins erstellt, in Zellen überexprimiert und jeweils mit dem Diffusionsverhalten des Wildtyps verglichen.

7.1.1 Wechselwirkungen mit intrazellulären Faktoren kontrollieren nicht die Mobilität des hIRs in der Plasmamembran

Wie bereits erwähnt, haben frühere Studien nachgewiesen, dass der hIR in Mikrodomänen in der Plasmamembran anzutreffen ist. Membranproteine, die geclustert vorkommen, werden hierdurch teilweise immobilisiert. Wird die Bindung zum Cluster unterbunden, erhöht sich auch die Dynamik des entsprechenden Proteins in der Membran (Sieber et al. 2007). Ein Vergleich der jeweiligen Mobilität des hIRs in der Zellmembran unter verschiedenen Bedingungen lässt deshalb auch Rückschlüsse auf die Organisation und das Clusterverhalten des Proteins in der Membran zu. In den Untersuchungen wurden deshalb Änderungen in der Mobilität des Rezeptors als indirekter Maßstab für eine Veränderung der Organisation des hIRs in der Membran eingesetzt. Die verschiedenen Mobilitätsparameter des hIRs in der Zellmembran wurden durch den Einsatz von FRAP-Messungen (Abschnitt 5.4.4) untersucht.

In Kombination mit dem eingangs beschriebenen *Membrane Sheet-Assay* (Abschnitt 2.3.3) konnte dann in einem ersten Schritt gezeigt werden, dass sich die Diffusion von untersuchten hIR-Molekülen in diesen Plasmamembran-Präparationen nicht von der Mobilität des Rezeptors in Membranen intakter Zellen unterschied. Durch die Verwendung von *Membrane Sheets* konnte somit eine Interaktion zwischen dem untersuchten Membranprotein und im Zytosol vorkommenden Bestandteilen ausgeschlossen werden (Abbildung 13). Eine Kontrolle der Organisation des Rezeptors in der Membran durch intrazelluläre Faktoren ist deshalb unwahrscheinlich. Dieses Ergebnis wurde weiter unterstützt durch die Tatsache, dass eine Deletionsvariante des hIRs - bei welcher der

intrazelluläre Anteil gänzlich fehlte - eine vergleichbare Dynamik in der Membran wie die Wildtyp-Version des Rezeptors zeigte (Abbildung 14). Auch die Behandlung des Rezeptors mit Insulin zeigte keine Auswirkung auf die Mobilität des Proteins in der Membran (Abbildung 15), obwohl bekannt ist, dass es nach Stimulation zu einer Rekrutierung vieler intrazellulärer Bindungspartner an den Rezeptor kommt (Moloney et al. 2010).

7.1.2 Anteile der extrazellulären Domäne des hIRs scheinen eine Bedeutung für die Dynamik des Rezeptors in der Plasmamembran zu haben

Mit Hilfe von FRAP-Untersuchungen wurden in weiteren Versuchen auch unterschiedliche extrazelluläre Bindungspartner getestet, die einen Einfluss auf die Diffusion des hIRs in der Membran haben könnten. Hierbei zeigte sich, dass weder eine Stimulation mit Insulin (Abbildung 15), noch der Abbau der Glykokalix (Abbildung 20) der untersuchten Zellen, die Dynamik des Rezeptors in der Membran entscheidend ändern konnten. Es muss jedoch angemerkt werden, dass eine Wechselwirkung mit möglichen Glykokalixresten nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, da die Glykokalix durch die angewandte Enzym-Behandlung nur teilweise abgebaut wurde (Abbildung 20). Zusätzlich wird auch durch die verwendete WGA-Färbung (siehe Abschnitt 5.3.10) – zum Nachweis des Glykokalix-Abbaus - nur ein Teil der glykosylierten Membranbestandteile markiert (Wang et al. 2010). Wenn auch unwahrscheinlich, wäre es deshalb möglich, dass die Glykokalix im Rahmen der entsprechenden Versuche weniger stark als vermutet abgebaut wurde und der hIR mit den verbliebenen Resten der Glykokalix in Interaktion getreten ist.

Keiner der untersuchten möglichen Bindungspartner des hIRs hatte in den bisherigen Versuchen einen nachweisbaren Einfluss auf die Organisation des hIRs in der Zellmembran. Es wurde deshalb in einem weiteren Schritt mit Hilfe einer Deletionsanalyse versucht, eine Domäne des Proteins zu bestimmen, welche die Mobilität des Rezeptors in der Membran kontrollieren

kann. Die ermittelten Ergebnisse lieferten Hinweise, dass die extrazellulären Domänen des hIRs für die Diffusion des Proteins in der Membran entscheidend sind (Abbildung 14). In weiteren Experimenten konnten sowohl Bereiche in der mittleren Region der extrazellulären Domäne, (Abbildung 21) wie auch membrannahe extrazelluläre Aminosäure-Sequenzen (Abbildung 22) als entscheidend für die Dynamik des Rezeptors in der Plasmamembran identifiziert werden. Hierbei ergab sich jedoch ein Widerspruch, da die Länge des deletierten extrazellulären Bereichs nicht mit einer Zunahme der Mobilität korrelierte. Wenngleich eine teilweise Deletion der extrazellulären Domäne des Proteins in einer Zunahme der hIR-Mobilität in der Membran resultierte, so führte eine weitere Deletion wieder zu einer verlangsamten Diffusion (Abbildung 23). Offensichtlich überlagern sich hier Mechanismen, die für die unterschiedlichen Varianten verschieden stark ausgeprägt sind. Weitere Deletionskonstrukte des hIRs, die zur Klärung des Problems hätten beitragen können, konnten bei überexprimierenden Zellen nicht in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Abbildung 24).

Hierdurch war es einerseits nicht möglich, die beschriebene Problematik aufzulösen, andererseits konnte auch die Lokalisierung entscheidender Proteindomänen des hIRs nicht weiter eingegrenzt werden. Die erzielten Ergebnisse geben somit nur Hinweise, dass eine oder mehrere Regionen der extrazellulären Domänen des hIRs ausschlaggebend für das Diffusionsverhalten des Rezeptors in der Zellmembran sind. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten aber ein Anhaltspunkt dafür sein, dass der hIR tatsächlich über extrazelluläre Mechanismen in seiner Dynamik gesteuert wird.

Es gibt mehrere Überlegungen, warum es bei der Analyse von hIR-Deletionsvarianten zu teilweise nicht erklärbaren Ergebnissen gekommen ist. Es wäre zum Beispiel möglich, dass bei umfangreicher Deletion die Transmembranregion des hIRs sehr dicht in Cluster gepackt wird und dass diese Cluster eine geringere Tendenz zur Dissoziation zeigen. Bei der Wildtypvariante und den anderen getesteten Konstrukten ist dies durch die

komplexe dreidimensionale Struktur der verschiedenen Protein-Domänen (de Meyts und Whittaker 2002) nicht möglich. Man müsste daher die genaue Verteilung der unterschiedlichen Konstrukte in der Plasmamembran mittels Antikörperfärbung untersuchen - idealerweise mit hochauflösender STED-Mikroskopie. Da jedoch keiner der getesteten kommerziell erhältlichen Antikörper eine verlässliche Spezifität zeigt (Abbildung 19), war eine genauere Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

7.1.3 Einzelmolekülanalysen von GFP-markierten hIR-Fusionskonstrukten in der Plasmamembran

Um eine Erklärung für die z.T. widersprüchlichen Ergebnisse der FRAP-Untersuchungen zu finden und um ein besseres Verständnis für die Dynamik der einzelnen hIR-Moleküle zu erlangen, wurde versucht, Bewegungen von Einzelmolekülen verschiedener Deletionsvarianten des Rezeptors in nativen Membranen nachzuverfolgen. Bei FRAP-Messungen können nur Diffusionsparameter ermittelt werden, die einen Durchschnittswert zahlreicher Bewegungsmuster darstellen. Durch Einzelmoleküluntersuchungen kann dagegen tatsächlich das Diffusionsverhalten und die Geschwindigkeit einzelner Proteine unterschieden werden. Mit dieser Technik ist somit die Detektion von Subpopulationen, die über verschiedene Diffusionsmuster verfügen, möglich. Beispielsweise könnte auch die Bewegung von Molekülen in Membranmikrodomänen und die dortige Verweilzeit auf diesem Weg nachgewiesen werden.

Im Vorfeld konnte im Rahmen von FRAP-Versuchen bereits ausgeschlossen werden, dass es Unterschiede zwischen der Mobilität des hIRs in *Membrane Sheet*-Präparationen und in Membranen intakter Zellen gibt (Abbildung 13). Es wurde deshalb entschieden, die Einzelmolekülanalysen an *Membrane Sheets* durchzuführen, da diese Methode einige gute Voraussetzungen für die Untersuchung des Diffusionsverhaltens von einzelnen membranständigen Molekülen bietet. Einerseits ermöglicht der Einsatz von

Membrane Sheets die Detektion von sehr leuchtschwachen Objekten, da fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dieser Plasmamembran-Präparationen ein sehr gutes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis aufweisen (siehe auch Abschnitt 2.3.3). Das Verwenden von *Membrane Sheets* könnte es deshalb auch erlauben, selbst die geringe emittierte Fluoreszenz von GFP-markierten Einzelmolekülen vom Grundrauschen des verwendeten Systems zu differenzieren. Die *Membrane Sheet*-Technik ist des Weiteren von Vorteil, da es für die Detektion einzelner Moleküle nötig ist, ein Großteil der Fluorophore in der analysierten Probe ausbleichen (siehe auch Abschnitt 6.1.3). Versuche, die GFP-markierten Proteine in der basalen Membran von intakten Zellen zu bleichen, erwiesen sich - durch Diffusion von Fluorophoren in den und aus dem Membranbereich außerhalb der Fokusebene - als ineffektiv. Das Ausbleichen von *Membrane Sheet*-Präparationen war, infolge der nahezu zweidimensionalen Anordnung der fluoreszenzmarkierten Moleküle, deutlich einfacher. Bei Vorversuchen erwies sich weiterhin die Kombination der *Membrane Sheet*-Technik mit TIRF-Mikroskopie als vorteilhaft. Ein Grund hierfür könnte sein, dass der Einsatz von TIRF-Mikroskopie den Einfluss von störenden Lichtsignalen, die außerhalb der Fokusebene liegen, weiter reduziert (siehe auch Abschnitt 2.3.2). Wie in Abschnitt 6.1.3 beschrieben, konnten durch die Verbindung der beiden Methoden möglicherweise Messungen an Einzelmolekülen gemacht werden. Es wurde hierfür versucht Einzelmolekül-Bewegungen über drei Charakteristika zu identifizieren. Einerseits über das – für einzelne GFP-Moleküle typische – Blinken mit einer Frequenz von 10 Hz, zusätzlich einer konstant emittierten Fluoreszenz zwischen den Blinkintervallen und einem stufenlosen Ausbleichen des Objekts nach längerer Laserexposition. Eine zuverlässige Bestimmung der nötigen Parameter war jedoch im Rahmen der Versuche nur bedingt möglich, wodurch letztlich unsicher ist ob tatsächlich Bewegungsverläufe einzelner Moleküle in der Membran detektiert werden. Mit Hilfe der so ermittelten Daten konnten *mean square displacement* (MSD)-Berechnungen zum Bewegungsverlauf der untersuchten Moleküle

durchgeführt werden. MSD-Analysen helfen klarzustellen, ob die Bewegung von Partikeln einem freien, eingeschränkten oder gerichteten Diffusionsmuster folgt (Michalet 2010). Für eine weitere statistische Auswertung konnten jedoch nicht ausreichend Ergebnisse gesammelt werden. Anhand der MSD-Analysen war es aufgrund starker Schwankungen der Resultate nicht möglich, zwischen „freier“ oder „eingeschränkter Diffusion“ in den verschiedenen untersuchten Konditionen zu unterscheiden. Auch eine Differenzierung der untersuchten hIR-Varianten anhand bestimmter Diffusionsmuster war somit nicht möglich. Es konnte dementsprechend gezeigt werden, dass die angewandte Technik vermutlich grundsätzlich die Detektion von GFP-markierten Einzelmolekülen in Zellmembranen ermöglicht, diese jedoch sehr aufwendig und unzuverlässig ist.

7.1.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Im ersten Teil der Dissertation wurden Hinweise gefunden, dass Domänen im extrazellulären Bereich des hIRs einen Einfluss auf die Dynamik des Rezeptors in der Zellmembran haben. Eine entscheidende Rolle von Interaktionen mit intrazellulären Bestandteilen, mit dem Bindungspartner Insulin oder relevante Effekte durch Wechselwirkungen mit der zellulären Glykokalix konnten des Weiteren ausgeschlossen werden. Zusätzlich konnte die Machbarkeit einer Methode zur Einzelmoleküldetektion von GFP-markierten Membranproteinen mittels TIRF-Mikroskopie gezeigt werden. Im Rahmen der Untersuchungen wurde zusätzlich verifiziert, dass die Diffusionsparameter von Proteinen in der Membran intakter Zellen mit denen von *Membrane Sheet*-Präparationen vergleichbar sind.

Insbesondere die Analyse von Mobilitätsparametern unterschiedlicher hIR-Fusionskonstrukte in der Plasmamembran hat zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen geführt. Es müssten weitere Deletionskonstrukte des Rezeptors untersucht werden, um eine eindeutige Aussage über die Proteindomänen

des hIRs machen zu können, die entscheidend für die Dynamik des Rezeptors in der Zellmembran sind. Hierbei sollten jedoch nur kleine Bereiche des Proteins deletiert werden, um zu vermeiden, dass die Tertiärstruktur des Rezeptors zu stark abgewandelt wird. Auch die hier beschriebene Methode zur Einzelmolekül-Analyse hat sich als problematisch und nicht effektiv genug herausgestellt. Bei einer Wiederholung entsprechender Experimente sollte deshalb vermieden werden, Membranproteine mit GFP-Markierung zu verwenden. Es erscheint aussichtsreicher, Fluoreszenz-Farbstoffe einzusetzen die leuchtstärker sind, nicht blinken und für die Einzelmolekül-Detektion optimiert wurden.

7.2 Calcium-Ionen verändern über elektrostatische Wechselwirkungen die Verteilung und Organisation von Proteinen in der Plasmamembran

Das Verständnis der Organisation von Lipiden und Proteinen in der Plasmamembran ist geprägt durch eine Reihe von unterschiedlichen Membranmodellen. Hierzu zählen bis heute das schon 1972 formulierte *Fluid-Mosaic* Modell von Singer und Nicolson (Singer und Nicolson 1972) und die moderneren und bereits deutlich differenzierteren Ansätze der *Picket Fence*- (Sheetz et al. 1980; Sheetz 1983) und der *Lipid Raft*-Hypothesen (Simons und van Meer 1988; Simons und Ikonen 1997). Viele der in diesen Theorien beschriebenen Darstellungen und Schlussfolgerungen liefern Erklärungen für Prozesse, die im Rahmen von Experimenten an Plasmamembranen beobachtet worden sind. Wie eingangs beschrieben, sind jedoch auch Phänomene an Membranen entdeckt worden, die mit diesen Modellen nicht oder nur unvollständig zu erklären sind. Da sich die gängigen Hypothesen hauptsächlich auf die direkten Wechselwirkungen zwischen Lipiden und Proteinen beschränken, könnte es sein, dass diese Sichtweise nur ein unvollständiges Bild des Spektrums möglicher Prozesse an der Membran in Betracht zieht. Ein von den derzeitigen Modellvorstellungen vernachlässigter Aspekt sind mögliche elektrostatische

Wechselwirkungen von Membranbestandteilen mit im Zytoplasma gelösten Elektrolyten. Aufbauend auf Vorarbeiten (Zilly 2006) konnten im Rahmen dieser Arbeit deutliche Indizien dafür gefunden werden, dass auch ionischen Interaktionen des Ca^{2+} -Ions einen direkten Einfluss auf die Ausbildung von Protein-Mikrodomänen haben.

7.2.1 Mögliche elektrostatische Effekte zwischen Calcium-Ionen und Membranproteinen

Im Zytoplasma von Zellen kommen zahlreiche Kationen und Anionen vor, die potentiell elektrostatisch mit Membranbestandteilen in Wechselwirkung treten können. In relevanten Konzentrationen können beispielsweise positiv geladene Kalium-, Natrium-, Calcium- und Magnesium-Ionen gefunden werden, sowie negativ geladene Chlorid-, Phosphat- oder Hydrogencarbonat-Ionen (Tabelle 1).

	Zytoplasmatische Konzentration [mM]	Extrazelluläre Konzentration [mM]
Na^+	5-15	145
K^+	140	5
Mg^{2+}	0,5	1-2
Ca^{2+}	10^{-4}	1-2
Cl^-	5-15	110
PO_4^{3-}	65	4
HCO_3^-	10	28

Tabelle 1 Konzentrationen unterschiedlicher Ionen im zytoplasmatischen und extrazellulären Bereich (abgewandelt aus Alberts 2008)

Von den aufgeführten Elektrolyten weisen nur Magnesium- und Calcium-Ionen jeweils eine mehrfache Ladung und daher eine hohe Ladungsdichte auf. Andere im Zytoplasma vorkommende Ionen sind entweder nur einfach geladen oder die Ladung ist über die Molekülstrukturen räumlich stärker

verteilt. Es ist gut denkbar, dass starke lokale Ladungen die Wechselwirkung mit Membranbestandteilen begünstigen, weshalb Mg^{2+} und Ca^{2+} die wahrscheinlichsten Kandidaten für solche Interaktionen sind. Für Magnesium-Ionen konnten allerdings bei entsprechenden Vergleichsversuchen keine Auswirkungen auf die Organisation von Membranproteinen entdeckt werden (Zilly et al. 2011). Eine Erklärung für die Beobachtung, dass trotz scheinbar ähnlicher physiko-chemischer Eigenschaften von Calcium- und Magnesium-Ionen nur die Konzentration von Calcium für die Membranorganisation entscheidend ist, könnte der Aufbau der Hydrathülle der Ionen sein. Alle geladenen Teilchen werden in wässrigen Lösungen von Wassermolekülen umlagert. Dies gilt sowohl für Ionen, als auch für Bestandteile von Membranen (Disalvo et al. 2008). Magnesium-Ionen zeigen eine deutlich stärkere Tendenz, Wasser an sich zu binden, als es bei Calcium der Fall ist. Bei Magnesium-Ionen bildet sich deshalb in wässrigen Lösungen eine etwas größere Hydrathülle als bei Ca^{2+} aus. Die Wassermoleküle sind in der Mg^{2+} -Hydrathülle im Vergleich jedoch etwa um den Faktor 1000 stärker gebunden (Maguire und Cowan 2002). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass Magnesium weniger z.B. mit Proteinen interagiert, da die angelagerte Hydrathülle nur schwer entfernt werden kann und somit eine Bindung an eine negativ geladene Gruppe erschwert wird.

7.2.2 Experimentell beobachtete Auswirkungen erhöhter Calcium-Konzentrationen auf die Organisation von Membranproteinen

Mit unterschiedlichen methodischen Ansätzen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Änderungen der zytoplasmatischen Calcium-Konzentrationen vom nanomolaren in den mikromolaren Bereich die Anordnung von Proteinen in der Plasmamembran beeinflussen. Als Resultat der Behandlung mit Calcium-Ionen konnte anhand von immunhistochemischen Färbungen an Plasmamembran-Präparationen eine vermehrt geclusterte Anordnung der untersuchten Proteine gemessen werden. Im Rahmen der Dissertation wurde hierfür eine Analyseverfahren etabliert, die eine objektive Quantifizierung von

Änderungen im Verteilungsmuster untersuchter Membranproteine ermöglichte (genauere Beschreibung in Abschnitt 6.2.1). Neben der geänderten Verteilung wurde auch eine verringerte Immunogenität Ca^{2+} -behandelter Membranproteine beobachtet (Abbildung 26). Die geringere Detektion der untersuchten Proteine durch Antikörper - nach entsprechender Calcium-Behandlung – könnte auf eine schlechtere Zugänglichkeit von Proteinepitopen innerhalb von enger gepackten Clusterstrukturen zurückzuführen sein (Zilly 2006). Der zeitlich parallele Verlauf von gemessener Immunfluoreszenz und der Änderung der Proteinanordnung (Abbildung 26) sprechen dafür, dass beiden Beobachtungen dieselbe Erklärung zugrunde liegt und dass nicht zwei unterschiedliche Prozesse ablaufen. Eine Umkehrung der Calcium-induzierten Cluster-Bildung der Membranproteine konnte durch die Inkubation der behandelten Zellen im Medium bewirkt werden. Es konnte jedoch erst nach einem Zeitraum von 30 - 60 Minuten beobachtet werden, dass sich die Intensität entsprechender Immunanfärbungen denen unbehandelter Kontrollen anglich (Abbildung 28). Untersuchungen an lebenden Zellen, die fluoreszenzmarkierte Varianten entsprechender Membranproteine überexprimierten, zeigten, dass nach Anstieg der Calcium-Konzentration im Zytoplasma der Zellen eine schnellere Diffusion und eine höhere immobile Fraktion der untersuchten Proteine nachweisbar waren. Auch für diese Ergebnisse ist eine mögliche Begründung, dass die untersuchten Proteine nach der Behandlung mit einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration verstärkt in Clustern in der Membran anzutreffen waren (siehe auch Abschnitt 6.2.3). Dies würde die gemessene Zunahme immobilisierter Proteine erklären. Des Weiteren kann sich indessen die reduzierte mobile Proteinpopulation, die in den Bereichen außerhalb der Proteincluster verbleibt, mit einer höheren Geschwindigkeit in der Zellmembran bewegen, weil in diesen Arealen weniger Hindernisse die Diffusion stören. Zusätzlich wurde bei den Analysen ein allgemeiner Rückgang der Fluoreszenz registriert (Abbildung 29 und Abbildung 30). Die Organisation der untersuchten Proteine in Mikrodomänen liefert auch für

diese Beobachtung eine Erklärung. Eine Ansammlung von Proteinen in geclusterten Strukturen hat unter anderem kleinere Abstände zwischen den Einzelproteinen zur Folge. Da für die Messungen GFP-markierte Proteine untersucht wurden, kann es bei einer Clusterung der Proteine zu *self-quenching*-Prozessen zwischen den GFP-Molekülen kommen, die eine reduzierte Fluoreszenzemission zu Folge hätten (siehe auch Abschnitt 6.2.3).

7.2.3 Mechanismus der Wirkung von Ca^{2+} auf die Cluster-Bildung

Dem Einfluss von Ca^{2+} auf Membranproteine könnte eine Vielzahl von Vorgängen zugrunde liegen, die nur Sekundäreffekte der Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration darstellen.

So wurde beobachtet, dass nach Erhöhung der Calcium-Konzentration untersuchte Membranproteine weniger mittels Antikörperfärbung zu detektieren waren (Abbildung 26). Auch Zellen, die GFP-markierte Membranproteine überexprimierten, zeigten nach Ca^{2+} -Inkubation eine Verringerung in der ausgestrahlten Fluoreszenzintensität. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Menge der Proteine in der Membran abgenommen hat. Durch die Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration könnten beispielsweise auch Endozytose-Prozesse ausgelöst worden sein, durch welche ein Teil der untersuchten Proteine von der Plasmamembran entfernt wurde. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von Calcium-Ionen einen Einfluss auf den Endozytose-Mechanismus an der Membran hat (MacDonald et al. 2005; Cabeza et al. 2010; Rosa et al. 2011). Eine Internalisierung der untersuchten Proteine würde erklären, warum bei Immunanfärbungen - nach der Behandlung der Proben mit Calcium - weniger Epitope an der Membran detektiert wurden, bzw. warum sich die GFP-Fluoreszenz überexprimierter Fusionskonstrukte reduzierte. Eine weitere Hypothese, die insbesondere das veränderte Clusterverhalten der untersuchten Membranproteine erklären könnte, wäre eine Calcium-bedingte Veränderung des Aktin-Zytoskeletts der

behandelten Zellen. Es ist bekannt, dass viele Proteine, die eine regulierende Aufgabe bei der Modulation des zellulären Zytoskeletts haben, Calcium-abhängig sind (Brünig et al. 2004; Oertner und Matus 2005). Wie im *Picket Fence*-Modell beschrieben, könnte sich hierbei eine Veränderung der Aktin-Strukturen auch auf die Anordnung von Membranproteinen auswirken. Die zytoplasmatischen Elemente der in der Plasmamembran diffundierenden Proteine könnten über umgeformte Kompartimente des Zytoskeletts neu angeordnet werden und geclusterte Strukturen in der Membran ausbilden. Eine vergleichbare Erklärungsmöglichkeit könnte auch das Rekrutieren anderer zytosolischer Proteine an die Membran liefern. Durch Interaktion mit den untersuchten Membranproteinen könnte ein verstärktes Clusterverhalten erklärt werden. Solche Proteinansammlungen könnten auch die Zugänglichkeit von Epitopen für Antikörper reduzieren und die geringere Immunogenität, sowie die beobachtete verringerte Mobilität erklären.

Gegen einen Einfluss von Endozytosereaktionen oder eine Ca^{2+} -induzierte Änderung des Aktin-Zytoskeletts spricht jedoch, dass die beschriebenen Auswirkungen erhöhter Calcium-Konzentrationen auf Membranproteine bei Experimenten an *Membrane Sheets* zu beobachten waren (Abbildung 26). Bei *Membrane Sheet*-Präparationen sind die für einen Endozytoseprozess oder die für eine Änderung des Zytoskellets notwendigen intrazellulären Faktoren nicht mehr vorhanden.

Bisher wurde nicht diskutiert, inwiefern die in den Experimenten eingesetzten Calcium-Behandlungen proteolytische Prozesse auslösen können. Viele Proteasen sind abhängig von der Anwesenheit von Calcium, können durch eine höhere Calcium-Ionen-Konzentration verstärkt aktiviert werden (Dargelos et al. 2008) und könnten somit zu den beobachteten Ca^{2+} -Effekten beitragen. Bei Experimenten an *Membrane Sheets* (siehe z.B. Abbildung 26) könnten beim Generieren der Membran-Präparationen zytoplasmatische oder membranständige Proteasen freigesetzt worden sein, die durch spätere Calcium-Inkubation noch zusätzlich aktiviert wurden. Dies könnte den Abbau von entscheidenden Epitopen der beobachteten Membranproteine bewirken

und damit zu einer Abnahme der Antigenizität, einem schlechteren Binden von Antikörpern und letztendlich zu einer verringerten Immunanfärbung führen. Bei Versuchen, die an lebenden Zellen durchgeführt wurden, ist die intrazelluläre Calcium-Konzentration artifiziell erhöht worden (Abbildung 29 und Abbildung 30). Auch dieses Vorgehen könnte zu einer Aktivierung von Proteasen und zum Abbau der untersuchten GFP-markierten Proteine geführt haben. Dies könnte theoretisch die gemessene Abnahme von GFP-Fluoreszenz in Ca^{2+} -behandelten Zellen erklären.

Um auszuschließen, dass Proteasen einen Einfluss auf die Ergebnisse ausüben, wurden in einem Kontrollexperiment unterschiedliche Protease-Inhibitoren zugesetzt und Protease-Aktivität unterbunden. Hierbei wurde kein Unterschied zwischen Konditionen mit oder ohne Inhibitoren-Zugabe festgestellt (Abbildung 27).

Es wäre auch denkbar, dass die Calcium-Ionen an spezielle Proteindomänen binden, die nur in einer kleinen Subpopulation der Membranproteine anzutreffen ist. Es ist bekannt, dass sich Calcium an bestimmte Proteine über Ca^{2+} -Bindungsstellen anlagert (Lewit-Bentley und Réty 2000) und dadurch Konformationsänderungen der betroffenen Proteine auslösen kann (Hoffman et al. 2011). Eine solche Änderung der Proteinstruktur könnte Auswirkungen auf die Anordnung der Proteine in der Plasmamembran haben und möglicherweise auch den Aufbau von Mikrodomänen verändern. Dass ein solcher Prozess den in dieser Arbeit beschriebenen Phänomenen zugrunde liegt, ist jedoch unwahrscheinlich, da für die hier untersuchten Proteine keine speziellen Calcium-Bindungsstellen beschrieben sind (Jahn und Scheller 2006).

Möglich wäre auch, dass Calcium über das Binden an Membranlipide ein Clustern der untersuchten Proteine verursacht. Es konnte gezeigt werden, dass sich Calcium-Ionen an negativ geladene Lipide in der Plasmamembran anlagern können und dabei die Formierung von Lipid-Mikrodomänen bewirken (Ellenbroek et al. 2011). Wie eingangs im Rahmen der *Lipid Raft*-

Hypothese beschrieben, könnte eine Änderung der Lipid-Anordnung über eine Wechselwirkung der Lipide mit Protein-Transmembranregionen auch Einfluss auf die Verteilung von Proteinen in der Membran haben. Sollte diese Erklärung den beobachteten Ergebnissen zugrunde liegen, würden die registrierten Veränderungen der Membranprotein-Anordnung nur Sekundäreffekte der Interaktion zwischen Calcium und bestimmten Membranlipiden darstellen. Gegen diese Vermutung spricht allerdings die Tatsache, dass in dieser und in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass der Calcium-Effekt bei strukturell sehr unterschiedlich aufgebauten Membranproteinen nachgewiesen werden konnte. Eine Lipid-Protein-Interaktion kann nur über die membranahen Domänen der Proteine stattfinden, weshalb diese Proteinstrukturen entscheidend für das Ausmaß des Calcium-Effekts sein müssen. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Form der Membranverankerung und dem Ausmaß des Calcium-Effekts bei den in dieser Arbeit genannten und weiteren untersuchten Membranproteinen entdeckt werden (Zilly 2006).

Zusammenfassend betrachtet zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Calcium-Ionen einen Einfluss auf die laterale Organisation der hier untersuchten Membranproteine Syntaxin und SNAP25 ausüben können. Hierbei korreliert eine Zunahme zytoplasmatischer Ca^{2+} -Konzentration mit einem erhöhten Clustergrad der Proteine in der Zellmembran. Es konnte des Weiteren ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt auf indirekten - durch Calcium-Ionen induzierten - Prozessen beruht. Anhand der Resultate und da Calcium-Ionen physikochemische Eigenschaften aufweisen, die entsprechende Interaktionen mit Membranproteinen begünstigen, konnte geschlossen werden, dass die beobachteten Phänomene auf direkten elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Calcium-Ionen und den untersuchten Proteinen beruhen. Es wird hierbei davon ausgegangen, dass die Anlagerung der positiv geladenen Calcium-Ionen an Membranproteine zur Neutralisierung einiger negativ geladener Aminosäuregruppen führt. Hierdurch werden Abstoßungsreaktionen zwischen negativ geladenen

Proteindomänen verringert und die Formierung von Clustern begünstigt (genauer erläutert in Abschnitt 7.2.5). Unterstützt wird diese These auch durch weitere Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Lang, bei denen gezeigt wurde, dass der Effekt der Calcium-Behandlung um so stärker nachweisbar war, je ausgeprägter die negative Gesamtladung der intrazellulären Domänen untersuchter Membranproteine war (Zilly et al. 2011).

7.2.4 Biologische Signifikanz der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Calcium-Ionen und Membran-Proteinen

Die Konzentration von Calcium-Ionen im Zytoplasma ist unter normalen Bedingungen niedrig und liegt mit 100 nM deutlich unter den 1-2 mM, die durchschnittlich im extrazellulären Bereich gemessen werden (Machaca 2010). Lokale Messungen im Öffnungsbereich von Ionenkanälen konnten Calcium-Konzentrationen von bis zu 100 μ M nachweisen (Rizzuto und Pozzan 2006). Im Verlauf einer Zell-Stimulation kann es somit dazu kommen, dass angrenzend an Calcium-Kanäle Bedingungen anzutreffen sind, die mit den Konditionen von Experimenten dieser Arbeit und den Studien von (Zilly 2006) vergleichbar sind. Bei Experimenten an frisch präparierten Plasmamembranen wurden diese mit Pufferlösungen behandelt, die 800 nM (Zilly 2006) oder 54 μ M (in dieser Arbeit) freies Calcium enthielten. Die zuvor den normalen zytoplasmatischen Calcium-Konzentrationen ausgesetzten untersuchten Membranproteine zeigten nach Behandlung die anfangs beschriebene Änderung der Proteinanordnung (Abbildung 26). Inwiefern der beschriebene Ca^{2+} -Einfluss auf die Organisation von Membranproteinen von biologischer Relevanz ist und tatsächlich *in vivo* zum Tragen kommen, bleibt spekulativ. Es existieren jedoch verschiedene zelluläre Prozesse, bei denen die Menge an intrazellulären Calcium-Ionen deutlich zunimmt. Beispiele hierfür sind unter anderem die Signalweiterleitung bei neuronaler Transmission oder bei Muskel-Kontraktionen (Berridge et al. 2000), aber auch bei der T-Zellen-Aktivierung (Quintana et al. 2011) sowie beim

gesteuerten Zelltod (Murgia et al. 2009) ist ein Ansteigen der Calcium-Konzentration im Zytoplasma von Zellen nachgewiesen worden. Theoretisch könnte es dementsprechend im Rahmen dieser Prozesse auch zu einem verstärkten Clustern von Membranproteinen kommen. In Folgeschritten könnte dies die Rekrutierung von zytoplasmatischen Faktoren unterstützen und vielleicht zur Ausbildung von *Signalling*-Plattformen führen. Diese könnten die intrazelluläre Fortsetzung einer Signalkaskade unterstützen, verstärken oder auch erst ermöglichen machen.

Es ist in dieser Arbeit auch versucht worden nachzuweisen, dass der beschriebene Einfluss von Calcium-Ionen auf die Anordnung von Membranproteinen tatsächlich als Teil natürlicher zellulärer Abläufe auftritt. Hierfür wurde die intrazelluläre Calcium-Konzentration über verschiedene Stimuli physiologisch erhöht. Zellen wurden einerseits mit Carbachol behandelt, was dazu führt, dass Calcium-Kanäle in der Plasmamembran von Zellen geöffnet werden (Thiel et al. 2010). Zusätzlich wurde auch Thapsigargin verwendet (Rogers et al. 1995), das den Transport von Calcium in Zellorganellen unterbindet. Jedoch konnte selbst nach Kombination beider Substanzen kein Indiz gefunden werden, dass es bei untersuchten Zellen zu einer Organisation von Membranproteinen in Mikrodomänen kommt (Abbildung 31). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die letztendlich erreichte Erhöhung der zytoplasmatischen Calcium-Ionen-Konzentration nicht ausreichend war, um einen Effekt entlang der gesamten Plasmamembran der behandelten Zellen auszulösen. Es wäre jedoch möglich, dass es nur punktuell im Bereich von geöffneten Ionen-Kanälen zu einer verstärkten Clusterung von Membranproteinen gekommen ist. Ein solcher Effekt würde mit der hier verwendeten Methodik nicht nachweisbar sein. Auch wurde in einer früheren Studie gezeigt, dass die hier verwendeten PC12-Zellen z.T. nur wenige Ca^{2+} -Kanäle aufweisen (Lang et al. 1997), wodurch es nur zu geringem Einströmen von Ca^{2+} -Ionen aus dem extrazellulären Bereich kommen kann. Wenn bovine chromaffine Zellen durch Depolarisation stimuliert werden, kann allerdings die Anordnung von

Proteinen in der Plasmamembran geändert werden (Zilly et al. 2011). In der zitierten Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die vermehrte Anwesenheit von Calcium-Ionen einen Einfluss auf Protein-Protein-Interaktionen zwischen verschiedenen SNARE-Proteinen hat. Diese Ergebnisse sind zwar kein direkter Beweis für eine biologische Signifikanz des beschriebenen Calcium-Ionen-Effekts, sie machen es aber wahrscheinlich, dass der Effekt – wenn er stattfinden würde - im Rahmen von zellulären Prozessen eine Rolle spielen könnte.

7.2.5 Modell zur Erklärung des Einflusses der Calcium-Ionen-Konzentration auf die Formierung von Proteinmikrodomänen in der Plasmamembran

In anderen Arbeiten konnte bereits nachgewiesen werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten membranständigen Proteine SNAP25 und Syntaxin1 als geclusterte Multimere in der Membran vorkommen (Lang et al. 2001; Ohara-Imaizumi et al. 2004; Knowles et al. 2010). Bei der Formierung von Proteinmikrodomänen scheint sich ein Gleichgewicht zwischen schwachen anziehenden homophilen Interaktionen über Oligomerisationsdomänen der Proteine und abstoßenden Kräften einzustellen, wodurch Cluster ähnlicher mittlerer Größe entstehen. Für die Ausbildung von Syntaxin1-Clustern sind insbesondere zunehmende sterische Hinderungen als limitierender Faktor für die Clustergröße vermutet worden (Sieber et al. 2007). Ein weiterer Einfluss, der sich hemmend auf das Clusterwachstum auswirken könnte, ist die lokale Ansammlung gleichartig geladener Proteindomänen. Die in dieser Arbeit untersuchten Membranproteine weisen jeweils negative Gesamtladungen der zytoplasmatischen Bereiche auf (Zilly et al. 2011). Bei steigender Anzahl der Einzelproteine innerhalb eines Clusters könnte es ab einer bestimmten Clustergröße zu einem Gleichgewicht den anziehenden homophilen Kräften der Oligomerisationsdomänen und den abstoßenden sterischen und zusätzlich durch negative Ladungen elektrostatischen Wechselwirkungen. Da dann die Anlagerung von weiteren Proteinen erschwert würde, wäre die

Menge von Einzelproteinen innerhalb eines Clusters auf eine maximale Anzahl limitiert und ein weiteres Anwachsen des Clusters wäre ab einer bestimmten Größe nicht mehr möglich. Durch die Anwesenheit von Calcium-Ionen könnte der beschriebene Gleichgewichtszustand also noch auf einer anderen Ebene beeinflusst werden (näher beschrieben in Abbildung 32).

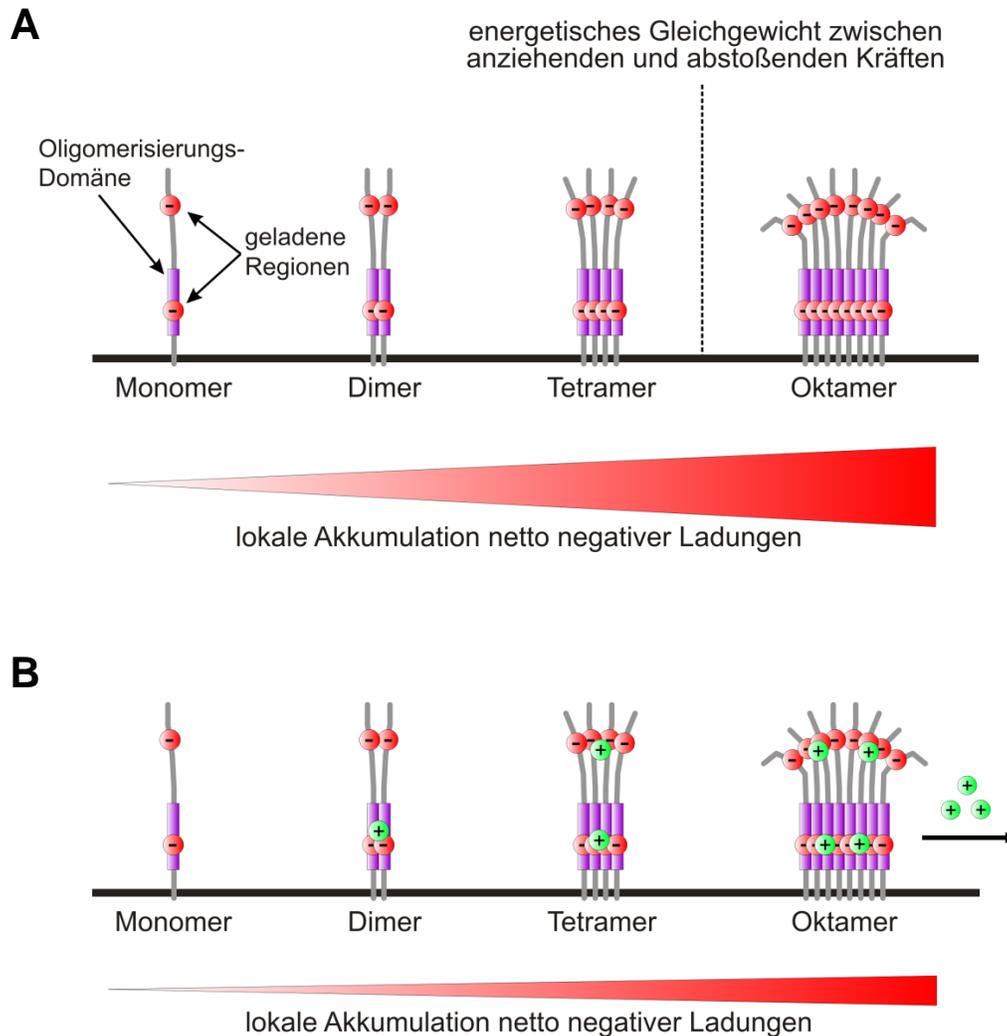


Abbildung 32 Auswirkung der Anwesenheit von Calcium-Ionen auf die Größe von Proteinclustern in der Plasmamembran - Modellvorschlag.

(A) Einzelproteine verbinden sich über Oligomerisierungsregionen zu Multimeren höherer Ordnung. Mit zunehmender Zahl der Proteine kommt es zur lokalen Ansammlung von gleichartigen Ladungen und letztlich zu einer Abstoßungswirkung, die weiterer Oligomerisierung entgegenwirkt. (B) Bei Anwesenheit von positiv geladenen Calcium-Ionen kann ein Teil der akkumulierten Ladungen ausgeglichen werden, wodurch die Anlagerung weiterer Proteinmoleküle an den Cluster ermöglicht wird. (Die Abbildung stammt von Prof. Thorsten Lang und wurde für die vorliegende Arbeit abgewandelt.)

Die grundsätzlichen Überlegungen dieses Modells könnten auch dahingehend erweitert werden, dass durch einen Anstieg der Calcium-Ionen-Konzentration die Zusammenlagerung mehrerer kleiner Proteincluster zu größeren Mikrodomänen begünstigt wird. Eine weitere mögliche Auswirkung der verstärkten Anwesenheit von Calcium-Ionen könnte auch sein, dass es zu geringeren Abständen der Proteine innerhalb der Clusterstrukturen kommt, da auch Abstoßungsreaktionen zwischen einzelnen Proteinen verringert werden. Inwiefern diese Prozesse - einzeln oder in Kombination - tatsächlich ablaufen, ist anhand der erzielten Daten nicht differenzierbar. Das für Calcium-Ionen erstellte Modell kann jedoch nur auf eine kleinere Teilpopulation aller in der Plasmamembran vorkommenden Proteine zutreffend sein, da die meisten Membranproteine eine positive Gesamtladung ihrer zytoplasmatischen Bereiche aufweisen (Wallin und von Heijne 1998). Sie folgen damit der „Positiv-Innen-Regel“, wonach normalerweise mehr positiv geladene Aminosäuren in den zytoplasmatischen Domänen von Membranproteinen zu finden sind als negativ geladene (von Heijne und Gavel 1988).

In früheren Studien wurde auch bereits die Möglichkeit der Einflussnahme elektrostatischer Wechselwirkungen auf die Ausbildung von Mikrodomänen in Betracht gezogen (Calloway et al. 2009). Hier wurde spekuliert, dass sich die positiv geladenen Kopfgruppen einfacher amphiphiler Verbindungen an Proteincluster anlagern und sich auf Protein-Protein-Interaktionen sowie auf die Formierung von Nanodomänen auswirken. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten weisen ebenfalls darauf hin, dass geladene Substanzen elektrostatisch mit Membranproteinen interagieren und einen direkten Einfluss auf die Ausbildung von Mikrodomänen haben können. Desweiteren konnten Jahn et al. 2011 zeigen, dass Interaktionen zwischen bestimmten Membranlipiden und -proteinen eine Formierung von Proteindomänen in der Plasmamembran verursachen, die nicht mittels der *Lipid Raft*-Hypothese zu erklären ist, sondern offensichtlich auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Membranbestandteilen beruht (van den Bogaart

et al. 2011). Im Gegensatz zu den in dieser Dissertation beobachteten generellen und insbesondere auf Ladungsverhältnissen beruhenden Interaktionen zwischen Calcium-Ionen und Membranproteinen, werden in den zitierten Arbeiten jedoch sehr spezifische Wechselwirkungen zwischen bestimmten Membranbestandteilen beschrieben.

7.2.6 Schlussfolgerung

Zusammen mit Ergebnissen früherer Studien (Zilly 2006) konnten deutliche Hinweise gefunden werden, dass Calcium-Ionen im Zytoplasma von Zellen die Organisation von Proteinen in der Plasmamembran beeinflussen und eine steigende Ca^{2+} -Konzentration zu einem verstärkten Clustern von Membranproteinen führt. Dass die beobachteten Veränderungen in der Anordnung von Membranproteinen eine Folge von Sekundäreffekten einer veränderten Calcium-Konzentration darstellen, kann anhand der vorliegenden Resultate und auch durch andere Arbeiten (Zilly et al. 2011) als unwahrscheinlich ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang konnte bewiesen werden, dass Auswirkungen durch Endozytosereaktionen, durch die Aktivität von Proteasen, zytoplasmatische Proteinstrukturen oder durch die Interaktion mit Membranlipiden keine entscheidende Rolle zu spielen scheinen. Auch durch spezifische Bindung verursachte Effekte zwischen Calcium-Ionen und untersuchten Proteinen oder Auswirkungen durch protokollbedingte Artefakte sind nicht wahrscheinlich.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass eine steigende Calcium-Ionen-Konzentration im Zytoplasma von Zellen über direkte Wechselwirkungen zu einem verstärkten Clustern von Proteinen in Membranen führt. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde ein Modell erstellt, mit dessen Hilfe die Formierung von Protein-Mikrodomänen durch elektrostatische Interaktionen zwischen den positiv geladenen Calcium-Ionen und negativ geladenen Bestandteilen von Membranproteinen zu erklären ist. Das beschriebene Modell stellt eine Erweiterung der bisherigen Theorien zum Aufbau und zur Organisation der Plasmamembran dar.

7.2.7 Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse liefern deutliche Indizien für eine bisher nicht beschriebene Form der Membranorganisation. Für ein genaueres Verständnis der biologischen Relevanz sollten noch weiterführende Experimente gemacht werden. Ein gutes Modellsystem hierfür wäre beispielsweise die neuronale Signalweiterleitung. Hier könnte nach physiologischer Stimulation von Nervenzellen in der Nähe von Calcium-Kanälen untersucht werden, ob ein verstärktes Clustern von Proteinen nachweisbar ist und ob das Clustern einen Einfluss auf die neuronale Aktivität hat.

8 Literaturverzeichnis

Alberts, B. (2008): *Molecular biology of the cell*. 5. Aufl. New York: Garland Science.

Alcor, D.; Gouzer, G.; Triller, A. (2009): Single-particle tracking methods for the study of membrane receptors dynamics. *European Journal of Neuroscience* 30 (6), S. 987–997.

Avery, J.; Ellis, D. J.; Lang, T.; Holroyd, P.; Riedel, D.; Henderson, R. M. et al. (2000): A cell-free system for regulated exocytosis in PC12 cells. *J. Cell Biol* 148 (2), S. 317–324.

Baird, B.; Sheets, E. D.; Holowka, D. (1999): How does the plasma membrane participate in cellular signaling by receptors for immunoglobulin E? *Biophysical Chemistry* 82 (2-3), S. 109–119.

Barnstable, C. J.; Hofstein, R.; Akagawa, K. (1985): A marker of early amacrine cell development in rat retina. *Brain Res* 352 (2), S. 286–290.

Berridge, M. J.; Lipp, P.; Bootman, M. D. (2000): The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 1 (1), S. 11–21.

Bill, A.; Schmitz, A.; Albertoni, B.; Song, J. N.; Heukamp, L. C.; Walrafen, D. et al. (2010): Cytohesins are cytoplasmic ErbB receptor activators. *Cell* 143 (2), S. 201–211.

Bizzarri, R.; Serresi, M.; Luin, S.; Beltram, F. (2009): Green fluorescent protein based pH indicators for in vivo use: a review. *Anal Bioanal Chem* 393 (4), S. 1107–1122.

Bowie, J. U. (2005): Solving the membrane protein folding problem. *Nature* 438 (7068), S. 581–589.

Brailoiu, E.; Rahman, T.; Churamani, D.; Prole, D. L.; Brailoiu, G. C.; Hooper, R. et al. (2010): An NAADP-gated two-pore channel targeted to the plasma membrane uncouples triggering from amplifying Ca²⁺ signals. *J. Biol. Chem* 285 (49), S. 38511–38516.

Brown, A. E.; Hategan, A.; Safer, D.; Goldman, Y. E.; de Discher (2009): Cross-correlated TIRF/AFM reveals asymmetric distribution of force-generating heads along self-assembled, "synthetic" myosin filaments. *Biophys J* 96 (5), S. 1952–1960.

Brünig, Ina; Kaeche, Stefanie; Brinkhaus, Heike; Oertner, Thomas G.; Matus, Andrew (2004): Influx of extracellular calcium regulates actin-dependent morphological plasticity in dendritic spines. *Neuropharmacology* 47 (5), S. 669–676.

Buselmaier, W. (2009): *Biologie für Mediziner*: Springer.

- Cabeza, J. M.; Acosta, J.; Alés, E. (2010): Dynamics and regulation of endocytotic fission pores: role of calcium and dynamin. *Traffic* 11 (12), S. 1579–1590.
- Calloway, N.; Vig, M.; Kinet, J.-P.; Holowka, D.; Baird, B. (2009): Molecular clustering of STIM1 with Orai1/CRACM1 at the plasma membrane depends dynamically on depletion of Ca²⁺ stores and on electrostatic interactions. *Mol. Biol. Cell* 20 (1), S. 389–399.
- Canel, M.; Serrels, A.; Anderson, K. I.; Frame, M. C.; Brunton, V. G.: Use of photoactivation and photobleaching to monitor the dynamic regulation of E-cadherin at the plasma membrane. *Cell Adh Migr* 4 (4), S. 491–501.
- Chan, Y. M.; Boxer, S. G. (2007): Model membrane systems and their applications. *Current Opinion in Chemical Biology* 11 (6), S. 581–587.
- Chazotte, B. (2011): Labeling membrane glycoproteins or glycolipids with fluorescent wheat germ agglutinin. *Cold Spring Harbor Protocols* 2011 (5), S. pdb.prot5623.
- Danielli, J. F.; Davson, H. (1935): A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Comp. Physiol* 5 (4), S. 495–508.
- Dargelos, E.; Poussard, S.; Brulé, C.; Daury, L.; Cottin, P. (2008): Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: a possible role of calpains in sarcopenia. *Biochimie* 90 (2), S. 359–368.
- Davson, H.; Hugh, F. (1943): The permeability of natural membranes. Cambridge [Eng.]: The University press.
- Dickson, R. M.; Cubitt, A. B.; Tsien, R. Y.; Moerner, W. E. (1997): On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* 388 (6640), S. 355–358.
- Disalvo, E. A.; Lairion, F.; Martini, F.; Tymczynszyn, E.; Frías, M.; Almaleck, H.; Gordillo, G. J. (2008): Structural and functional properties of hydration and confined water in membrane interfaces. *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (12), S. 2655–2670.
- Dixit, R.; Ross, J. L. (2010): Studying plus-end tracking at single molecule resolution using TIRF microscopy. *Methods Cell Biol* 95, S. 543–554.
- Dun, A. R.; Rickman, C.; Duncan, R. R. (2010): The t-SNARE complex: a close up. *Cell Mol Neurobiol* 30 (8), S. 1321–1326.
- Dupuy, A. D.; Engelman, D. M. (2008): Protein area occupancy at the center of the red blood cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105 (8), S. 2848–2852.
- Ebeling, W. (2004): Nonlinear Brownian motion – mean square displacement. *Condensed Matter Physics* 7 (2 (38)), S. 1–12.

- Ebina, Y.; Ellis, L.; Jarnagin, K.; Edery, M.; Graf, L.; Clauser, E. et al. (1985): The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated. *Cell* 40 (4), S. 747–758.
- Eddin, M. (2001): Membrane cholesterol, protein phosphorylation, and lipid rafts. *Sci STKE* 2001 (67), S. pe1.
- Eggeling, C.; Ringemann, C.; Medda, R.; Schwarzmann, G.; Sandhoff, K.; Polyakova, S. et al. (2008): Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* 457 (7233), S. 1159–1162.
- Ellenbroek, Wouter G.; Wang, Yu-Hsiu; Christian, David A.; Discher, Dennis E.; Janmey, Paul A.; Liu, Andrea J. (2011): Divalent cation-dependent formation of electrostatic PIP2 clusters in lipid monolayers. *Biophys. J* 101 (9), S. 2178–2184.
- Estep, T. N.; Mountcastle, D. B.; Barenholz, Y.; Biltonen, R. L.; Thompson, T. E. (1979): Thermal behavior of synthetic sphingomyelin-cholesterol dispersions. *Biochemistry* 18 (10), S. 2112–2117.
- Feigenson, G. W.; Buboltz, J. T. (2001): Ternary phase diagram of dipalmitoyl-PC/dilauroyl-PC/cholesterol: nanoscopic domain formation driven by cholesterol. *Biophys J* 80 (6), S. 2775–2788.
- Fernandis, A. Z.; Wenk, M. R. (2007): Membrane lipids as signaling molecules. *Current Opinion in Lipidology* 18 (2), S. 121–128.
- Ficz, G. (2005a): Polycomb group protein complexes exchange rapidly in living *Drosophila*. *Development* 132 (17), S. 3963–3976.
- Ficz, G. (2005b): Protein dynamics in the nucleus: Implications for gene expression. Dissertation. Hg. v. Department of Molecular Biology Göttingen germany Max-Planck-Institute for biophysical Chemistry. Göttingen.
- Foster, L. J. (2003): Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (10), S. 5813–5818.
- Frye, L. D.; Eddin, M. (1970): The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J Cell Sci* 7 (2), S. 319–335.
- Fujimoto, T.; Lee, K.; Miwa, S.; Ogawa, K. (1991): Immunocytochemical localization of fodrin and ankyrin in bovine chromaffin cells in vitro. *J. Histochem. Cytochem* 39 (11), S. 1485–1493.
- Fujiwara, T.; Ritchie, K.; Murakoshi, H.; Jacobson, K.; Kusumi, A. (2002): Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J Cell Biol* 157 (6), S. 1071–1081.
- Giorgi, C.; Ito, K.; Lin, H.-K.; Santangelo, C.; Wieckowski, M. R.; Lebiedzinska, M. et al. (2010): PML regulates apoptosis at endoplasmic reticulum by modulating calcium release. *Science* 330 (6008), S. 1247–1251.

- Goehring, N. W.; Chowdhury, D.; Hyman, A. A.; Grill, S.W (2010): FRAP analysis of membrane-associated proteins: lateral diffusion and membrane-cytoplasmic exchange. *Biophys. J* 99 (8), S. 2443–2452.
- Goodsaid-Zalduondo, F.; Rintoul, D. A.; Carlson, J. C.; Hansel, W. (1982): Luteolysis-induced changes in phase composition and fluidity of bovine luteal cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79 (14), S. 4332–4336.
- Gorter, E.; Grendel, F. (1925): On biomolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J Exp Med* 41 (4), S. 439–443.
- Gupta, N.; DeFranco, A. L. (2007): Lipid rafts and B cell signaling. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18 (5), S. 616–626.
- Halemani, N. D.; Bethani, I.; Rizzoli, S. O.; Lang, T. (2010): Structure and dynamics of a two-helix SNARE complex in live cells. *Traffic* 11 (3), S. 394–404.
- Hamann, S.; Hamann, J. F.; Litman, T.; Alvarez-Leefmans, F. J.; Winther, B. R.; Zeuthen, T. (2002): Measurement of cell volume changes by fluorescence self-quenching. *Journal of Fluorescence* 12 (2), S. 139–145.
- Harder, T.; Kuhn, M. (2000): Selective accumulation of raft-associated membrane protein LAT in T cell receptor signaling assemblies. *J. Cell Biol* 151 (2), S. 199–208.
- Haustein, E.; Schwille, P. (2007): Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36, S. 151–169.
- Hayat, M.A (2000): Principles and techniques of electron microscopy: biological applications: Cambridge University Press.
- Heijne, G. von; Gavel, Y. (1988): Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem* 174 (4), S. 671–678.
- Hell, S. W.; Wichmann, J. (1994): Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett* 19 (11), S. 780.
- Henderson, G. P.; Gan, L.; Jensen, G. J.; Digard, P. (2007): 3-D Ultrastructure of *O. tauri*: electron cryotomography of an entire eukaryotic cell. *PLoS ONE* 2 (8), S. e749.
- Heumann, R.; Kachel, V.; Thoenen, H. (1983): Relationship between NGF-mediated volume increase and "priming effect" in fast and slow reacting clones of PC12 pheochromocytoma cells. Role of cAMP. *Exp. Cell Res* 145 (1), S. 179–190.
- Heuser, J. (2000): The production of 'cell cortices' for light and electron microscopy. *Traffic* 1 (7), S. 545–552.

Hoffman, Laurel; Stein, Richard A.; Colbran, Roger J.; Mchaourab, Hassane S. (2011): Conformational changes underlying calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation. *EMBO J* 30 (7), S. 1251–1262.

Holroyd, P.; Lang, T.; Wenzel, D.; De, Camilli P.; Jahn, R. (2002): Imaging direct, dynamin-dependent recapture of fusing secretory granules on. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (26), S. 16806–16811.

Hooke, R. (1664): *Micrographia*. Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses with observations and inquiries thereupon. London: Royal Society.

Horn, F.; Dospil, A.; Bornemann, S.; Hübner, H. (2009): *Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 1200 Abbildungen: G. Thieme; S. 437f.

Inokuchi, J. (2007): Insulin resistance as a membrane microdomain disorder. *Yakugaku Zasshi* 127 (4), S. 579–586.

Jacobson, K.; Mouritsen, O. G.; Anderson, R. G. (2007): Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol* 9 (1), S. 7–14.

Jahn, R.; Scheller, R. H. (2006): SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (9), S. 631–643.

Jesorka, A.; Orwar, O. (2008): Liposomes: technologies and analytical applications. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 1, S. 801–832.

Kab, D. B.; Erný, J.; Ej la, V. H. (1998): T cell receptor signalling results in rapid tyrosine phosphorylation of the linker protein LAT present in detergent-resistant membrane microdomains. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 248 (2), S. 356–360.

Kabayama, K.; Sato, T.; Saito, K.; Loberto, N.; Prinetti, A.; Sonnino, S. et al. (2007): Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (34), S. 13678–13683.

Kai, M.; Sakane, F.; Jia, Y. J.; Imai, S.; Yasuda S.; Kanoh, H. (2006): Lipid phosphate phosphatases 1 and 3 are localized in distinct lipid rafts. *J Biochem (Tokyo)* 140, S. 677–686.

Kaiser, H.; Surma, M. A.; Mayer, F.; Levental, I.; Grzybek, M.; Klemm, R. W. et al. (2011): Molecular convergence of bacterial and eukaryotic surface order. *J. Biol. Chem* 286 (47), S. 40631–40637.

Karnovsky, M. J.; Kleinfeld, A. M.; Hoover, R. L.; Klausner, R. D. (1982): The concept of lipid domains in membranes. *J. Cell Biol.* 94 (1), S. 1–6.

Kasai, R. S.; Suzuki, K. G. N.; Prossnitz, E. R.; Koyama-Honda, I.; Nakada, C.; Fujiwara, T. K.; Kusumi, A. (2011): Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J. Cell Biol* 192 (3), S. 463–480.

- Kirk, S. E.; Skepper, J. N.; Donald, A. M. (2009): Application of environmental scanning electron microscopy to determine biological surface structure. *Journal of Microscopy* 233 (2), S. 205–224.
- Kiselyov, V. V.; Versteheyhe, S.; Gauguin, L.; Meyts, P. de (2009): Harmonic oscillator model of the insulin and IGF1 receptors' allosteric binding and activation. *Mol. Syst. Biol* 5, S. 243.
- Knowles, M. K.; Barg, S.; Chen, X.; Midorikawa, M.; Almers, W. (2010): Syntaxin clusters assemble reversibly at sites of secretory granules in live cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (48), S. 20804–20809.
- Lang, T. (2003): Imaging SNAREs at work in 'unroofed' cells—approaches that may be of general interest for functional studies on membrane proteins. *Biochem Soc Trans* 31 (Pt 4), S. 861–864.
- Lang, T.; Bruns, D.; Wenzel, D.; Riedel, D.; Holroyd, P.; Thiele, C.; Jahn, R. (2001): SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J* 20 (9), S. 2202–2213.
- Lang, T.; Wacker, I.; Steyer, J.; Kaether, C.; Wunderlich, I.; Soldati, T. et al. (1997): Ca²⁺-triggered peptide secretion in single cells imaged with green fluorescent protein and evanescent-wave microscopy. *Neuron* 18 (6), S. 857–863.
- Lewit-Bentley, Anita; Réty, Stéphane (2000): EF-hand calcium-binding proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 10 (6), S. 637–643.
- Lillemeier, B. F.; Pfeiffer, J. R.; Surviladze, Z.; Wilson, B. S.; Davis, M. M. (2006): Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (50), S. 18992–18997.
- Lingwood, D.; Simons, K. (2010): Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* (327).
- López-Font, I.; Torregrosa-Hetland, C. J.; Villanueva, J.; Gutiérrez, L. M. (2010): t-SNARE cluster organization and dynamics in chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry* 114 (6), S. 1550–1556.
- Low, S. H.; Vasanji, A.; Nanduri, J.; He, M.; Sharma, N.; Koo, M. et al. (2006): Syntaxins 3 and 4 are concentrated in separate clusters on the plasma membrane prior to the establishment of cell polarity. *Mol Biol Cell* 17, S. 977–989.
- MacDonald, P. E.; Eliasson, L.; Rorsman, P. (2005): Calcium increases endocytotic vesicle size and accelerates membrane fission in insulin-secreting INS-1 cells. *J. Cell. Sci* 118 (Pt 24), S. 5911–5920.
- Machaca, K. (2010): Ca(2+) signaling, genes and the cell cycle. *Cell Calcium* 48 (5), S. 243–250.

- Maguire, M. E.; Cowan, J. A. (2002): Magnesium chemistry and biochemistry. *BioMetals* 15 (3), S. 203–210.
- Mairhofer, M. (2002): Stomatin is a major lipid-raft component of platelet alpha granules. *Blood* 100 (3), S. 897–904.
- Malchiodi-Albedi, F.; Paradisi, S.; Matteucci, A.; Frank, C.; Diociaiuti, M. (2011): Amyloid oligomer neurotoxicity, calcium dysregulation, and lipid rafts. *Int J Alzheimers Dis* 2011, S. 906964.
- Markham, K.; Bai, Y.; Schmitt-Ulms, G. (2007): Co-immunoprecipitations revisited: an update on experimental concepts and their implementation for sensitive interactome investigations of endogenous proteins. *Anal Bioanal Chem* 389 (2), S. 461–473.
- McDermott, A. (2009): Structure and dynamics of membrane proteins by magic angle spinning solid-state NMR. *Annu Rev Biophys* 38, S. 385–403.
- McKern, N. M.; Lawrence, M. C.; Streltsov, V. A.; Lou, M. Z.; Adams, T. E.; Lovrecz, G. O. et al. (2006): Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature* 443 (7108), S. 218–221.
- Meyts, P. de; Whittaker, J. (2002): Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* 1 (10), S. 769–783.
- Michalet, X. (2010): Mean square displacement analysis of single-particle trajectories with localization error: Brownian motion in an isotropic medium. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 82 (4 Pt 1), S. 41914.
- Moede, T.; Leibiger, B.; Pour, H. G.; Berggren, P.; Leibiger, I. B. (1999): Identification of a nuclear localization signal, RRMKWKK, in the homeodomain transcription factor PDX-1. *FEBS Lett* 461 (3), S. 229–234.
- Moloney, A. M.; Griffin, J. G.; Timmons, S.; O'Connor, R.; Ravid, R.; O'Neill, C. (2010): Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiology of Aging* 31 (2), S. 224–243.
- Morone, N.; Fujiwara, T.; Murase, K.; Kasai, R. S.; Ike, H.; Yuasa, S. et al. (2006): Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *The Journal of Cell Biology* 174 (6), S. 851–862.
- Morris, R. J.; Jen, A.; Warley, A. (2011): Isolation of nano-meso scale detergent resistant membrane that has properties expected of lipid 'rafts'. *Journal of Neurochemistry* 116 (5), S. 671–677.
- Munro, S. (2003): Lipid Rafts: Elusive or Illusive? *Cell* 115 (4), S. 377–388.
- Murgia, Marta; Giorgi, Carlotta; Pinton, Paolo; Rizzuto, Rosario (2009): Controlling metabolism and cell death: at the heart of mitochondrial calcium signalling. *J. Mol. Cell. Cardiol* 46 (6), S. 781–788.

- Murray, D. H.; Tamm, L. K. (2009): Clustering of Syntaxin-1A in model membranes is modulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and cholesterol. *Biochemistry* 48 (21), S. 4617–4625.
- Nagy, P.; Jenei, A.; Kirsch, A. K.; Szollosi, J.; Damjanovich, S.; Jovin, T. M. (1999): Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy. *J Cell Sci* 112 (Pt 11), S. 1733–1741.
- Nicolau, D. V.; Hancock, J. F.; Burrage, K. (2007): Sources of anomalous diffusion on cell membranes: a Monte Carlo study. *Biophys J* 92 (6), S. 1975–1987.
- Nimigean, C. M. (2006): A radioactive uptake assay to measure ion transport across ion channel-containing liposomes. *Nature Protocols* 1 (3), S. 1207–1212.
- O'Connor, C. M.; Adams, J. U. (2010): Essentials of cell biology. Hg. v. NPG Education. Cambridge, MA.
- Oertner, Thomas G.; Matus, Andrew (2005): Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. *Cell Calcium* 37 (5), S. 477–482.
- Ohara-Imaizumi, M.; Nishiwaki, C.; Nakamichi, Y.; Kikuta, T.; Nagai, S.; Nagamatsu, S. (2004): Correlation of syntaxin-1 and SNAP-25 clusters with docking and fusion of insulin granules analysed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Diabetologia* 47 (12), S. 2200–2207.
- Ohtsubo, K.; Marth, J. D. (2006): Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126 (5), S. 855–867.
- Overton, C. E. (1895): Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen- und Tierzelle: Fäsi & Beer.
- Peters, R.; Cherry, R. J. (1982): Lateral and rotational diffusion of bacteriorhodopsin in lipid bilayers: experimental test of the Saffman-Delbrück equations. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Phillips, R.; Ursell, T.; Wiggins, P.; Sens, P. (2009): Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature* 459 (7245), S. 379–385.
- Pike, L. J. (2006): Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on lipid rafts and cell function. *J Lipid Res* 47, S. 1597–1598.
- Podskalny, J. M.; Takeda, S.; Silverman, R. E.; Tran, D.; Carpentier, J. L.; Orci, L.; Gorden, P. (1985): Insulin receptors and bioresponses in a human liver cell line (Hep G-2). *Eur. J. Biochem* 150 (2), S. 401–407.
- Quinn, P. J. (2010): A lipid matrix model of membrane raft structure. *Prog. Lipid Res* 49 (4), S. 390–406.
- Quintana, A.; Pasche, M.; Junker, C.; Al-Ansary, D.; Rieger, H.; Kummerow, C. et al. (2011): Calcium microdomains at the immunological synapse: how

- ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation. *EMBO J* 30 (19), S. 3895–3912.
- Radeva, G.; Sharom, F. J. (2004): Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells. *Biochem. J* 380 (Pt 1), S. 219–230.
- Rajan, S. S. (2002): Cytogenetics: Anmol Publications Pvt. Ltd; S. 21.
- Ravier, M.; Tsuboi, T.; Rutter, G. (2008): Imaging a target of Ca²⁺ signalling: Dense core granule exocytosis viewed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods* 46 (3), S. 233–238.
- Rayan, G.; Guet, J.; Taulier, N.; Pincet, F.; Urbach, W. (2010): Recent Applications of Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) to Membrane Bio-Macromolecules. *Sensors (Basel)* 10 (6), S. 5927–5948.
- Reits, E. A.; Neefjes, J. J. (2001): From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat. Cell Biol* 3 (6), S. E145-7.
- Reitsma, S.; Slaaf, D. W.; Vink, H.; Zandvoort, M. A. M. J.; oude Egbrink, M. G. A. (2007): The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 454 (3), S. 345–359.
- Reviakine, I.; Brisson, A. (2000): Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* 16 (4), S. 1806–1815.
- Rickman, C.; Medine, C. N.; Dun, A. R.; Moulton, D. J.; Mandula, O.; Halemani, N. D. et al. (2010): t-SNARE protein conformations patterned by the lipid microenvironment. *J Biol Chem* 285 (18), S. 13535–13541.
- Rizzuto, R.; Pozzan, T. (2006): Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol. Rev* 86 (1), S. 369–408.
- Robelek, R.; Lemker, E. S.; Wiltschi, B.; Kirste, V.; Naumann, R.; Oesterhelt, D.; Sinner, E. (2007): Inkorporation von in vitro synthetisierten G-Proteingekoppelten Rezeptoren in ein peptidfixiertes artifizielles Membransystem. *Angew. Chem* 119 (4), S. 611–614.
- Robertson, J. D. (1959): The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochem Soc Symp* 16, S. 3–43.
- Robertson, J. D. (1981): Membrane structure. *J Cell Biol* 91 (3 Pt 2), S. 189s-204s.
- Rogers, T. B.; Inesi, G.; Wade, R.; Lederer, W. J. (1995): Use of thapsigargin to study Ca²⁺ homeostasis in cardiac cells. *Biosci. Rep* 15 (5), S. 341–349.
- Rosa, J. M.; Torregrosa-Hetland, C. J.; Colmena, I.; Gutierrez, L. M.; Garcia, A. G.; Gandia, L. (2011): Calcium entry through slow-inactivating L-type calcium channels preferentially triggers endocytosis rather than exocytosis, in bovine chromaffin cells. *American journal of physiology. Cell physiology*.

- Rutter, G.; Bohn, W.; Hohenberg, H.; Mannweiler, K. (1986): Preparation of apical plasma membranes from cells grown on coverslips. Electron microscopic investigations of the protoplasmic surface. *Eur. J. Cell Biol* 39 (2), S. 443–448.
- Sadava, D. E. (1993): Biology. Organelle structure and function. Boston: Jones and Bartlett Publishers.
- Saffman, P. G.; Delbruck, M. (1975): Brownian motion in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (8), S. 3111–3113.
- Sako, Y.; Kusumi, A. (1995): Barriers for lateral diffusion of transferrin receptor in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers: fence versus tether. *J Cell Biol* 129 (6), S. 1559–1574.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. (2006): The condensed protocols from Molecular cloning. A laboratory manual: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schleiden, M. J. (1838): Beiträge zur Phytogenesis. Berlin: Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medizin.
- Schmelzle, K.; Kane, S.; Gridley, S.; Lienhard, G. E.; White, F. M. (2006): Temporal dynamics of tyrosine phosphorylation in insulin signaling. *Diabetes* 55 (8), S. 2171–2179.
- Schmitt, F. O.; Bear, R. S.; Ponder, Eric (1938): The red cell envelope considered as a Wiener mixed body. *J. Cell. Comp. Physiol* 11 (2), S. 309–313.
- Schwann, T.; Smith, H.; Schleiden, M. J. (1847): Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants: The Sydenham Society.
- Sheetz, M. P. (1983): Membrane skeletal dynamics: role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins, and shape. *Seminar Hematology* (Jul;20(3):175), S. 88.
- Sheetz, M. P.; Schindler, M.; Koppel, D. E. (1980): Lateral mobility of integral membrane proteins is increased in spherocytic erythrocytes. *Nature* 285 (5765), S. 510–511.
- Sieber, J. J.; Willig, K. I.; Kutzner, C.; Gerding-Reimers, C.; Harke, B.; Donnert, G. et al. (2007): Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science* 317 (5841), S. 1072–1076.
- Sieber, J. J.; Willig, K. I.; Heintzmann, R.; Hell, S. W.; Lang, T. (2006): The SNARE motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma. *Biophys J* 90 (8), S. 2843–2851.
- Simonetti, S.; Molina, M. A.; Queralt, C.; Aguirre, I. de; Mayo, C.; Bertran-Alamillo, J. et al. (2010): Detection of EGFR mutations with mutation-specific antibodies in stage IV non-small-cell lung cancer. *J Transl Med* 8, S. 135.

- Simons, K.; Vaz, W. L. C. (2004). *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct* 33 (1), S. 269–295.
- Simons, K.; van Meer, G. (1988): Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27 (17), S. 6197–6202.
- Simons, K.; Ikonen, E. (1997): Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387 (6633), S. 569–572.
- Singer, S. J.; Nicolson, G. L. (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175 (23), S. 720–731.
- Smart, E. J.; Ying, Y. S.; Mineo, C.; Anderson, R. G. (1995): A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92 (22), S. 10104–10108.
- Steyer, J. A.; Almers, W. (2001): A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2 (4), S. 268–275.
- Stier, A.; Sackmann, E. (1973): Spin labels as enzyme substrates. Heterogeneous lipid distribution in liver microsomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 311 (3), S. 400–408.
- Szab, A.; Horváth, G.; Szöllosi, J.; Nagy, P. (2008): Quantitative characterization of the large-scale association of ErbB1 and ErbB2 by flow cytometric homo-FRET measurements. *Biophys. J* 95 (4), S. 2086–2096.
- Tan, S.; Tan, H. T.; Chung, M. C. (2008): Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics* 8 (19), S. 3924–3932.
- Thiel, G.; Mayer, S. I.; Müller, I.; Stefano, L.; Rössler, O.G (2010): Egr-1-A Ca(2+)-regulated transcription factor. *Cell Calcium* 47 (5), S. 397–403.
- Tsuji, A.; Kawasaki, K.; Ohnishi, S.; Merkle, H.; Kusumi, A. (1988): Regulation of band 3 mobilities in erythrocyte ghost membranes by protein association and cytoskeletal meshwork. *Biochemistry* 27 (19), S. 7447–7452.
- Tsuji, A.; Ohnishi, S. (1986): Restriction of the Lateral Motion of Band 3 in the Erythrocyte Membrane by the Cytoskeletal Network: Dependence on Spectrin Association State. *Biochemistry* (25), S. 6133–6139.
- Uhles, S.; Moede, T.; Leibiger, B.; Berggren, P. O.; Leibiger, I. B. (2003): Isoform-specific insulin receptor signaling involves different plasma membrane. *J Cell Biol* 163 (6), S. 1327–1337.
- van den Bogaart, G.; Meyenberg, K.; Risselada, H. J.; Hayder, A.; Willig, K. I.; Hubrich, B. E. et al. (2011): Membrane protein sequestering by ionic protein-lipid interactions. *Nature* 479 (7374), S. 552–555.
- van Zanten, T. S.; Cambi, A.; Garcia-Parajo, M. F. (2010): A nanometer scale optical view on the compartmentalization of cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1798 (4), S. 777–787.

- Varki, N. M.; Varki, A. (2007): Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab. Invest* 87 (9), S. 851–857.
- Virchow, R. L. K. (1871): Die Cellularpathologie: A. Hirschwald.
- Wallin, E.; Heijne, G. von (1998): Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* 7 (4), S. 1029–1038.
- Wang, C.; Ho, P. C.; Lim, L. Y. (2010): Wheat germ agglutinin-conjugated PLGA nanoparticles for enhanced intracellular delivery of paclitaxel to colon cancer cells. *Int J Pharm* 400 (1-2), S. 201–210.
- Wang, Huan; Yu, Yao-Qing; Liao, Wen-Jun; Wang, Zong-Ren; Lv, Ya-Jie; Zhang, Yan-Guo; Gao, Tian-Wen (2009): Negative regulation of endogenous protein kinase Calpha on the dynamic change of carbachol-induced intracellular calcium response in different melanoma cells. *J. Cell. Physiol* 221 (2), S. 276–282.
- Whitten, A. E.; Smith, B. J.; Menting, J. G.; Margetts, M. B.; McKern, N. M.; Lovrecz, G. O. et al. (2009): Solution structure of ectodomains of the insulin receptor family: the ectodomain of the type 1 insulin-like growth factor receptor displays asymmetry of ligand binding accompanied by limited conformational change. *J. Mol. Biol* 394 (5), S. 878–892.
- Wu, S. L.; Hancock, W. S.; Goodrich, G. G.; Kunitake, S. T. (2003): An approach to the proteomic analysis of a breast cancer cell line (SKBR-3). *Proteomics* 3 (6), S. 1037–1046.
- Yang, S.; Raymond-Stintz, M. A.; Ying, W.; Zhang, J.; Lidke, D. S.; Steinberg, S. L. et al. (2007): Mapping ErbB receptors on breast cancer cell membranes during signal transduction. *J Cell Sci* 120 (Pt 16), S. 2763–2773.
- Yarden, Y.; Sliwkowski, M. X. (2001): Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2 (2), S. 127–137.
- Yeagle, P. (2005): The structure of biological membranes. 2nd. Boca Raton, Fla: CRC Press; S. 389 - 407.
- Zech, T.; Ejsing, C. S.; Gaus, K.; Wet, B. de; Shevchenko, A.; Simons, K.; Harder, T. (2009): Accumulation of raft lipids in T-cell plasma membrane domains engaged in TCR signalling. *EMBO J* 28 (5), S. 466–476.
- Zhang, X.; Hurng, J.; Rateri, D. L.; Daugherty, A.; Schmid-Schönbein, G. W.; Shin, H. Y. (2011): Membrane cholesterol modulates the fluid shear stress response of polymorphonuclear leukocytes via its effects on membrane fluidity. *American journal of physiology. Cell physiology*.
- Zhong, L.; Zeng, G.; Lu, X.; Wang, R. C.; Gong, G.; Yan, L. et al. (2009): NSOM/QD-based direct visualization of CD3-induced and CD28-enhanced nanospatial coclustering of TCR and coreceptor in nanodomains in T cell activation. *PLoS ONE* 4 (6), S. e5945.

Zilly, F. E. (2006): Fluoreszenzmikroskopische Studien an Plasmamembranen zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der neuronalen Exocytose. Dissertation. Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland. Abteilung für Neurobiologie.

Zilly, F. E.; Halemani, N. D.; Walrafen, D.; Spitta, L.; Schreiber, A.; Jahn, R.; Lang, T. (2011): Ca^{2+} induces clustering of membrane proteins in the plasma membrane via electrostatic interactions. *EMBO J* 30 (7), S. 1209–1220.

Zurzolo, C.; van Meer, G.; Mayor, S. (2003): The order of rafts. Conference on microdomains, lipid rafts and caveolae. *EMBO Rep* 4 (12), S. 1117–1121.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die mich im Verlauf der Dissertation unterstützt haben und hilfreich waren.

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Thorsten Lang für die Überlassung des Themas danken, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und dafür, dass er seine Zeit und sein Wissen als Betreuer meiner Doktorarbeit, als Gutachter und als Prüfer im Rigorosum bereitwillig zur Verfügung stellte. Ich danke für ihre Einsatzbereitschaft den Herren Professoren Christoph Thiele als Zweitgutachter, Herrn Prof. Hubert Schorle als fachnahem und Herrn Prof. Albert Haas als fachfremdem Prüfer.

Ich bin außerdem den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Lang dankbar, die es mir ermöglicht haben, - neben dem für mich wertvollen fachlichen Austausch und wichtigen diversen Hilfestellungen – in einer sehr angenehmen Atmosphäre zu arbeiten.

Mein Dank gilt ebenso den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kolanus, durch die ich - insbesondere in der Startphase meiner Promotionszeit - umfangreiche Unterstützung erfahren habe.

Zum Abschluss möchte ich auch einen besonderen Dank an meine Familie aussprechen, die mich im Verlauf der letzten Jahre immer unterstützt und motiviert hat - ein „Dankeschön“ an meine Eltern und an meine Geschwister. Hierbei möchte ich noch meinen Vater hervorheben, der viele Stunden mit Korrekturarbeiten für diese Arbeit verbracht hat und mir hierdurch eine große Hilfe war. Insbesondere aber danke ich auch meiner Frau, die mir durch ihre unermüdliche Unterstützung den Rücken gestärkt hat, in der langen Zeit auf Vieles verzichten musste und ohne deren Zuspruch manche Durststrecke der Arbeit nur schwer zu ertragen gewesen wäre.